

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO POR EL
MÉTODO SOL-GEL**

SHIRLEY JOHANNA MAGALI DUARTE CHÁVEZ

Tesis presentada a la Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del grado de Master en Ciencias de la Computación, énfasis en Biomateriales.

SAN LORENZO – PARAGUAY

Julio, 2012

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO POR EL
MÉTODO SOL-GEL**

SHIRLEY JOHANNA MAGALI DUARTE CHÁVEZ

Orientadora: **Prof. MAGNA M. MONTEIRO, D.Sc.**

Co-Orientadora: **Prof. MARIZE VARELLA DE OLIVEIRA, D.Sc.**

Tesis presentada a la Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del grado de Master en Ciencias de la Computación, énfasis en Biomateriales.

SAN LORENZO – PARAGUAY

Julio, 2012

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO POR EL
MÉTODO SOL-GEL**

SHIRLEY JOHANNA MAGALI DUARTE CHÁVEZ

Aprobado en fecha 6 de agosto de 2012.

Prof. Marize Varella de Oliveira, D.Sc.

Prof. Magna Monteiro, D.Sc.

Prof. María Celeste Vega Gómez, Ph.D.

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)
DE BIBLIOTECA CENTRAL DE LA UNA

A mi familia por su apoyo incondicional de siempre en especial a mi marido quien me enseñó a perseguir la excelencia para tropezarme con el éxito. A Jesús Misericordioso mi protector y a la Virgen María.

Agradecimientos

A la Facultad Politécnica de la Universidad de Asunción (FP-UNA) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme la oportunidad de realizar este postgrado como alumna becada de dedicación exclusiva.

A las profesoras Marize Varella, Solange Nascimento y Roseli Balestra por todas sus oportunas orientaciones durante mi estadía en RJ/Brasil para la caracterización del biomaterial.

A mi orientadora Magna Monteiro por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A los colegas Alexandre A. Ribeiro, Amal Eltom, Antônio José do Nascimento Dias, Sérgio Lobianco de Almeida, Luis Carlos da Silva, Aline Cecília Carvalho Moreira, Felipe Mello Gonzaga, Cristyane Silva Santos de Oliveira, Fábio Henrique Silva, Karla Patrícia Macedo Licon, Marcello Pojucan Magaldi Santos, Edmilson Carneiro de Araújo; del Laboratório de Tecnologia de Pós-LATEP - Instituto Nacional de Tecnología (INT), por recibirme de la mejor manera y prestarme su ayuda incondicional durante mi estadía en RJ, Brasil.

A los técnicos analistas Sheyla Carvalho, Fernanda de Souza (Centro de Caracterização em Nanotecnologia - CENANO), Renata Santos, Flavia de Almeida Ferreira y Joao Soares (Laboratório de Catálise-LACAT), y Luana Barki (Laboratório de Corrosão e Proteção-LACOR) por los análisis de caracterización de las muestras.

A mis padres por priorizar siempre mi formación académica y profesional y enseñarme el valor del sacrificio.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO POR EL MÉTODO SOL-GEL

Autor: SHIRLEY JOHANNA MAGALI DUARTE CHÁVEZ

Orientadora: Prof. MAGNA M. MONTEIRO, D.Sc.

Co-Orientadora: Prof. MARIZE VARELLA DE OLIVEIRA, D.Sc.

RESUMEN

En este trabajo cuatro rutas de síntesis de Hap por el método sol-gel, fueron evaluados en una primera fase pre-experimental. Los precursores fueron nitrato de calcio y fosfato ácido de amonio. Mediante técnicas de análisis de FRX/EDX, DRX, FTIR, MEV/EDS, BET; se caracterizaron las muestras obtenidas para cada método, se identificaron las fases presentes así como la morfología y tamaño de partícula del polvo cerámico obtenido, y se determinó el área superficial de cada una. El método I, arrojó las fases de CaO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ además de la fase Hap. Para los métodos II y III, se identificaron las fases Hap y β -TCP. En el método IV, para el cual se empleó como modificador orgánico el EDTA.2Na, se obtuvo un polvo blanco calcinado de una cerámica bifásica de Hap y β -Renanita, para la cual se tienen resultados alentadores sobre su biocompatibilidad. En la segunda fase experimental, se repitió la metodología del método IV para una escala mayor, manteniéndose las proporciones de reactivos precursores y las condiciones de análisis. La única variante introducida al proceso como variable independiente, fue el tiempo de envejecimiento. Cuatro tiempos fueron analizados y se observaron su influencia en las fases y tamaño de partículas obtenidas. Para todas las muestras obtenidas a diferentes tiempos de envejecimiento, se identificaron diferentes fases, estando las fases Hap y Renanita presentes. El área superficial obtenida fue baja y el tamaño de partícula fue micrométrico en todas las muestras.

Palabras clave: Hidroxiapatita, β -tricalcio fosfato, β -Renanita, biomateriales, tamaño de partícula.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATES BY THE SOL-GEL

Author: SHIRLEY JOHANNA MAGALI DUARTE CHÁVEZ

Advisor: Prof. MAGNA M. MONTEIRO, D.Sc.

Co-Advisor: Prof. MARIZE VARELLA DE OLIVEIRA, D.Sc.

ABSTRACT

In this work four routes of synthesis of Hap by the sol-gel were evaluated in a pre-experimental phase. The precursors were calcium nitrate and acid ammonium phosphate. In each method or route the samples were characterized by using XRF/EDX, XRD, FTIR, SEM/EDS and BET analysis techniques. The phases present, the morphology, surface area and size of the particle on the ceramic powder obtained, were identified and studied. The method I showed the phases of CaO and Ca(OH)₂ in addition to the Hap phase. For methods II and III, Hap and β-TCP phases were identified. In the method IV, which was used as the organic modifier EDTA.2Na, a white powder calcined in a biphasic ceramic Hap-Renanita was obtained, this is an encouraging results respect to their biocompatibility. In the second experimental phase, the method IV methodology was repeated to a larger scale, keeping the proportions of precursor reagents and analytical conditions. The only change introduced to the latter process as an independent variable was the time of aging. Four times were analyzed and observed its influence on the phases and particle sizes obtained. For all samples obtained at different aging times, different phases were identified, being present Hap and Renatita phases. In all samples the surface area obtained was low and the particle size was in the order of micrometers.

Key words: Hidroxiapatite, β-tricalcium phosphate, β-Rhenanite, biomaterials, particle size.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biomateriales	4
2.2 Clasificación de los biomateriales	5
2.2.1 Biomateriales metálicos.....	5
2.2.2 Biomateriales cerámicos	6
2.2.3 Biomateriales poliméricos	6
2.2.4 Biomateriales compositos.....	7
2.2.5 Nanobiomateriales	7
2.3 Características de los biomateriales.....	10
2.3.1 Osteoconducción	11
2.3.1 Osteoinducción	12
2.3.1 Osteointegración	12
2.4 Características fisicoquímicas de la Hap y sus fosfatos de calcio relacionados	13
2.4.1 Propiedades y estructuras de las cerámicas de fosfatos de calcio.....	13
2.4.2 Disolución y formación de cristales de fosfato de calcio.....	19
2.5 Preparación de las cerámicas de fosfatos de calcio	20
2.5.1 Métodos secos.....	20
2.5.2 Métodos húmedos.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Materiales	26
3.2 Caracterización de las muestras.....	26
3.2.1 DRX.....	27
3.2.2 FTIR	27
3.2.3 MEB/EDS	28
3.2.4 FRX	28
3.2.5 BET	29

3.3 Metodología.....	30
3.3.1 Parte pre-experimental.....	31
3.3.2 Parte experimental	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Pre-experimento	37
4.1.1 DRX.....	37
4.1.2 FTIR	40
4.1.3 MEB/EDS	44
4.1.4 FRX/EDX	56
4.1.5 BET	58
4.2 Experimento	59
4.2.1 FRX/EDX	59
4.2.2 DRX.....	60
4.2.3 FTIR	66
4.2.4 MEB/EDS	70
4.2.5 BET	82
5. CONCLUSIÓN.....	83
ANEXOS	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Clasificación general de los biomateriales.....	8
Tabla 2.2 Características generales de los biomateriales.....	10
Tabla 2.3 Fosfatos de calcio: composición química, relación molar Ca/P, solubilidad, pH, rango de temperatura de estabilidad en soluciones acuosas.....	14
Tabla 2.4 Principales bandas de vibración IR y líneas de DRX de algunos compuestos de fosfatos de calcio relevantes.....	15
Tabla 2.5 Fosfatos de calcio, que pueden ser obtenidos a partir de reacciones en el estado sólido.....	21
Tabla 2.6 Compuestos cristalinos precipitados a temperatura ambiente o corporal y rango de estabilidad de pH en el sistema $\text{Ca(OH)}_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$	22
Tabla 3.1 Experimento: tiempos de envejecimientos para cada muestra.....	36
Tabla 4.1 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_1	46
Tabla 4.2 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_2	49
Tabla 4.3 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_3	53
Tabla 4.4 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_3	56
Tabla 4.5 Composición química de las muestras M_1 , M_2 , M_3 y M_4 de los diferentes métodos.....	57
Tabla 4.6 Relación molar Ca/P de las muestras.....	57

Tabla 4.7 Análisis BET del área superficial de la muestra M ₄	58
Tabla 4.8 Composición porcentual de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de envejecimientos T ₀ , T ₁ , T ₂ y T ₃	59
Tabla 4.9 Relación molar Ca/P, para cada muestra.....	60
Tabla 4.10 Análisis semicuantitativo de EDS de la muestra T ₀	72
Tabla 4.11 Análisis semicuantitativo EDS de la muestra T ₁	76
Tabla 4.12 Análisis semicuantitativo EDS de la muestra T ₂	78
Tabla 4.13 Análisis semicuantitativo EDS de la muestra T ₃	81
Tabla 4.14 Resultados del análisis BET para las diferentes muestras.....	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Consistencia mecánica de varios biomateriales.....	9
Figura 2.2 Compuestos de fosfatos de calcio, obtenidos por neutralización del ácido fosfórico.....	16
Figura 3.1 Flujograma de la metodología experimental del trabajo.....	31
Figura 3.2 Diagrama de flujo de la síntesis sol-gel de fosfatos de calcio.....	35
Figura 4.1 Difractogramas (DRX) para muestras M1, M2, M3 y M4.....	39
Figura 4.2 Espectro IR de las muestras calcinadas a 800°C, (a) M ₁ , (b) M ₂ , (c) M ₃ y (d) M ₄	42- 43
Figura 4.3 Micrografía (MEB) del polvo del método I, en dos aumentos (a) 500X (b) 30000X.....	44
Figura 4.4 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método I, en dos regiones (a) región A (b) región B.....	45
Figure 4.5 Micrografía (MEB) del polvo del método II, partículas en la forma de varillas en dos aumentos (a) 4000X y (b) 30000X, partículas en forma de plaquetas en dos aumentos (c) 4000X y (d) 30000X.....	47
Figura 4.6 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método II, en dos regiones (a) región A (b) región B.....	48
Figure 4.7 Micrografía del polvo del método III en dos aumentos, partículas en forma de varillas (a) 4000X y (b) 30000X, partículas en forma de plaquetas (c) 2000X y (d) 30000X.....	51
Figura 4.8 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método III, en dos regiones (a) región A (b) región B.....	52
Figure 4.9 Micrografía (MEB) del método IV en dos aumentos, (a) 4000X (b) 30000X.....	54
Figura 4.10 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método IV, en dos regiones (a) región A (b) región B.....	55
Figura 4.11 Difractograma de las muestras obtenidas para los diferentes tiempos de envejecimiento T ₁ , T ₂ , T ₃ y T ₄	65

Figura 4.12 Espectro IR de las muestras calcinadas a 800°C, (a) T1, (b) T2, (c) T3 y (d) T4.....	68-69
Figura 4.13 Micrografía (MEB) de la muestra T0, en dos aumentos (a) 500X (b) 50000X.....	70
Figura 4.14 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T ₀ , en dos regiones (a) región A (b) región B.....	71
Figura 4.15 Micrografía (MEB) de la muestra T ₁ , región A en dos aumentos (a) 500X, (b) 30000X y región B en dos aumentos (c) 5000X y (d) 30000X....	74
Figura 4.16 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T ₁ , en dos regiones (a) región A (b) región B.....	75
Figura 4.17 Micrografía (MEB) de la muestra T ₂ , en dos aumentos (a) 500X, (b) 30000.....	76
Figura 4.18 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T ₂ , en dos regiones (a) región A (b) región B.....	77
Figura 4.19. Micrografía (MEB) de la muestra T ₃ , en dos aumentos (a) 500X, (b) 30000X.....	79
Figura 4.20 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T ₃ , en dos regiones (a) región A (b) región B.....	80

1. INTRODUCCIÓN

Después de la segunda gran Guerra Mundial, con el acelerado avance del desarrollo de los materiales para aplicaciones médicas, mas y mas personas han mejorado su calidad de vida, lo que directamente ha influenciado de un modo general en la expectativa de vida de la población mundial.

Cada año es mayor el número de personas que mejoran su calidad de vida y en algunos casos han logrado sobrevivir gracias a los biomateriales.

El principal componente mineral del hueso humano (aproximadamente > 95%) es un compuesto de calcio y fosforo, denominado hidroxiapatita (Hap), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Muchos investigadores han demostrado sus propiedades biocompatibles y bioactivas, lo que la hace hoy día, uno de los biomateriales más estudiados y deseados para aplicaciones biomédicas [Ramakrishna et al., 2010; Chen et al., 2011; Salimi et al., 2012]. Sin embargo, existen reportes que indican que cerámicas cristalinas de Hap sinterizadas en ciertas condiciones de tiempo/temperatura presentaron mínima resorción en vivo, retrasando así la formación de hueso nuevo [Metsger et al., 1982; Schmitz et al., 1999; Joschek et al., 2000; Kamakura et al., 2002; Hing et al., 2004]. Esta es la razón por la que existen varios estudios sobre cerámicas de fosfato de calcio bifásicas para mejorar su biocompatibilidad, como Hap- β -TCP, debido a la mayor solubilidad de la fase β -TCP, la cual desaparece a medida que ocurre la formación del nuevo tejido óseo [Tang et al., 2003; Kwon et al., 2003].

Varios métodos de síntesis han sido estudiados para producir la fase Hap, así como fosfatos de calcio bi y trifásico, para aplicaciones médicas. Entre los mismos, se encuentran: el método por precipitación, que implica reacciones vía húmeda de una solución conteniendo los precursores de Ca^{2+} y PO_4^{3-} con control de temperatura y pH [Bezzi et al., 2003; Santos et al., 2005]; los métodos hidrotermales, de los

cuales se han reportado pobre control de la morfología [Yoshimura et al., 1994], sin embargo; cuando este método es asistido por surfactantes es posible la obtención de “nanorods” con morfología uniforme, a partir de un control simultáneo de la morfología y del tamaño de partícula [Yan et al., 2001]. Además, nanofibras de Hap han sido obtenidas usando adecuados surfactantes en condiciones ambientales [Liu et al., 2002] y Hap fue preparada usando una ruta de microemulsión [Koumoulidis et al., 2003; Guo et al., 2005; Guo, 2005].

El método sol-gel tiene ciertas ventajas que deben ser consideradas, como mezclado homogéneo molecular, baja temperatura de procesamiento, la capacidad para generar partículas de tamaño nanométrico y polvos nanocristalinos, además es prometedor por la simplicidad tecnológica del equipamiento usado, bajo costo de instalación, la posibilidad de preparar películas para recubrimiento de bajo costo (en cooperación con el INT, RJ-Brasil) y el hecho de permitir control preciso de la composición química de la película [Rigo, 1999; Hwang, 2000; H-W. Kim, 2004].

Por sus ventajas, el método sol-gel ha sido ampliamente estudiado. Varias rutas han sido propuestas dentro del proceso sol-gel, variando los diferentes parámetros que influyen en el producto final como: tipos de precursores, temperatura y tiempo de envejecimiento, velocidad de agitación durante la mezcla de los precursores, temperaturas de secado y calcinación, y el uso de modificadores orgánicos. Se ha observado la influencia de tales variantes sobre el tamaño de partículas y las fases presentes.

Todas las investigaciones se centran en mejorar las características de la fase apatita obtenida y diferentes resultados se han obtenido de acuerdo al cambio en la composición química y las condiciones de proceso [Milev et al., 2003; Bezzi et al., 2003; Kim et al., 2004; Santos et al., 2005; Bogdanoviciene et al., 2006].

En éste trabajo proponemos diferentes rutas para por el método sol-gel, capaces de llegar a las fases de fosfatos de calcio, de aplicación como biomaterial con el objetivo de lograr el desarrollo de una metodología capaz de preparar estas fases a gran escala y de manera reproducible, sin la necesidad de varios pasos de reflujo más rigurosas precauciones y manipulaciones cuidadosas que aseguren la completa

disolución de los precursores para generar la fase Hap luego del tratamiento térmico. Un enfoque similar fue propuesto con precursores baratos, pero con un considerable mayor costo de energía y tiempo de proceso [Kim et al., 2004].

Los objetivos generales de este trabajo son:

- Sintetizar químicamente por el método sol-gel fosfatos de calcio biocompatibles para aplicaciones biomédicas.
- Caracterizar los fosfatos de calcio obtenidos por las diferentes rutas sol-gel propuestas.
- Observar la reproducibilidad de la ruta propuesta para una síntesis a mayor escala y la influencia de la variación del tiempo de envejecimiento sobre las fases obtenidas.

La tesis está estructurada en cinco capítulos.

El capítulo 1 presenta el propósito y la relevancia de la investigación. Constituye una introducción de los antecedentes que justifican el desarrollo del trabajo. Se presentan además los objetivos del trabajo.

El capítulo 2 presenta la revisión bibliográfica con toda la información teórica y sugerencias sobre el problema en estudio, que existe hasta la actualidad en la literatura y sustenta teóricamente el trabajo de investigación.

El capítulo 3 describe la metodología empleada para el desarrollo experimental de la tesis, describe los materiales y equipos, la ruta de síntesis adoptada en cada método y las diferentes técnicas de caracterización de los materiales obtenidos.

En el capítulo 4 se presentan en forma de Tablas y Figuras los resultados obtenidos, y discuten los mismos para cada etapa del trabajo, pre-experimental y experimental.

Finalmente, luego de discutir e interpretar los resultados, el capítulo 5 presenta de forma lógica, clara y concisa las conclusiones y descubrimientos obtenidos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo presenta las generalidades sobre los biomateriales y su biocompatibilidad. Se exponen teorías de formación de distintas apatitas y sus propiedades. Se describen los diferentes métodos de síntesis de la hidroxiapatita desarrollados por otros autores. A continuación se presenta la selección de la información recopilada que sustenta teóricamente el estudio.

2.1 Biomateriales

Varias definiciones han sido propuestas para el término “Biomaterial”.

Por definición es una sustancia o combinación de sustancias (aparte de los fármacos), ya sea de origen natural o sintético, que se puede utilizar por cualquier periodo de tiempo, como un todo o como una parte del sistema que trata, aumentando, reemplazando cualquier tejido, órgano o función corporal [Williams, 1987].

Se definió luego, el término biomaterial como un material de origen natural o hecho por el hombre que es usado para dirigir, complementar o sustituir las funciones del tejido vivo del cuerpo humano [Black, 1992].

Una de las definiciones actualmente más utilizada es que, “un biomaterial puede ser cualquier material empleado en la fabricación de dispositivos para substituir una parte o una función del cuerpo de forma segura, confiable y económica y que sea fisiológicamente aceptable” [Park et al., 2007].

La historia relata acerca del uso de materiales en el cuerpo humano. Así desde los años 2000 a.C., los egipcios, hindúes, chinos y griegos usaban colmillos de elefantes

y de otros animales, así como; madera, oro, hierro y bronce, para remplazar dientes, crear piernas artificiales de madera, hilos de sutura, etc.

Los primeros reportes de aplicaciones clínicas de los biomateriales se tuvieron en la primera mitad del siglo XVIII, cuando Hallowell en 1759 unió los bordes de una arteria braquial desgarrada usando una clavija de madera trenzada con hilo [Wesolowski, 1963]. Desde ese entonces el uso de biomateriales en el cuerpo humano ha progresado mucho. Siendo muy empleados los materiales metálicos, poliméricos, cerámicos y más recientemente materiales compósitos.

Por ello, expertos en ciencias, ingeniería y medicina han unido esfuerzos, con el propósito de lograr mejores materiales para aplicaciones médica-odontológicas y además desarrollar técnicas especiales para la implantación de los dispositivos, teniendo hoy en día excelentes biomateriales empleados como implantes [Ramakrishna et al., 2010] y mejores procedimientos quirúrgicos, lo que también favorece el proceso de cicatrización del paciente.

2.2 Clasificación de los biomateriales

Una manera de clasificar a los biomateriales, según su estructura y propiedades, se detalla a continuación y se resume en la Tabla 2.1.

2.2.1 Biomateriales metálicos, como el acero inoxidable, aleaciones base-Co, Ti y sus aleaciones han sido ampliamente utilizados, desde principios del siglo XX, como sustitutos de tejidos duros. Sin embargo, como el módulo de elasticidad del acero y las aleaciones Co-Cr es diez veces mayor que el del hueso natural; por esto, se han presentado complicaciones debido a ciertas incompatibilidades mecánicas y estructurales entre el implante y el tejido duro. Para el Ti y sus aleaciones, sigue habiendo una falta de coincidencia de la consistencia mecánica del implante con el hueso natural [Murugan et al., 2005].

De acuerdo a la ley de Wolff, un fenómeno conocido como *stress shielding* tiene lugar cuando un implante más rígido es colocado dentro de un tejido duro. El hueso se somete a una tensión mecánica reducida, que conduce gradualmente a la resorción ósea.

La naturaleza bioinerte de este tipo de implantes limita la osteointegración debido a un enlace interfacial insuficiente entre el implante metálico y el tejido huésped. Para mejorar la osteointegración, implantes metálicos recubiertos de Hap, se han implementado en ortopedia [Ishizawa et al., 1995; Dhert, 1992; Driskell, 1994; Brendel et al., 1992; Russell et al., 1996; Chai et al., 1998; Ban et al., 1997].

2.2.2 Biomateriales cerámicos, típicamente son materiales inorgánicos y no metálicos, que son térmica y químicamente estables. Entre sus propiedades, de alta resistencia al desgaste, resistencia y durabilidad; tienen además la ventaja de ser biocompatibles, hemocompatibles, disponibles fácilmente, moldeables, estéril, no tóxico y no inmunogénico.

Así reciben el nombre de biocerámicas, por su empleo en aplicaciones médicas. De acuerdo a la respuesta del tejido, las biocerámicas pueden ser sub-clasificadas en tres tipos; (i) casi bioinerte (alúmina y zirconio); (ii) bio-activo (Hap y biovidrio) y (iii) bioresorbible (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

La Hap provoca una fuerte interacción interfacial con el tejido huésped, lo que se considera favorable como estímulo osteointegrativo, pero posee baja tenacidad y menor reabsorción. El TCP es muy utilizado como sustituto de tejidos duros por ser reabsorbible, sirviendo de estructura para el crecimiento del hueso nuevo mientras se reabsorbe, dejando atrás, sólo hueso nuevo hasta su completa reabsorción [Davis, 2003; Hench, 1991; Hench, 1982; Hench, 2002].

2.2.3 Biomateriales poliméricos, derivado de la palabra griega, polis: “muchas” y meros: “unidades”. Generalmente se dividen en dos categorías: biodegradables como el colágeno, gelatina, poli(ácido láctico) (PLA) y poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y no biodegradables como el poli(etileno) (PE), poli(etileno tereftalato) (PET) y poli(metil metacrilato) (PMMA).

Son apreciados para aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, diseño flexible, superficie modificable, leve peso y naturaleza dúctil. Sin embargo los polímeros tienen baja resistencia mecánica comparada a los metales y cerámicas, lo que los hacen a menudo ideales para reconstrucción de tejidos blandos.

En ingeniería de tejidos, en aplicaciones como *scaffolds* (estructura sólida porosa, matriz o andamio), muchas veces se prefieren los polímeros biodegradables, sean naturales o sintéticos a los no biodegradables, atendiendo siempre a que los productos de la degradación sean no tóxicos y no produzcan ninguna reacción adversa al cuerpo extraño [Buchko et al., 2001; Zong et al., 2002].

2.2.4 Biomateriales compósitos, pueden ser definidos como una combinación heterogénea de dos o más materiales, diferentes en morfología o composición. Desde este punto de vista, es posible manipular las propiedades mecánicas y otras propiedades estructurales. Así, por ejemplo, compósitos de Hap-polímero poseen módulo de elasticidad cercano al valor del hueso y es mecánicamente más confiable, que su constituyente monolítico.

Es bien conocido que compósitos implantados dentro del cuerpo humano suelen provocar respuesta bioquímica y/o biológica del tejido huésped. De este modo, los biomateriales compósitos pueden ser sub-clasificados en tres tipos: (i) casi bioinertes (biometales alúmina-recubierta, carbono/carbono, y carbono/PEEK); (ii) bioactivos (Hap/colágeno, Hap/PE, y Hap/Ti-6Al-4V) y (iii) reabsorbibles (TCP/colágeno, TCP/PLA, y TCP/PCL) [Sousa et al., 2003; Di Silvio et al., 2002; Peluso et al., 1991; Choueka et al., 1995; TenHuisen et al., 1995].

2.2.5 Nanobiomateriales, una nueva generación de los biomateriales. Son biomateriales compuestos de una unidad estructural básica menor que 100 nm (nanoestructurado), sólidos cristalinos con tamaño de grano menor que 100 nm (nanocristales), polvos ultrafinos con un tamaño de partícula menor que 100 nm (nanopolvos), y fibras extremadamente pequeñas con un diámetro menor que 100 nm (nanofibras). Algunos ejemplos son: Nano-Hap, nano-alumina, nanofibras de colágeno, nanofibras PLLA.

Tienen las ventajas de gran área superficial en relación al volumen, elevada reactividad superficial, fuerza de enlace en la interfaz célula-implante, mejora la resistencia mecánica. Entre sus desventajas podemos citar el pobre control sobre la uniformidad de tamaño. Sus principales áreas de aplicación, se encuentran en ortopedia, restauración dental, ingeniería de tejido y liberación de fármacos.

Tabla 2.1 Clasificación general de los biomateriales [Ramakrishna et al., 2010].

Biomateriales	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones	Ejemplos
Metales y aleaciones	Muy fuertes, resistentes y dúctiles	Denso, se pueden corroer, difícil de elaborar	Placas de hueso, clavos, tornillos, soporte de carga de implantes óseos, arco dental y soportes dentales	Titanio, acero inoxidable, Co-Cr y aleaciones Ti-6Al-4V
Cerámicas	Bioinerte Bioactivo Bioreabsorbible Elevada resistencia al desgaste, resistencia a la corrosión	Frágil, baja tenacidad, no elástico.	Articulaciones de cadera, rellenos de defectos óseos, revestimiento de los bioimplantes, aumento de la cresta alveolar, reconstrucción maxilofacial, ingeniería del tejido óseo, y liberación de fármacos.	Alúmina, Zirconio Hap, biovidrios TCP
Polímeros	Flexible, baja densidad, elástico, superficie modificable, grupos químicos funcionales	Baja rigidez, puede degradarse	<i>Scaffolds</i> de tejidos, tornillos para hueso, clavos, placas, articulaciones de cadera, base de prótesis dental, liberación de fármacos, implantes de mama, suturas, aumento de piel, vasos sanguíneos y las válvulas del corazón.	Colágeno, silicona, PLGA, y PE.

En la Figura 2.1, de manera a apreciar mejor las propiedades mecánicas de los diferentes tipos de biomateriales, se presenta una típica gráfica comparativa de tensión-deformación de varios biomateriales ampliamente usados.

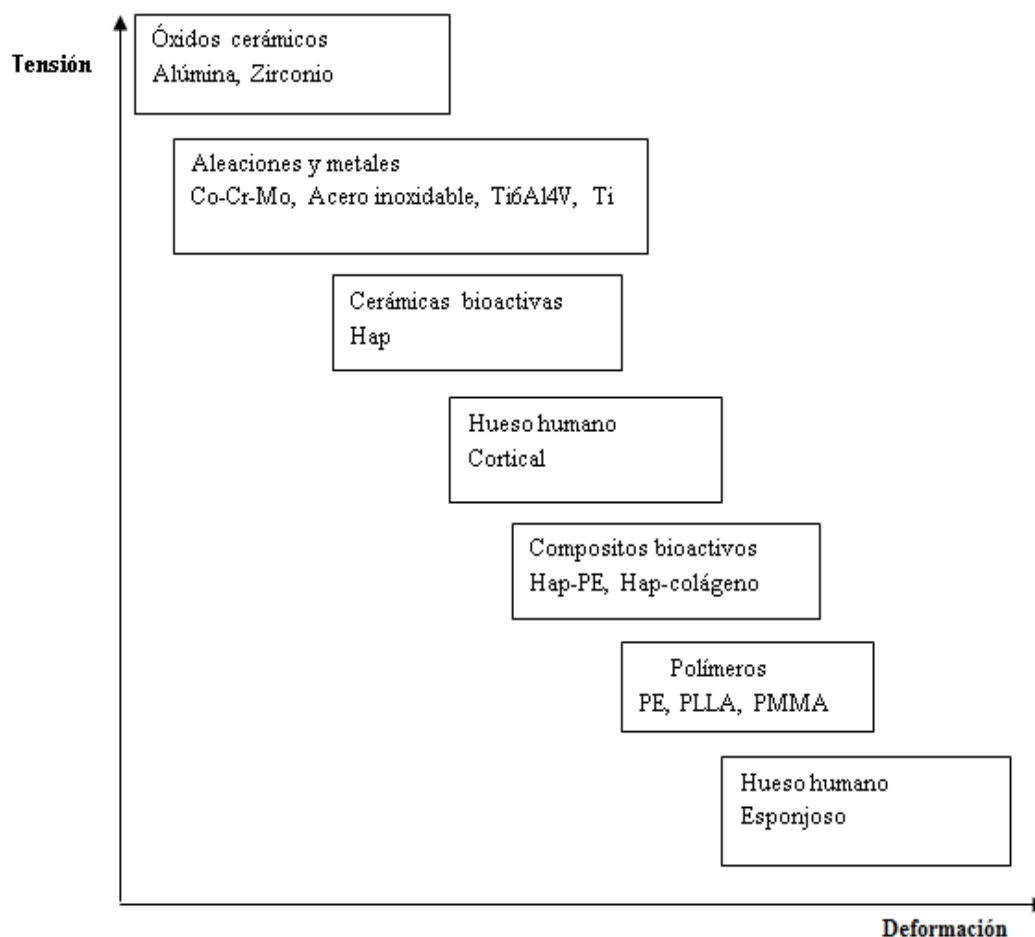


Figura 2.1 Consistencia mecánica de varios biomateriales [Murugan et al., 2005].

Estos datos son útiles para uso clínico, de manera a elegir el material correcto para una aplicación particular. En general, en la mayoría de los casos, para aplicaciones en tejidos duros son empleadas biomateriales cerámicos y metálicos, mientras que los polímeros son empleados para aplicaciones de biomateriales en tejidos blandos.

2.3 Características de los biomateriales

Los biomateriales se distinguen de los demás materiales gracias a algunas combinaciones de propiedades físicas, mecánicas, químicas y biológicas. Estas características, difieren de un material a otro, de acuerdo al tipo y aplicación del biomaterial. Así, los biomateriales deben satisfacer a ciertas características básicas, listadas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Características generales de los biomateriales [Ramakrishna et al., 2010].

Características	Observaciones Generales
Biocompatible	Biológicamente compatible, no deberá provocar ningún rechazo, inflamación sistémica o respuesta inmune del tejido huésped.
No tóxico	No deberá provocar toxicidad para los tejidos.
No inmunogénico	No deberá provocar una respuesta inmunogénica a los tejidos.
No corrosivo	No se debe corroer a pH fisiológico a la temperatura corporal.
Elevada área superficial	Para acomodar células de alta densidad
Superficie modificable	Para funcionalizar grupos químicos o biomolecular para mejorar la adherencia del tejido
Adecuada resistencia mecánica	Para resistir los estímulos <i>in vivo</i> .
Esterilizable	Para evitar contaminación tóxica

Aunque estas características son pre-requisitos comunes de un perfecto biomaterial, las mismas suelen variar dependiendo del método de síntesis, del tipo de material y de la aplicación.

En la actualidad, el desempeño de un biomaterial, se mide en función a dos características principales: la *biocompatibilidad*, es decir la capacidad de provocar una respuesta satisfactoria del tejido para una aplicación específica, una vez insertado en el cuerpo humano [Williams, 1987] y la *biofuncionalidad*, la capacidad de reunir ciertas características físicas y mecánicas, que lo hagan útil para la función requerida en el sitio implantado [Giannoudis, 2005].

De acuerdo a la respuesta biológica en el organismo, los materiales biocompatibles se pueden clasificar en bioinertes, biotolerables y bioactivos [Vallet-Regí, 1997].

Un material *bioinerte* no induce respuesta local del sistema inmunológico, es decir, no tiene la capacidad de interactuar con el tejido huésped, sea química o biológicamente. Mientras que un material *biotolerable* induce una respuesta mínima, siendo aceptada por el organismo receptor.

La respuesta típica del tejido óseo, se trata de un encapsulamiento del implante por una capa de tejido fibroso, siendo la espesura de ésta capa inversamente proporcional a la inercia del material. Podemos citar entre los materiales inertes empleados, las cerámicas de alúmina de alta densidad, polietileno de ultraalto peso molecular, aleaciones metálicas inoxidable basados en cobalto-cromo, vanadio y titanio y sus aleaciones [Hanawa, 1991].

Un material *bioactivo* permite una respuesta biológica específica en la interfase con el tejido vivo, posibilitando la formación de una ligación entre el tejido y el propio material [Hulbert et al., 1987]. El tejido es capaz de interactuar íntimamente con el material depositándose directamente sobre la superficie del mismo y sin la intervención de la capa de tejido fibroso. Los materiales bioactivos mejor conocidos son, los biovidrios, las vitrocerámicas bioactivas y las cerámicas basadas en fosfato de calcio como la hidroxiapatita (Hap) [Hench, 1991].

Un biomaterial puede además ser clasificado de acuerdo a la biocompatibilidad, en función a sus características:

2.3.1 Osteoconducción: los materiales bioinertes y bioactivos pueden permitir el crecimiento óseo en su superficie, es decir; debe poseer características deseables para el depósito de tejido óseo. La osteoconducción es un proceso por el cual el biomaterial se comporta como una estructura, sobre la cual se da el crecimiento óseo.

Es la capacidad para proveer soporte la formación de hueso nuevo por unión, proliferación y diferenciación de las células óseas [Sykaras et al., 2000, Fujiba y Ashi, 2004].

2.3.2 Osteoinducción: La osteoinducción es un mecanismo que estimula o promueve la formación ósea en el sitio del implante. Aunque la inducción ósea por biomateriales ha sido descrita por muchos grupos, su mecanismo permanece siendo objeto de controversia y no se sabe aún si es el biomaterial o la interacción del biomaterial con las proteínas corpóreas, el responsable por la inducción ósea.

Habibovic (2005) infirió que la composición química y la geometría del biomaterial, es fundamental para la formación y diferenciación de células osteoprogenitoras en células formadoras de hueso.

De igual manera, De Groot (1998) ha propuesto que las cerámicas de fosfatos de calcio pueden concentrar factores de crecimiento óseo de los fluidos corporales las cuales activan células madres para formar tejido óseo. Sin embargo, debido a que varias composiciones de biocerámicas han mostrado la formación de hueso ectópico, la osteoinducción al parecer no tiene mucha relación con la química del material.

Estudios recientes *in vivo* han demostrado que el biomaterial debe exhibir dos características para inducir la formación de hueso ectópico: (a) una superficie microporosa y (b) una estructura macroporosa [Habibovic et al., 2005; Yuan et al., 2001; Yuan et al., 2002; Le et al., 2005].

Otros autores afirman que la osteoinducción parece ser dependiente del animal; y hasta ahora, sólo ha sido observada en animales grandes como perros, babuinos, ovejas y cabras. Ripamonti (1996) postuló que la geometría del biomaterial es un parámetro crítico en la inducción ósea.

2.3.3 Osteointegración: En 1986 Bränemark definió la Osteointegración como "una conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante sometido a cargas funcionales".

Actualmente la definición más exacta hace referencia a un concepto mucho más clínico, que considera la osteointegración como "un proceso en el cual una fijación rígida de material aloplástico, clínicamente asintomática, es conseguida y mantenida en el hueso durante una carga funcional" [Zarb et al., 1991].

La osteointegración se consigue en un material bioinerte como es el caso del titanio. Para el desenvolvimiento de la osteointegración, deben ser consideradas tres estructuras, (a) la superficie ósea preexistente, (b) el tejido óseo neoformado en la interface implante-hueso y (c) la superficie del implante. Varios factores como el metabolismo del huésped, características químicas y topográficas de la superficie son importantes en la optimización de la osteointegración [Thelen et al., 2004].

2.4 Características fisicoquímicas de la Hap y sus fosfatos de calcio relacionados

Las propiedades biológicas de los materiales basados en fosfatos de calcio (CaPs) en relación a su química y solubilidad son analizadas en este capítulo.

2.4.1 Propiedades y estructura de las cerámicas de fosfatos de calcio

Los fosfatos de calcio, sintéticos y biológicos, poseen variada composición química, estructura cristalográfica y solubilidad en agua como se muestra en la Tabla 2.3.

Sin embargo, es posible distinguir entre estos CaPs, a través de la aplicación de métodos y técnicas de caracterización como, la espectroscopia infrarroja (IR) y la difracción de rayos X (DRX); ya que cada compuesto presenta un espectro IR o un patrón de DRX que es intrínseco y característico del mismo, como se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.3 Fosfatos de calcio: composición química, relación molar Ca/P, solubilidad, pH, rango de temperatura de estabilidad en soluciones acuosas [B. León et al., 2009].

Fosfato	Abreviación	Formula Química	Ca/P	Solubilidad -log(K _s) ^a	pH y T (°C) estabilidad
Fosfato monocalcio monohidratado	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0,5	1,14	0,1 - 2,0 25 °C
Fosfato monocalcio anhídrido	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,5	1,14	0,1 - 2,0 > 80 °C
Fosfato dicalcio dihidratado (Brushita)	DCPD	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1	6,59	2,0 - 5,5 25 °C
Fosfato dicalcio anhídrido (Monetita)	DCPA	CaHPO ₄	1	6,9	2,0 - 5,5 > 80 °C
Fosfato octacalcio	OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1,33	96,6	5,5 - 7,0 25 - 37 °C
Apatita deficiente en calcio	CDA	Ca _{10-x} [_{1-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-2x}] ^c (0<x<2)	1,33-1,66 (variable)	~85,1	6,5 - 9,5 25 - 37 °C
Fosfato de calcio amorfo	ACP	Ca _x (HPO ₄) _y (PO ₄) _z ·n(H ₂ O) n = 3,0 - 4,5; 15 - 20 wt% H ₂ O	1,2 - 2,2 (variable)	25,7 - 32,7	5 - 12 4 - 37 °C
β-Tricalcio fosfato	β-TCP	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	28,9	b
α-Tricalcio fosfato	α-TCP	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5	b
Fosfato de calcio bifásico	BCP	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂ + Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,55 - 1,65	ND	b
Hidroxiapatita	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	116,8	9,5 - 12,0 > 80 °C
Fluoroapatita	FA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	1,67	120	7 - 12 > 80 °C
Tetracalcio Fosfato	TTCP	Ca ₄ (PO ₄) ₂ ^o	2	38 - 44	b
ND, no determinado					
^a La solubilidad a 25 °C en agua, está dada por el logaritmo del producto iónico de las fórmulas dadas con concentraciones en mol/L.					
^b Estos compuestos no pueden ser precipitados de soluciones acuosas y se forman sólo a elevadas temperaturas (β-TCP > 800 °C, α-TCP > 1125 °C en agua.					
^c [] Representa una laguna en la red cristalina de la hidroxiapatita.					

Tabla 2.4 Principales bandas de vibración IR y líneas de DRX de algunos compuestos de fosfatos de calcio relevantes [B. León et al., 2009].

Compuesto	Fórmula química	Picos IR		Líneas de DRX	
		ν (cm ⁻¹)	Asignar	2 θ (°) ^a	Intensidad (%)
DCPD	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	3542	H ₂ O	11,681	100
		3490	Intracristal	20,935	100
		1132	HPO ₄	29,258	75
		1060		30,506	50
		984		34,156	50
		525		34,426	30
OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1105	HPO ₄ , PO ₄	4,722	100
		1070		9,441	15
		1031		25,872	17
		954		26,002	20
		603		31,555	33
		530		31,704	32
β -TCP	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1120	PO ₄	17,005	20
		1043		25,803	25
		970		27,769	55
		943		31,027	100
		606		34,372	65
		551		52,946	25
HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	3562	OH	25,879	40
		1081		31,774	100
		1030	OH	32,197	60
		954	PO ₄	32,902	60
		631		34,049	25
		601		46,713	30
		570		49,469	40
IR, Infrarrojo; DRX, difracción de rayos X; DCPD, Dicalcio fosfato dihidratado (brushita);					
OCP, Octacalcio fosfato; β -TCP, β -Tricalcio fosfato; HA, Hidroxiapatita.					
^a Datos de DRX de JCPDS, fichas: 9-007 (DCPD), 26-1056 (OCP); 9-0169 (β -TCP), 9-0432 (HA).					
Valores 2 θ , son dados para una fuente Cu K α de rayos X (λ = 1,54060 Å).					

Es posible precipitar varias fases de CaPs, dependiendo de las condiciones experimentales en que tiene lugar la reacción. Parámetros como, el pH y la temperatura, son determinantes en la obtención de las fases de CaPs ácidas, básicas o hidratadas. En la Figura 2.2, se observan las posibles fases precipitadas variando algunos parámetros (pH, relación Ca/P) de la reacción. La solubilidad del fosfato de calcio disminuye drásticamente de izquierda a derecha, siendo la Hap la fase más estable e insoluble.

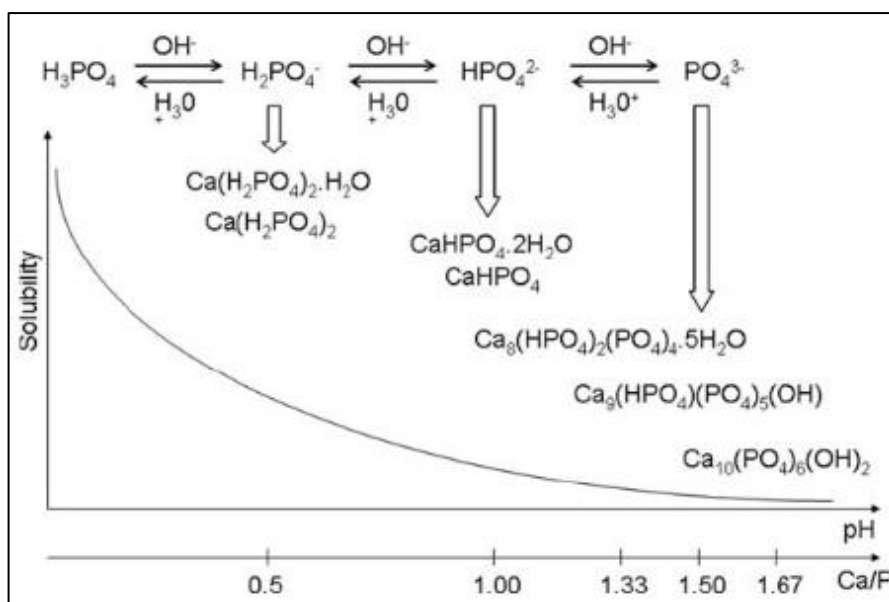


Figura 2.2 Compuestos de fosfatos de calcio, obtenidos por neutralización del ácido fosfórico [B. León, et al., 2009].

En la familia de los fosfatos de calcio, el fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) es el compuesto más ácido y más soluble en agua. El mismo precipita a partir de soluciones altamente ácidas. A temperaturas superiores a 80°C y en condiciones ácidas, precipita su fase anhidra (MCPA).

El fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) puede ser precipitado a partir de soluciones acuosas a $\text{pH} \sim 4 - 5,5$ y a temperatura ambiente. A temperaturas superiores a 80°C y en condiciones ácidas, precipita su fase anhidra (DCPA).

La fase apatita deficiente en calcio (CDA), fue sintetizada por hidrólisis del DCPD [J.C. Elliot, 1994].

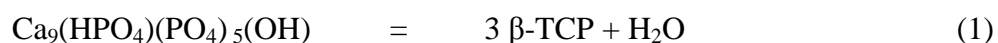
El fosfato octacálcico (OCP) es a menudo encontrado como un compuesto intermedio durante la precipitación de la fase termodinámica más estable CDA.

Heughebaert y Montel (1994) sintetizaron apatita deficiente en calcio mezclando una sal de calcio con otra sal de fosfato en medio básico, pH ~ 11 tamponado con NH₄OH.

Además, CDAs de composiciones variadas pueden ser precipitadas a partir de soluciones acuosas. Dependiendo de la composición, la apatita deficiente en calcio es descompuesta entre las temperaturas de 800 y 1000°C, formando Hap y β-TCP.

Así a elevadas temperaturas, CDA con relación Ca/P de 1,58 conduce a una mezcla de Hap y β-TCP en una proporción de 60:40, llamada fosfato de calcio bifásico (BCP).

Por el calentamiento a temperaturas entre 800 y 1000°C de la CDA con una composición particular observada abajo, se conduce a la fase β-TCP pura de acuerdo a la siguiente reacción;



Los fosfatos de calcio amorfos (ACP), son a menudo encontrados como una fase de transición durante la precipitación de otros CaPs en soluciones acuosas.

La formación de ACP es favorecida mezclando rápidamente soluciones muy concentradas de calcio y fosfato a elevado pH y baja temperatura. La forma ACP al inicio de la precipitación es favorecida debido a su menor energía superficial que el OCP y que la Hap.

La ACP cristaliza en CDA por hidrólisis interna y posterior disolución-reprecipitación. Esta conversión a CDA es retrasada por la presencia de inhibidores

del crecimiento cristalino, como magnesio, pirofosfato o carbonato [E.D. Eanes et al., 1965].

El fosfato tricálcico (TCP) no puede ser precipitado a partir de soluciones acuosas. El β -TCP puede ser preparado solamente calentando CDA a una temperatura superior a 800°C o por reacciones en el estado sólido. A temperaturas superiores a 1125°C , se transforma en la fase α -TCP.

Aunque ambas fases del TCP tengan exactamente la misma composición química, ambos compuestos difieren en la estructura del cristal. Así, la fase β -TCP es menos soluble en agua que la fase α -TCP, que es más reactiva en solución acuosa. En contacto con agua o fluidos del cuerpo, la fase α -TCP se hidroliza rápidamente y reprecipita como CDA.

Luego de la fluoroapatita (FA), la Hap estequiométrica es la segunda fase más estable y menos soluble entre los CaPs.

La estructura cristalográfica de la Hap es hexagonal en el grupo espacial $P6_3/m$ [W.E. Brown, 1962]. La estructura contiene túneles donde los iones hidroxilo (OH) están localizados.

La preparación de Hap pura a partir de soluciones acuosas es difícil, debido a las numerosas sustituciones iónicas y la posible existencia de lagunas en la red cristalina. Se ha reportado su precipitación por adición lenta de una solución de fosfato a una solución de calcio y reflujo a 100°C por una hora. Luego de la filtración, el precipitado es lavado, secado y calcinado a una temperatura entre 800 - 1000°C [J.C. Elliot, 1994; H. Yamasaki et al., 1992].

El fosfato tetracálcico (TTCP) no puede ser precipitado a partir de soluciones acuosas. Solo puede ser preparado por reacción en el estado sólido a temperaturas superiores a 1300°C . El TTCP es hidrolizado rápidamente a Hap e $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

En los sistemas biológicos, los fosfatos de calcio (CaPs) nunca aparecen con tales características y propiedades presentes en los compuestos sintéticos. En el esqueleto, el CaP está presente principalmente en la forma pobremente cristalizada de apatita deficiente en calcio. Como la red de Hap puede acomodar varios iones, el hueso

mineral contiene trazas de otros elementos, como Mg, Na, Zn, CO₃ [R.Z. LeGeros, 1991]. Por esta razón resulta imposible la definición de una fórmula química precisa para el mineral del hueso.

2.4.2 Disolución y formación de cristales de fosfato de calcio.

La composición química y las propiedades del cristal afectan directamente a la solubilidad de los fosfatos de calcio. En la Tabla 2.3 hemos visto diferentes constantes del producto de solubilidad (Ks) para los diferentes compuestos sintetizados de CaP.

La solubilidad se ve afectada por la sustitución catiónica o aniónica en la red cristalina de la apatita. Por ejemplo, la Hap carbonatada o apatitas deficientes en calcio son más solubles que la fluoroapatita (FA) a pH biológico.

Se ha encontrado que en soluciones fisiológicas, el β -TCP se disuelve más rápidamente que la Hap; además de exhibir una mayor velocidad de disolución o degradación que la Hap, tras la implantación en los sitios heterotópicos o ectópicos. La Hap es la fase más estable bajo condiciones fisiológicas y tiene la cinética más baja de resorción y solubilización en el cuerpo humano, por lo que implantes cerámicos de Hap pura sinterizada están presentes por muchos años en defectos óseos luego de la implantación [Driessens, 1982, De Groot, 1983, LeGeros, 1991, Elliot, 1994].

Las cerámicas de Hap son consideradas no resorbibles, mientras que la de β -TCP es resorbible, basado en la cantidad de implante que queda en el sitio del implante, en función al tiempo. Las cerámicas de Hap, β -TCP y BCP son consideradas materiales bioactivos. Se disuelven en parte en los fluidos del cuerpo y precipitan sobre su superficie en forma de apatita biológica, lo que favorece la añadidura del tejido óseo [Daculsi et al., 1983; Daculsi et al., 1990].

Las cerámicas BCP son preferidas para aplicaciones como sustitutos óseos, ya que dependiendo de sus relaciones de peso Hap/ β -TCP, su solubilidad se acerca más a la de la Hap, o a la del β -TCP. Las cerámicas BCP compuestas de las fases Hap (casi insoluble) y β -TCP (soluble), comprometen la disolución, mientras que proveen de

un sustrato para la deposición de apatita biológica. La cantidad de microcristales de apatita asociados a los granos grandes de cerámicas, parecen estar directamente relacionadas a la relación Hap/ β -TCP de las cerámicas BCP implantadas. Una gran cantidad de β -TCP da una mayor cantidad de cristales de apatita precipitada [Daculsi et al., 1983].

Proteínas y factores de crecimientos son incorporadas a la superficie precipitada, lo que luego promueve la adhesión y función celular. Se cree que las células osteoblásticas son atraídas a esta superficie y producen la matriz ósea extracelular (ECM), que conduce a la añadidura ósea (osteoconducción) en lugar de la encapsulación de la cerámica por tejido fibroso [León et al., 2009].

Otros factores importantes que afectan la solubilidad de los CaPs son: la porosidad y el tamaño de partícula, pues aumentando la porosidad se mejora enormemente la superficie de contacto con los fluidos y esto conduce a una mayor velocidad de disolución. De igual manera, cerámicas de CaPs, con macroporos bien interconectados, permiten la percolación de fluidos, células y tejidos en el interior de su estructura [Li et al., 2002, Li et al., 2003].

2.5 Preparación de las cerámicas de fosfatos de calcio

Hasta la actualidad, varios métodos han sido propuestos para sintetizar las cerámicas de fosfato de calcio. En general podemos agruparlos en dos:

2.5.1 Métodos secos

Se caracteriza por el empleo de reacciones en el estado sólido [Aoki, 1994].

La sinterización es una técnica de tratamiento térmico que implica la transición de un polvo muy fino (partículas de tamaño $\leq 1\mu\text{m}$), a un sólido denso o poroso. Es el resultado del movimiento atómico estimulado por temperaturas muy altas, en el cual los procesos de difusión generalmente son dominantes [Randall, 1991].

Algunos CaPs sólo pueden obtenerse a partir de reacciones en el estado sólido a elevadas temperaturas. En la Tabla 2.5, se da una lista de los CaPs que pueden ser preparados por reacciones en el estado sólido [De Groot, 1983].

Tabla 2.5 Fosfatos de calcio, que pueden ser obtenidos a partir de reacciones en el estado sólido [De Groot, 1983].

Compuesto	Ca/P	Fórmula	Abreviatura
α -Tricalcio fosfato	1,5	α -Ca ₃ (PO ₄)	α -TCP
β -Tricalcio fosfato	1,5	β -Ca ₃ (PO ₄)	β -TCP
Hidroxiapatita sinterizada	1,67	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	SHA
Tetracalcio fosfato	2	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	TTCP

La técnica más común para producir CaPs es sinterizando fosfatos de calcio no estequiométricos a temperaturas mayores a 700°C [Caroline et al., 2002]. Frecuentemente la sinterización es realizada a temperaturas superiores a 1000°C [Kivrak et al., 1998, Kwon et al., 2003, Gibson et al., 2000, Lin et al., 2004, Petrov et al., 2001, Maciejewski et al., 2008, Zyman et al., 2008].

Así, Hap puede ser preparada por la siguiente reacción a 1000-1300°C;



Otra ruta común de síntesis de CaPs es la descomposición térmica de la apatita deficiente en calcio, según la siguiente reacción, para $x = 0,5$ (ver fórmula química de CDA, Tabla 2.3).



Se observa como producto de esta reacción la fase BCP, compuesta de Hap y TCP (comúnmente β -TCP) [Dorozhkina et al., 2002, Dorozhkin, 2003].

Otros autores han obtenido sólidos microporosos (diámetro < 5µm) y macroporosos (diámetro > 100µm) de BCP, sinterizando a 1200-1300°C por varias horas; polvos de la estequiometría requerida ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para la apatita y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ para el TCP) y obtenidos tanto sintéticamente en laboratorio como comprados comercialmente [De Groot, 1980].

2.5.2 Métodos húmedos

Son disponibles para la producción en masa de polvos cristalinos pequeños o nanocristales de CaPs. Dos típicos procesos del método húmedo son: una reacción de neutralización de soluciones ácidas y alcalinas; y otra, que implica la reacción entre sales de fosfato y sales de calcio [Aoki, 1994].

2.5.2.1 Método por precipitación

Implica reacciones vía húmeda de una solución conteniendo iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el cual se tiene un estricto control del pH y de la temperatura [Bezzi et al., 2003; Santos et al., 2005]. De acuerdo a las constantes de solubilidad (Tabla 2.3), sólo se pueden obtener por precipitación un número limitado de fosfatos de calcio en determinadas condiciones. En la Tabla 2.6, se resumen los sólidos cristalinos, posibles de obtener por precipitación a temperatura ambiente o corporal ($T = 37^\circ\text{C}$) así como los intervalos de pH de estabilidad [De Groot, 1983, Driessens et al., 1995, Driessens, 1995].

Tabla 2.6 Compuestos cristalinos precipitados a temperatura ambiente o corporal y rango de estabilidad de pH en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$.

Fórmula	Ca/P	Compuesto	pH
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	MCPM	0,0 - 2,0
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	DCPD	2,0 - 6,0
$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	OCP	5,5 - 7,0
$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1,5	CDHA	6,5 - 8,5
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	PHA	9,5 - 12

Dependiendo de la relación molar calcio/fósforo del precipitado inicial determinado por las condiciones de precipitación (relación molar Ca/P y pH del medio de reacción), luego de la sinterización a 1250°C, cerámicas monofásicas, bifásicas y trifásicas constituidas de Hap, β -TCP, α -TCP y CaO fueron obtenidas [Slósarcsyk, 1996].

2.5.2.2 Método sol-gel:

La distinción entre sol y gel puede ser resumida como sigue: un sol representa una suspensión o dispersión de partículas coloidales discretas, mientras que un gel representa un sólido coloidal o polimérico conteniendo un componente fluido, con una estructura de red interna, tal que ambos componentes sólido y fluido estén altamente dispersados.

La gelación a partir de las soluciones precursoras, puede proceder por dos rutas distintas para producir geles coloidales o poliméricos. En los geles coloidales, efectos electrolíticos o estéricos en la solución precursora o sol, domina la formación del gel; mientras que en los geles poliméricos, las velocidades relativas y extensiones de las reacciones química (incluyendo polimerización) son críticas.

Los geles poliméricos son casi exclusivamente hechos a partir de un alcóxido metálico, con fórmula general $M(OR)_n$, donde M es un ión metálico y R es un grupo alquil [Bradley et al., 1978]. Con adición de agua, el alcóxido metálico es hidrolizado fácilmente; y con el control apropiado de las reacciones de hidrólisis y condensación, la red de oxido polimerizado puede ser formado.

El éxito en la obtención de un gel polimérico, depende principalmente de un adecuado control de la velocidad relativa de hidrólisis y condensación. Varios parámetros de solución deben ser considerados para asegurar este control. Entre éstos, la relación molar agua/alcóxido es de mayor importancia. El contenido de agua en la solución afecta críticamente la velocidad de la hidrólisis relativa a la condensación, y afecta también la dilución de la solución. Ya que las reacciones de polimerización en muchos alcóxidos pueden ser catalizadas por ácidos o bases, la concentración del catalizador y el pH de la solución, son a menudo parámetros

importantes. Finalmente la temperatura afectará la velocidad relativa de las reacciones de hidrólisis y condensación [Zelinski et al., 1984].

Los geles coloidales son formados típicamente de soluciones de sales metálicas (cloruros, nitratos, sulfatos, etc.) y soles óxidos ó hidróxidos. El método más usado comúnmente implica el tratamiento apropiado de los soles coloidales. Si las condiciones son tales que las partículas coloidales se juntan lentamente, es posible que se forme un gel, pero la coagulación rápida irá acompañada por la formación de un precipitado.

En el proceso sol-gel, varios precursores moleculares simples constituidos por los elementos que formaran parte del producto final, son convertidas en partículas de tamaño nanométrico formando una suspensión coloidal. Estas partículas coloidales son ligadas entre sí en una estructura tridimensional y forman una red rígida llena de líquido (gel) con poros de dimensiones submicrométricas. Esta transformación a gel, puede iniciarse por varios caminos, pero el más conveniente y simple es mediante un cambio de pH de la solución de reacción. Los pasos del procesamiento para obtener materiales a partir del método sol-gel, incluyen: (i) mezcla, (ii) gelación, (iii) envejecimiento, (iv) secado, (v) deshidratación o estabilización química, y (vi) densificación [Ramakrishna et al., 1984].

El método sol-gel ha reportado ciertas ventajas, tales como: mezcla molecular homogénea, baja temperatura de procesamiento, la capacidad de generar partículas de tamaño nanométrico y polvos nanocristalinos, además es prometedor por la simplicidad tecnológica del equipamiento utilizado, bajo costo de instalación, la posibilidad de preparar películas de revestimientos de bajo costo y el hecho de permitir un control preciso de la composición química de la película [Rigo, 1999; Hwang, 2000; H-W. Kim, 2004].

Así, varias rutas de síntesis dentro del método sol-gel han sido propuestas. Se han estudiado diferentes tipos de precursores así como la influencia de la temperatura y del tiempo de envejecimiento, la velocidad de agitación durante el mezclado de los precursores, diferentes temperaturas de secado y calcinación, y el uso de modificadores orgánicos sobre el tamaño de partícula y las fases encontradas en los

diferentes productos finales obtenidos a partir de la variación de estos parámetros [Milev et al., 2003; Bezzi et al., 2003; Kim et al., 2004; Santos et al., 2005; Bogdanoviciene et al., 2006].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los procedimientos experimentales realizados en el presente trabajo, así como los materiales y equipos empleados en la síntesis y caracterización de las muestras. A continuación se detalla la metodología aplicada.

3.1 Materiales

La síntesis de los CaPs fue realizada en el Laboratorio de Bio y Materiales de la Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción-Paraguay.

Los reactivos, todos P.A., fueron utilizados sin más purificación. Nitrato de calcio tetra hidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Cicarelli, Título 99.0-103.0%], fosfato ácido de amonio [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Cicarelli], hidróxido de amonio [$\text{NH}_4(\text{OH})$; Biopack, Título 26%-30%] y sal disódica del ácido etilen di-amino tetra-acético [$\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$, Biopack, Título 99.1%] fueron empleados en este trabajo.

En la síntesis química se emplearon los siguientes equipos: Balanza analítica, agitador mecánico con calentador, pHmetro, campana, estufa, mufla, desecador.

3.2 Caracterización de las muestras

La caracterización de las muestras se realizó en los diferentes laboratorios (Laboratório de Tecnologia de Pós/LATEP, Laboratório de Catálise/LACAT, Laboratório de Corrosão e Proteção/LACOR, Centro de Caracterização em Nanotecnologia/CENANO) del Instituto Nacional de Tecnología (INT) de Río de Janeiro-Brasil. Se describen a continuación los fundamentos teóricos de las técnicas analíticas aplicadas, y las condiciones de las mismas.

3.2.1 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos-X corresponde una técnica de análisis no destructiva que emplea la intensidad difractada de un haz monocromático de rayos-X como función del ángulo incidente y de salida. La información puede ser derivada de la estructura cristalográfica, composición química, y propiedades físicas de los materiales. En adición, puede ser usado para cálculos preciso de los parámetros de red, tamaño del cristalito, orientación preferencial y tensiones residuales de red [León et al., 2009; H.P. Klug, 1974].

La técnica de difracción de rayos X fue aplicada para evaluar las fases presentes y la cristalinidad de las muestras obtenidas. Se empleó para tal fin, el “Difractómetro X” Pert Pro-Panalytical” usando una radiación $\text{CuK}\alpha$ generada a 40kV y 40mA, en el rango de $10^\circ < 2\theta < 90^\circ$ con una velocidad de escaneo de 2seg/paso, siendo el tamaño del paso igual a $0,05^\circ$.

3.2.2 Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia por infrarrojo (IR) es una técnica de análisis químico rápida y simple, basada en la interacción de la radiación electromagnética (luz infrarroja) con las moléculas de la materia [B. Smith, 1999].

Esta técnica es sensible a la presencia de grupos funcionales químicos en la muestra, por lo tanto permite la identificación de los fragmentos estructurales de las moléculas [León et al., 2009].

El análisis de espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) fue realizado mediante el “Magma – IR 560 Spectrometer E.S.P. – Nicolet”, para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras. El espectro fue registrado en la región de 4000 a 500 cm^{-1} con 4 cm^{-1} de resolución y un total de 32 escaneos.

La muestra fue preparada con una proporción de 1% en KBr, esto es 1mg de muestra en 99mg de KBr. El KBr se emplea como blanco, ya que el mismo no interfiere en la identificación de los grupos funcionales presentes en la muestra para la región de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.2.3 Microscopio electrónico de barrido (MEB) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Con el microscopio electrónico de barrido (MEB), un haz de electrones incidentes producidos por un cañón de electrones acelerados por un elevado voltaje y focalizados sobre la superficie de la muestra por una serie de lentes electromagnéticas, escanea la superficie de la muestra por medio de una serie de bobinas de deflexión sincronizadas con un tubo de rayos catódicos (CRT). Las señales producidas como resultado de la interacción del haz con la superficie de la muestra son colectadas por un detector apropiado, amplificado, mostrado sobre el CRT.

Cuando el haz de electrones penetra la muestra, algunos de los electrones interactúan con el núcleo de los átomos. Los electrones cargados negativamente son atraídos por el núcleo positivo; algunos de ellos en lugar de ser capturados por la “atracción gravitacional” del núcleo, lo rodean y son vueltos a dispersar sin disminuir su velocidad. Como todos los elementos tienen diferentes tamaño de núcleo, el número de estos electrones retrodispersos (BSEs) cambia con el número atómico; y en consecuencia una imagen con información composicional puede ser obtenida [León et al., 2009; Goodhew et al., 1988; Chapman, 1986].

La estructura morfológica del polvo sintetizado fue estudiada y evaluada por microscopía electrónica de barrido y energía dispersiva de rayos X (SEM-EDS), empleando el microscopio “FEI Inspect S” del CENANO/INT, operando a 20kV. Las muestras de polvo fueron recubiertas con oro mediante el metalizador EMITECH K550X operando a 25mA por 3 minutos.

3.2.4 Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (FRX/ED).

La espectrometría por fluorescencia de rayos-X es un método no destructivo utilizado para el análisis de la composición química de sólidos y líquidos. En esta técnica la muestra es irradiada por un haz intenso de rayos-X que causa la emisión de fluorescencia.

Cuando un fotón de rayos-X energético interactúa con un átomo, muchos fenómenos pueden ocurrir. Una interacción implica la transferencia de energía del fotón para un electrón del átomo (capa K o L), resultando en su expulsión. Para estabilizar al átomo, electrones de niveles de energías superiores caen inmediatamente dentro de las vacantes de las capas inferiores, liberando su exceso de energía por emisión de un fotón de rayos-X con una energía que es precisamente la diferencia de energía entre los dos niveles involucrados en cada transición electrónica y que es característica de cada átomo que compone la muestra.

Este fenómeno se denomina *fluorescencia*. Los elementos de la muestra son identificados por la longitud de onda de la fluorescencia emitida y las concentraciones por la intensidad de esas radiaciones. Los elementos comúnmente detectados están en el intervalo entre sodio y litio [León et al., 2009; González et al., 2002; Bertin, 1970; Muller, 1972; Tertian et al., 1971].

La determinación de la composición química del polvo obtenido fue realizada por espectrofotometría de fluorescencia de rayos-X por energía dispersiva, utilizando el espectrofotómetro “EDX 700 HS” de la marca Shimadzu.

3.2.5 Medida del área superficial y porosidad (BET)

La técnica consiste básicamente en medir la cantidad de gas inerte adsorbido, como nitrógeno, argón, kriptón o dióxido de carbono sobre la superficie de un sólido. Es una poderosa técnica comúnmente usada para caracterizar el área superficial, tamaño de partícula y estructura porosa de materiales nanoestructurados. La absorción del gas toma lugar bajo adecuadas condiciones de temperatura y presión, de manera a reducir la energía superficial debido a una fuerza de desequilibrio atractivo en átomos de la superficie, y la adsorción puede ser clasificada como adsorción física o quimisorción.

La isoterma de adsorción BET “*Brunauer, Emmett, Teller*” es usado frecuentemente para calcular el área superficial total de sólidos por adsorción física de las moléculas del gas, lo que implica la adsorción en monocapa de moléculas del gas nitrógeno sobre la superficie de las partículas y posterior calentamiento para vaporizar la

monocapa y medir la cantidad de nitrógeno adsorbido. El área superficial es entonces determinada a partir de mediciones de adsorción, asumiendo todas las partículas de forma esférica para una distribución unimodal, el área superficial puede ser fácilmente convertida a tamaño de partícula.

El área superficial específica de las muestras fue determinada por la técnica de análisis BET, el cual estima el área superficial de la muestra por adsorción de N_2 a 77K. El análisis fue conducido en el “Micromeritics ASAP 2020 Surface Area and Porosity Analyzer”. Las muestras fueron pre-tratadas en vacío a 320°C. El procedimiento fue identificado como, isoterma de adsorción a -195°C/Método Completo.

3.3 Metodología

La metodología de trabajo se identificó como experimental pura y consta de una fase pre-experimental y una fase experimental.

En la fase pre-experimental, el objetivo fue evaluar diferentes rutas dentro del método sol-gel, capaces de lograr las fases de fosfatos de calcio de importancia en aplicaciones biomédicas, sin la necesidad de varios pasos de reflujo, precauciones estrictas y manipulaciones cuidadosas para asegurar la completa disolución de los precursores. Un similar abordaje fue propuesto por Kim (2004), empleando precursores de bajo costo, pero con un consumo de energía considerablemente elevado y mayor tiempo de procesamiento.

La fase experimental implica la elección de un método propuesto en la fase pre-experimental para el estudio de la reproducibilidad del mismo a gran escala. Se observó además la influencia del tiempo de envejecimiento sobre las variables dependientes del proceso.

La Figura 3.1 esquematiza mediante un flujograma, las etapas desarrolladas en la metodología.

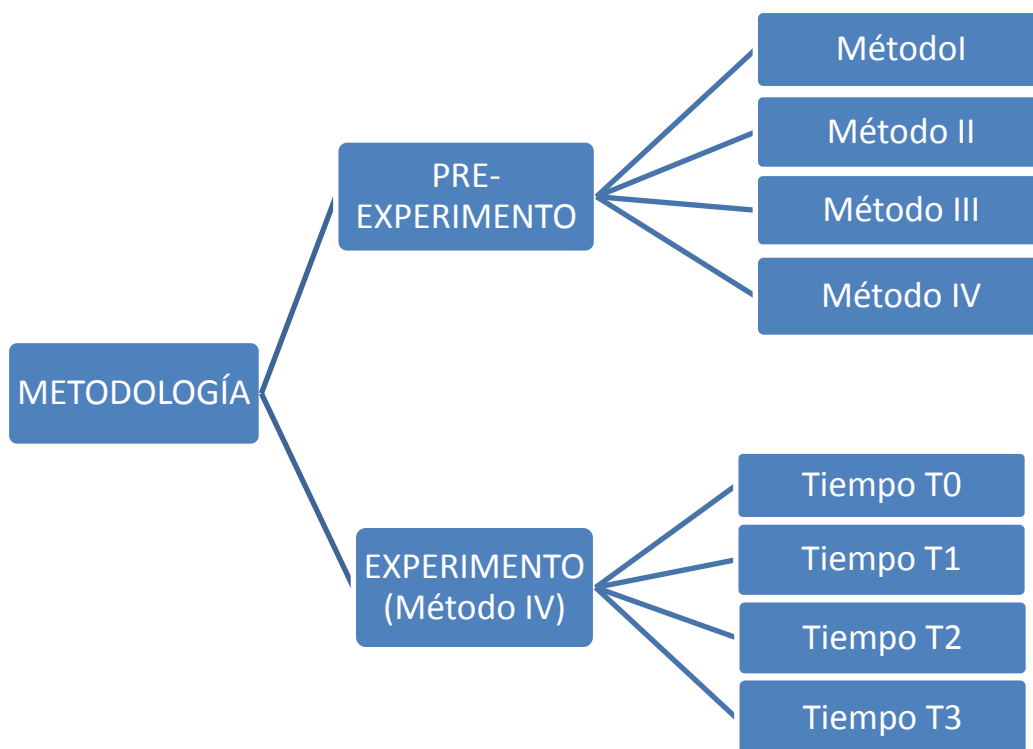


Figura 3.1 Flujograma de la metodología experimental del trabajo.

3.3.1 Parte pre-experimental

La fase pre-experimental consiste en un estudio exploratorio que tiene como objetivo probar 4 métodos de síntesis de fosfatos de calcio, de manera a inferir acerca de la eficiencia de tales métodos respecto a las fases obtenidas. Se sintetizaron 5g de producto por varias rutas dentro del proceso sol-gel y se analizaron los resultados obtenidos, en cuanto a las características (fases presentes, tamaño y morfología de las partículas) del material cerámico obtenido.

Para facilitar la identificación de las muestras de acuerdo a los métodos I, II, III ó IV ensayados; se identificaron como: M_1 , M_2 , M_3 y M_4 , respectivamente. Para el método I, no se consideró el proceso de disolución de los precursores o la velocidad de adición de la solución de los precursores [Kim et al., 2004]. En cambio, para los métodos II y III, estos factores fueron considerados, debido a que existen reportes

previos en la literatura, referentes a que la rápida adición de cualquiera de las soluciones precursoras sobre la otra puede dar lugar a precipitación [Kim et al., 2004]. La temperatura y tiempo de calcinación fueron escogidos de acuerdo al estudio realizado por Kapoor et al. (2011). El método IV consideró éstos factores además de introducir un modificador orgánico “EDTA.2Na”, como reactivo complejante de los cationes Ca^{2+} en el medio de reacción.

3.3.1.1 Descripción de las diferentes rutas de preparación del polvo

Método I: Los reactivos precursores de calcio y fósforo, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, respectivamente; se disolvieron en 210 mL de solución de amonio 0,569 N a temperatura ambiente, siguiendo la metodología de Bezzi et al. (2003), pero sin usar el agente complejante EDTA y urea en el medio de reacción, siendo el $\text{pH} > 9$ mantenido en la solución final. La mezcla fue continuamente agitada en el rango de temperatura de 80 a 100°C por dos horas.

Se realizó el secado de la muestra en estufa, siendo la velocidad de calentamiento aproximadamente de 4-5°C/min hasta 250°C, donde permaneció por una hora y fue luego llevada hasta 340°C con la misma velocidad. La pasta blanca gomosa obtenida luego del secado fue calcinada a 800°C por dos horas, con una velocidad de calentamiento aproximada de 13,33°C/min. Finalmente el polvo blanco obtenido fue almacenado en un desecador para su caracterización sin más tratamientos.

Método II: Para una relación molar de Ca/P igual a 1,67; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se disolvieron, a temperatura ambiente, por separado en agua formando dos soluciones precursoras. La mezcla de los precursores se realizó por goteo bajo constante agitación a temperatura ambiente. El pH fue ajustado a 9 con solución de amonio 0.5 N. El gel blanco obtenido fue envejecido a temperatura ambiente por 4 días.

El secado de la muestra se realizó en estufa a 200°C por una hora y cuarenta minutos. Posteriormente se calcinó a 800°C por dos horas, con una velocidad de calentamiento aproximada de 13,33°C/min.

Método III: Para una relación molar de Ca/P igual a 1,67; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se disolvieron, a temperatura ambiente, por separado en agua formando dos soluciones precursoras. La mezcla de los precursores se realizó por goteo bajo constante agitación a temperatura ambiente. El pH fue ajustado a 9 con solución de amonio 0.5 N. El gel blanco obtenido fue envejecido a temperatura ambiente por 3 días.

El secado de la muestra se realizó en estufa a 200°C por una hora y cuarenta minutos. Posteriormente se calcinó a 800°C por dos horas, con una velocidad de calentamiento aproximada de 13,33°C/min.

Método IV: Para una relación molar de Ca/P igual a 1,67; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se disolvieron, a temperatura ambiente, por separado en agua formando dos soluciones de precursores. Una solución de EDTA.2Na, 0.3 M fue preparada. El pH fue ajustado a 9 con solución de amonio 0.5 N. La formación del complejo se inició goteando la solución de nitrato sobre la solución de EDTA.2Na. La mezcla de los precursores fue conducida por goteo bajo agitación constante a temperatura ambiente. El gel blanco, fue envejecido a temperatura ambiente por un día.

El secado de la muestra se realizó en estufa a 200°C por una hora y cuarenta minutos. Posteriormente se calcinó a 800°C por dos horas, con una velocidad de calentamiento aproximada de 13,33°C/min.

3.3.1.2 Caracterización de las muestras

Los análisis practicados a todas las muestras M_1 , M_2 , M_3 y M_4 , fueron: FRX/ED, DRX, FTIR, MEB/EDS. El análisis BET se practicó sólo a la muestra M_4 , debido a que M_4 fue el método escogido para su posterior estudio en la parte experimental, y a limitaciones de tiempo para realizar el análisis a todas las demás muestras.

3.3.2 Parte experimental

En la fase experimental se elige una ruta de síntesis, basada en los resultados obtenidos en el pre-experimento y se hace variar el tiempo de envejecimiento con la intención de observar su influencia sobre las características del material sintetizado. Se analiza la reproducibilidad del método para la síntesis a mayor escala, igual a 30 g

de producto. Esta síntesis fue realizada para cuatro tiempos diferentes de envejecimientos, con el propósito de verificar la influencia del tiempo de envejecimiento en la composición final del producto obtenido.

Los métodos II y III obtuvieron fases biocompatibles como Hap y β -TCP. Sin embargo, la ruta de síntesis electa fue la del método IV, donde se identificaron las fases Hap y β -Rhenanite. De acuerdo a la bibliografía consultada [Jalota et al., 2006], éste biomaterial bifásico de Hap y β -Rhenanite puede actuar como sustituto óseo gracias a la mayor solubilidad de la fase β -Rhenanite y a la expectativa de un efecto estimulante osteinductivo en el cuerpo. Además, se elige este “método IV” para su estudio en la fase experimental, debido a la existencia de pocos datos relacionados a la obtención de ésta fase β -Rhenanite y por ser la primera vez que se sintetiza la misma por el método sol-gel con los precursores empleados en este trabajo y en presencia del reactivo quelante EDTA.2Na.

3.3.2.1 Descripción del experimento

La metodología seguida en esta fase experimental fue la misma del método IV, pero los cálculos fueron hechos para una cantidad mayor de 30g de producto por muestra. Se consideraron las mismas condiciones de síntesis del método IV y se empleó el modificar orgánico EDTA.2Na como reactivo complejante de los cationes Ca^{2+} . La Figura 3.2 esquematiza el procedimiento experimental empleado para la síntesis del fosfato de calcio bifásico del método IV.

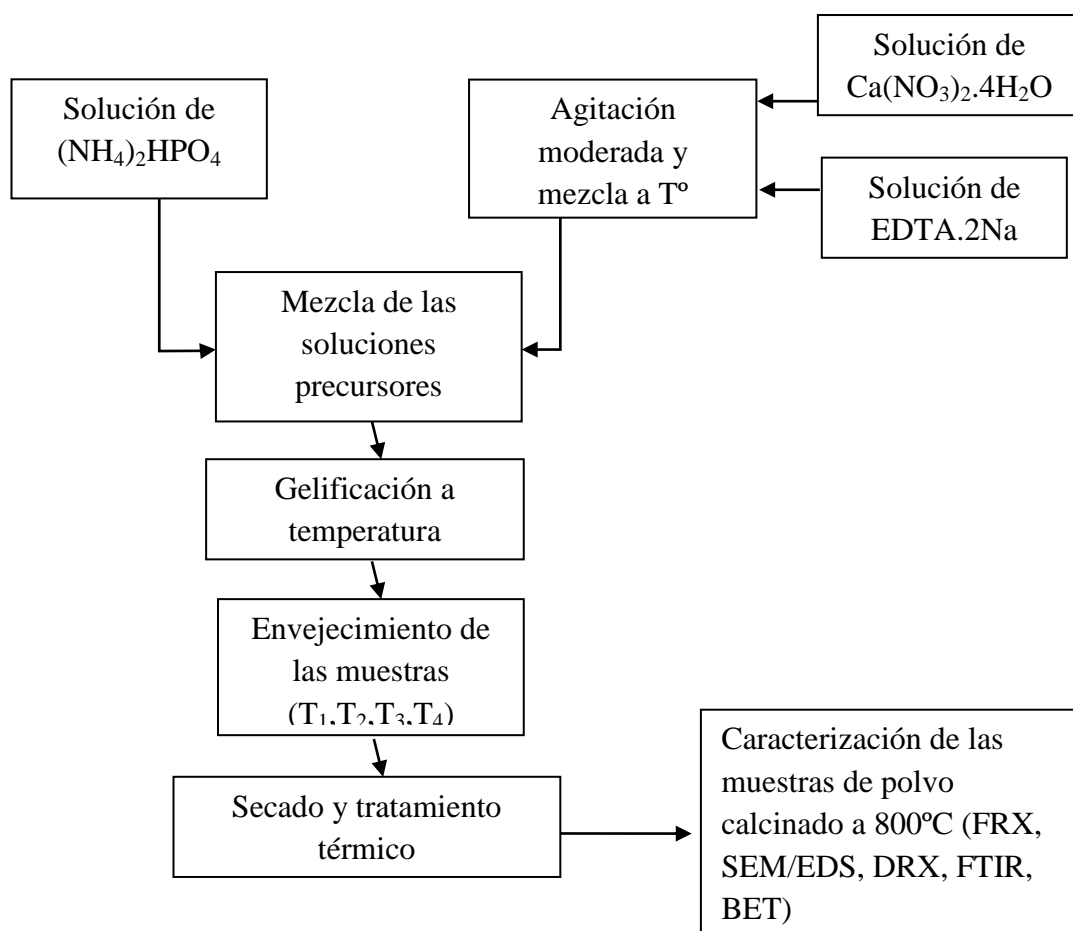


Figura 3.2 Diagrama de flujo de la síntesis sol-gel de fosfatos de calcio.

Para facilitar la identificación de las muestras, se nombró cada una como T_0, T_1, T_2 y T_3 , según sus respectivos tiempos de envejecimiento. En la Tabla 1, se especifican los tiempos de envejecimientos para cada muestra.

Tabla 3.1 Tiempos de envejecimientos para cada muestra.

Muestra	Tiempo de envejecimiento (hs)
T ₀	1
T ₁	12
T ₂	24
T ₃	48

3.3.2.2 Caracterización de las muestras

Todas las muestras T₁, T₂, T₃ y T₄, fueron caracterizadas según las siguientes técnicas: FRX/ED, DRX, FTIR, MEB/EDS, BET.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos en ambas fases del trabajo. Así, se divide el capítulo en dos partes: pre-experimental y experimental.

4.1 Pre-experimento

Una porción de muestra obtenida para cada método fue caracterizada finalmente para inferir sobre las ventajas o desventajas de cada método. Se presentan a continuación los resultados y discusión de los mismos para cada análisis realizado.

4.1.1 Difracción de rayos X (DRX)

El difractograma de la Figura 4.1 muestra los patrones de DRX de las muestras calcinadas a 800°C para 2θ de 20° a 60°. En el Anexo B se observa el mismo difractograma para 2θ de 10° a 90°.

En general diferentes fases se observan para cada método.

Para el método I, la muestra presenta la fase hidroxiapatita (Hap, ICDD N° 24-0033) y pequeños picos de la fase óxido de calcio (CaO, ICDD N° 01-077-2010). Un pico, en 2θ igual a 18° (ver Anexo B), podría suponer la presencia de la fase hidróxido de calcio (Ca(OH)₂, ICDD N° 04-0733). La fase CaO corresponde al producto de la descomposición del nitrato de calcio que no ha reaccionado. Sin embargo el Ca(OH)₂ se descompone a temperaturas mayores a 510°C en CaO, como la muestra fue calcinada a 800°C y teóricamente la transferencia de calor es homogénea dentro de la mufla para todos los puntos del sistema; la fase Ca(OH)₂ encontrada podría

atribuirse a un tiempo insuficiente para que la reacción de descomposición se completase. Similares fases fueron obtenidas por Bezzi et al. (2003); tal vez, debido a la similitud de ambos métodos.

De acuerdo a los padrones de DRX, en los métodos II y III se pudo identificar las fases presentes como Hap y β -tricalcio fosfato (β -TCP, ICDD N° 9-0169). Las correspondientes líneas de difracción son muy agudas, indicando la elevada cristalinidad de las dos fases y suponen que el tamaño del cristal obtenido es relativamente grande. Es bien conocido que este fosfato bifásico de calcio es solicitado como biomaterial debido a la mayor biodegradabilidad de la fase β -TCP [S. Dorozhkin, 2012; A. Soueidan et al., 1995; M. Benahmed et al., 1996]. Sin embargo, se propone para trabajos futuros, realizar un análisis cuantitativo de estas muestras, pues la aplicación del biomaterial está relacionada con la proporción de ambas fases presentes.

El método IV presenta picos intensos de la fase Hap, sin embargo algunos picos de la fase β -Renanita (β -NaCaPO₄, ICDD N° 29-1193) fueron identificados. Esta es la primera vez, para nuestros conocimientos; que se tiene un indicio de que la composición del EDTA.2Na afecta a las fases presentes en la muestra calcinada, formando una fase de fosfato de calcio y sodio.

Otros autores reportaron haber obtenido ésta fase β -Renanita como una débil interfaz, luego de someter polvo de Hap y vidrio bioactivo a altas presiones [Suchanek et al., 1998]. Sin embargo no podemos suponer que la fase β -Renanita (β -NaCaPO₄) fue formada durante el periodo de condensación y envejecimiento del gel o durante el proceso de tratamiento térmico. Para determinar esto, sería necesario un análisis de descomposición térmica (TGA) de la muestra seca sin calcinar.

Existen estudios *in vivo* que relatan acerca de la velocidad de biodegradación de los implantes conteniendo las fases β -Renanita, Hap and β -TCP [Ramselaar et al., 1991; Driessens et al., 1992; Ramselaar et al., 1993; Bermudez et al., 1994]. Recientemente ha sido demostrado que esta fase β -Renanita favorece la proliferación celular así como la expresión de marcadores osteogénicos inclusive a un nivel mayor que la fase β -TCP [Knabe et al., 2004]. Así, se tienen reportes de la obtención del biomaterial

bifásico Hap y β -Renanita, a través de un procedimiento de síntesis basado en disolución a un pH fisiológico y posterior calcinación [Jalota et al., 2004].

Para la muestra M_4 , el pico obtenido en 2θ igual a $12,7^\circ$ no pudo ser identificado (ver Anexo B) y el pico en 2θ igual a $29,36^\circ$ puede corresponder a una dislocación. Un solo pico, no es considerado representativo para inferir acerca de la presencia de alguna otra fase.

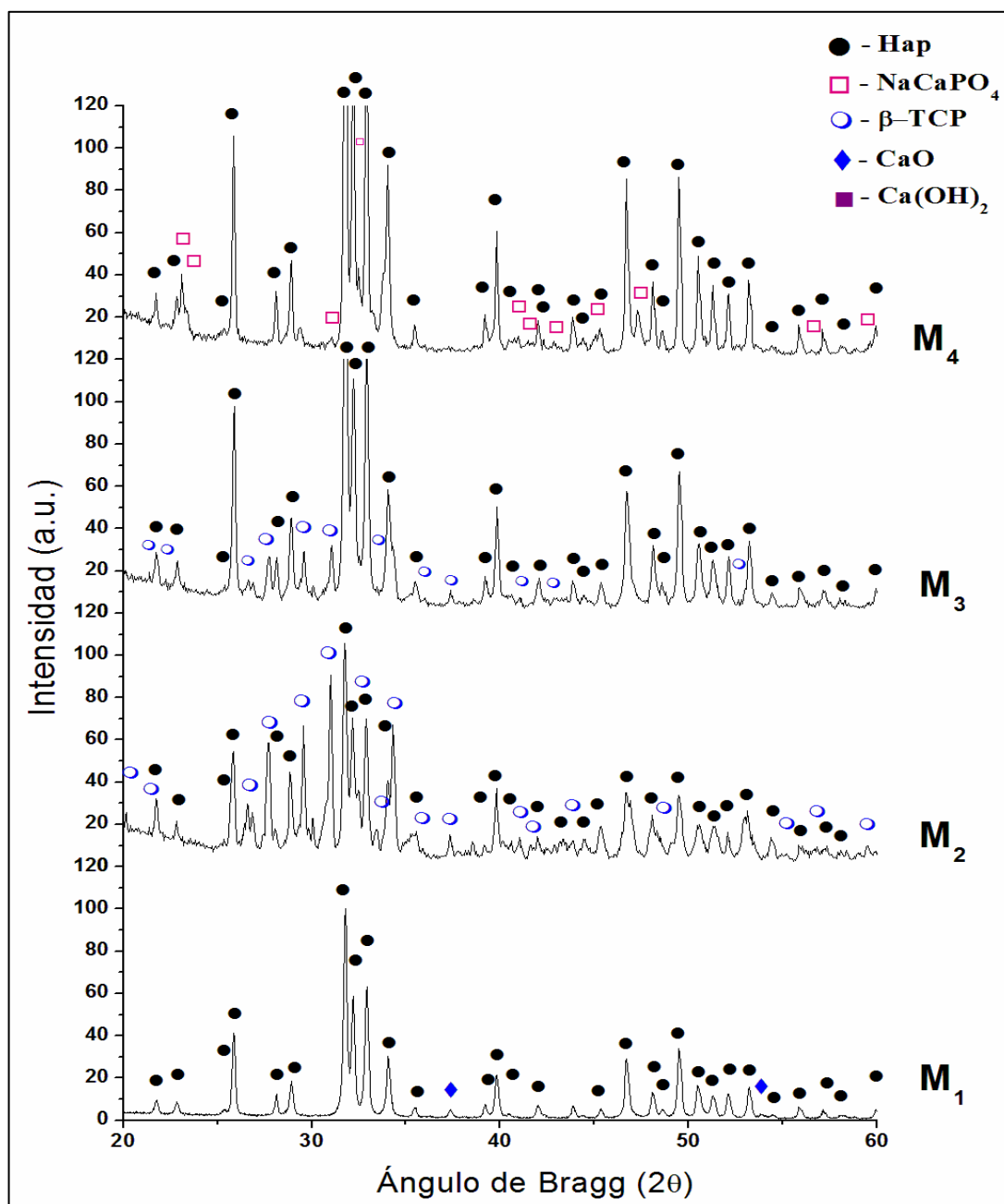


Figura 4.1 Difractogramas (DRX) para muestras M_1 , M_2 , M_3 y M_4 .

4.1.2 Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las muestras calcinadas M_1 , M_2 , M_3 y M_4 se muestran en la Figura 4.2. Los picos principales de absorción de IR pueden ser atribuidos a los siguientes grupos funcionales [Santos et al., 1995; Posset et al., 1998; Arias et al., 1998; Mayor et al., 1998].

Vibraciones características de grupos fosfatos se muestran como una banda ancha localizada entre 960 y 1050 cm^{-1} , correspondientes a deformación axial simétrica, con un hombro a 1087 cm^{-1} correspondiente a la deformación axial asimétrica. Dos picos bien definidos surgen alrededor de 565 y 601 cm^{-1} para el modo de deformación angular asimétrica.

El grupo hidroxilo (OH) presenta un modo de vibración que aparece alrededor de 634 cm^{-1} para el tipo deformación angular y en 3570 y 3580 cm^{-1} para el tipo axial [Choi et al., 2004; Weng et al., 1998; Agrawal et al., 2011].

Una banda ancha extendida en el rango de 2500 a 3700 cm^{-1} es observada. La misma se correspondería con vibraciones axiales de la molécula de agua (H_2O) y otro pequeño pico para 1620 cm^{-1} para el modo de deformación angular de la misma molécula. Esto podría ser debido al carácter higroscópico del cristal de Hap [Koutsopoulos S., 2002; Suresh et al., 2012].

Se observan picos adicionales correspondientes probablemente al grupo CO_3^{-2} , que aparecen de 1415 a 1462 y un pico pequeño a 875 cm^{-1} , para la Hap carbonatada tipo-B. Pero la banda del grupo CO_3^{-2} se extiende hasta 1550 cm^{-1} lo que podría indicar también la presencia de Hap carbonatada tipo-A [Koutsopoulos S., 2002; Krajewski et al., 2005]. Sin embargo la fase Hap carbonatada no fue identificada por la técnica de DRX, esto podría ser debido al solapamiento de sus picos con los de la fase Hap. En el Anexo D se presenta la ficha cristalográfica de la Hap-carbonatada $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3\text{OH})_6(\text{OH})_2)$, ICDD N° 4-0697).

Los iones carbonato sustituyen algunos de los iones fosfatos en la estructura de la Hap tipo-B y sustituyen los grupos OH^- en la Hap carbonatada tipo-A [LeGeros et

al., 1967; Bonel, 1972; Elliott, 1980]. Estos grupos carbonatos podrían formarse a partir de moléculas de CO_2 de la atmósfera [Wang et al., 2006].

La Hap carbonatada tipo-B es similar al mineral del hueso natural, debido a que el mineral óseo difiere en composición de la Hap estequiométrica y los iones carbonatos son los iones adicionales más abundantes. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la presencia de iones carbonato tipo-B en la estructura de la apatita aumentan la solubilidad de la misma [Krajewski et al., 2005].

Estudios de caracterización fisicoquímica de Hap comercial para aplicaciones como injerto óseo en implantes médico-dentales, producidos por cuatro diferentes fabricantes; han reportado la presencia del grupo carbonato en dichas muestras [Conz et al., 2005].

Polvos de Hap y fosfato de calcio bifásico conteniendo las fases de Hap y β -TCP, obtenidos por sol-gel y calcinados a temperaturas $\geq 600^\circ\text{C}$, han sido analizados por FTIR, arrojando presencia del grupo carbonato en las mismas [Salimi et al., 2012, Agrawal et al., 2011, Chen et al., 2011].

Se tienen referencias acerca de las temperaturas de descomposición del grupo carbonato para la Hap carbonatada. Estas temperaturas abarcan un rango de entre 400 a 1200°C , de acuerdo a resultados del análisis termogravimétricos (TG) [Krajewski et al., 2005]. De manera que hasta la máxima temperatura de tratamiento térmico alcanzada 800°C , la descomposición no es completa.

Un pico pequeño para 730 cm^{-1} fue observado en las muestras M_1 , M_2 y M_3 . El mismo, no fue identificado con los datos de literatura. Sin embargo, se ha mencionado que aparecen bandas correspondientes al grupo OH^- en $732,8\text{ cm}^{-1}$ para muestras de fosfatos de calcio conteniendo fases de pirofosfato de calcio y TCP en la muestra [Oliveira et al., 2009]. Un débil pico entre 760 y 720 cm^{-1} se ha identificado para el grupo HPO_4^{2-} en una muestra de Hap no sinterizada [Sumit et al., 2005].

Para la muestra M_4 , en el análisis del difractograma de DRX (Figura 4.1), se puede observar la presencia de la fase $\beta\text{-NaCaPO}_4$ cristalina junto a la fase de Hap. En la Figura 4.2 (d) se observa el espectro FTIR de la muestra M_4 . Este coincide con el

espectro de la fase β -NaCaPO₄ obtenido por Driessens et al. (1992). Las bandas correspondientes a deformaciones axiales observadas a 603, 962, 1020 y 1089 cm⁻¹ fueron aportados tanto por la β -NaCaPO₄ y la Hap [Jalota et al., 2006].

El grupo CO₃²⁻ fue aún mas pronunciado en la muestra M₄. Esto podría ser por la presencia de átomos de C y O en la molécula de EDTA.2Na que podrían haber reaccionado durante el proceso y formado CO₃²⁻. Además de las moléculas de CO₂ de la atmósfera.

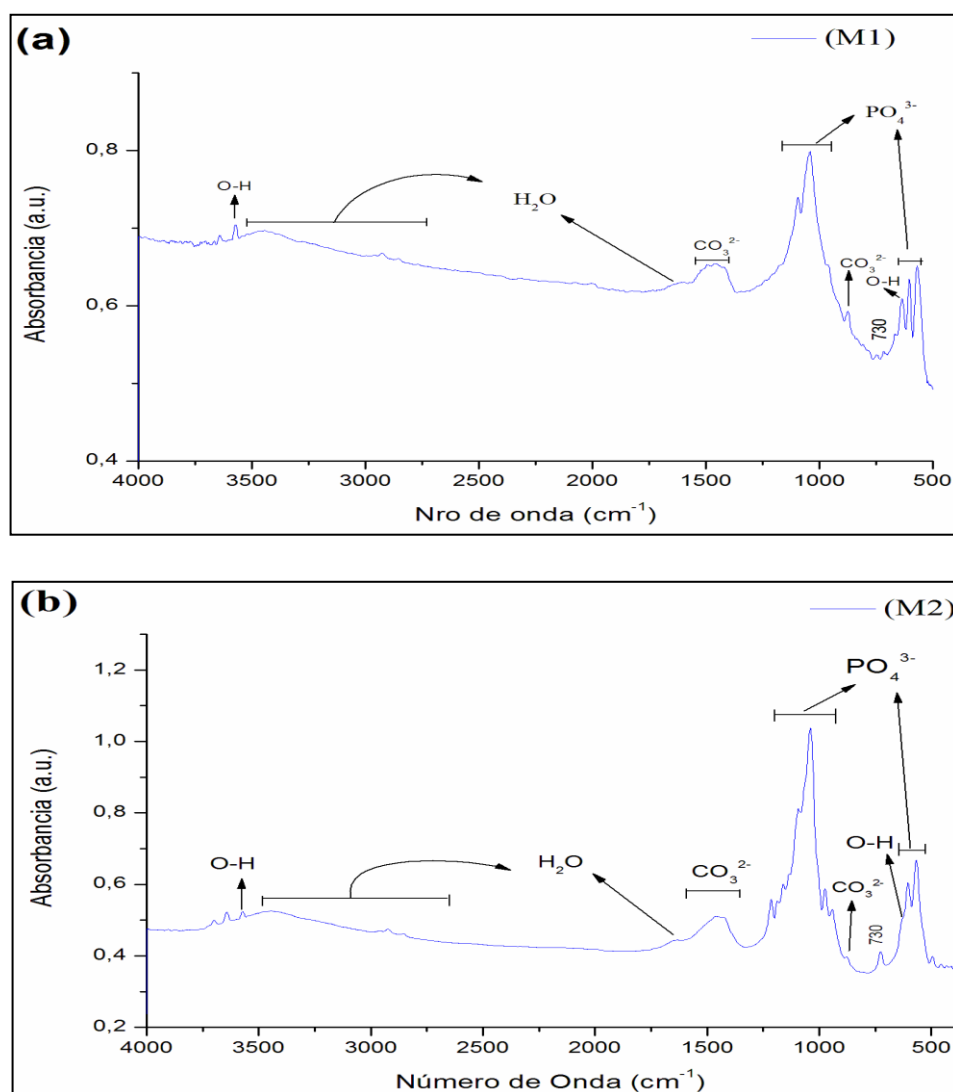


Figura 4.2 Espectro IR de las muestras calcinadas a 800°C, (a) M₁, (b) M₂, (c) M₃ y (d) M₄.

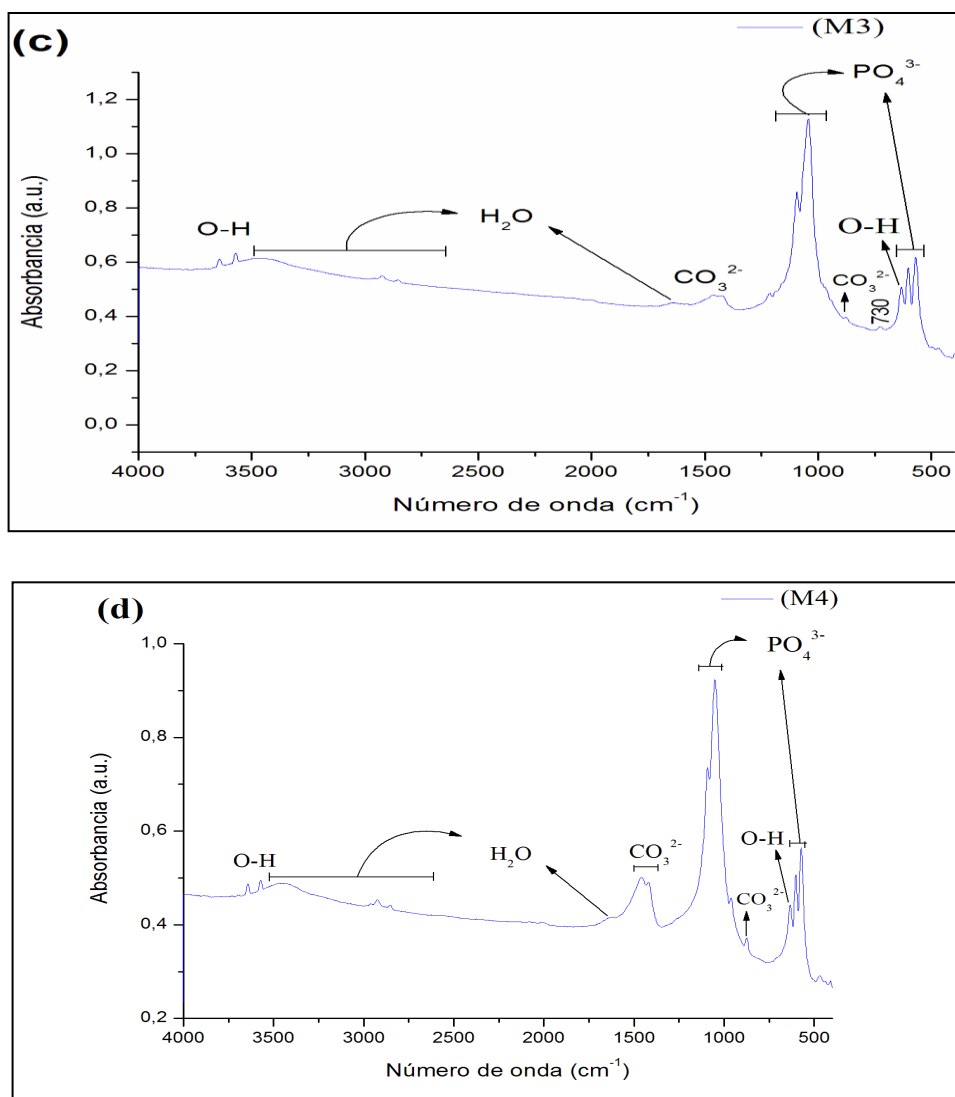


Figura 4.2 Espectro IR de las muestras calcinadas a 800°C, (a) M₁, (b) M₂, (c) M₃ y (d) M₄ (continuación).

La técnica FTIR es una técnica complementaria a la de DRX, con la cual fue posible analizar cualitativamente los grupos inorgánicos presentes (fosfatos, hidroxilo, etc). En conjunto, ambas técnicas de análisis nos permitieron inferir acerca de la eficacia de los métodos estudiados para la obtención de diferentes fosfatos de calcio.

4.1.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectrometría por dispersión de energía de rayos X

La micrografía (MEB) del polvo calcinado M_1 del método I se observa en dos aumentos en la Figura 4.3.

En la Figura 4.3(a), el polvo exhibe la morfología de plaquetas sinterizadas con forma angular. En la Figura 4.3(b), estas partículas parecen ser esféricas y muy aglomeradas como agregados de partículas muy pequeñas. Morfologías similares fueron obtenidas para partículas de fosfato de calcio por el método sol-gel [Milev et al., 2003; Kim et al., 2004].

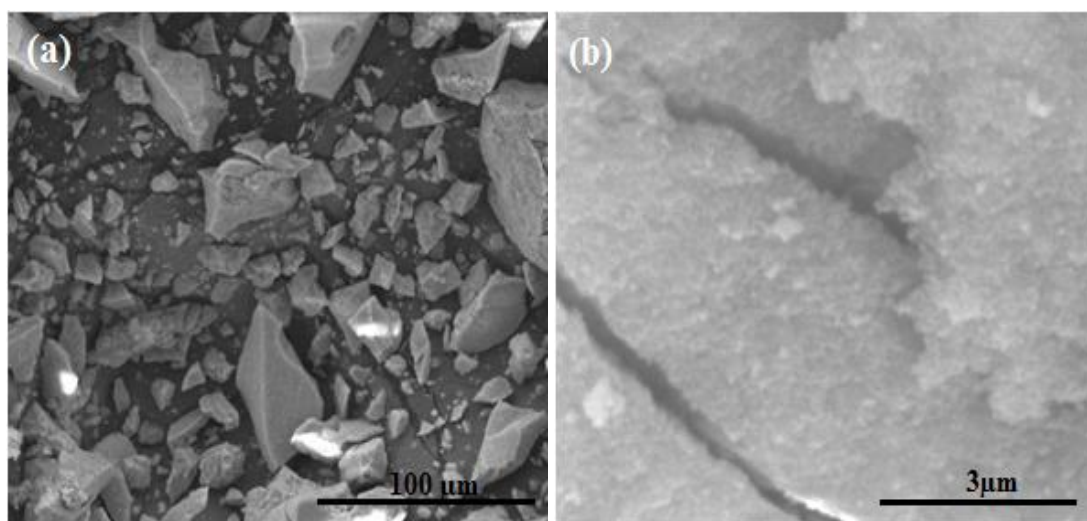


Figura 4.3 Micrografía (MEB) del polvo del método I, en dos aumentos (a) 500X (b) 30000X.

En la Figura 4.4 se muestran los espectros (EDS) practicados en dos regiones distintas de la muestra de polvo calcinado M_1 obtenida del método I.

Es posible observar que ambas regiones tienen los mismos elementos Ca, P y O, pero en diferentes proporciones.

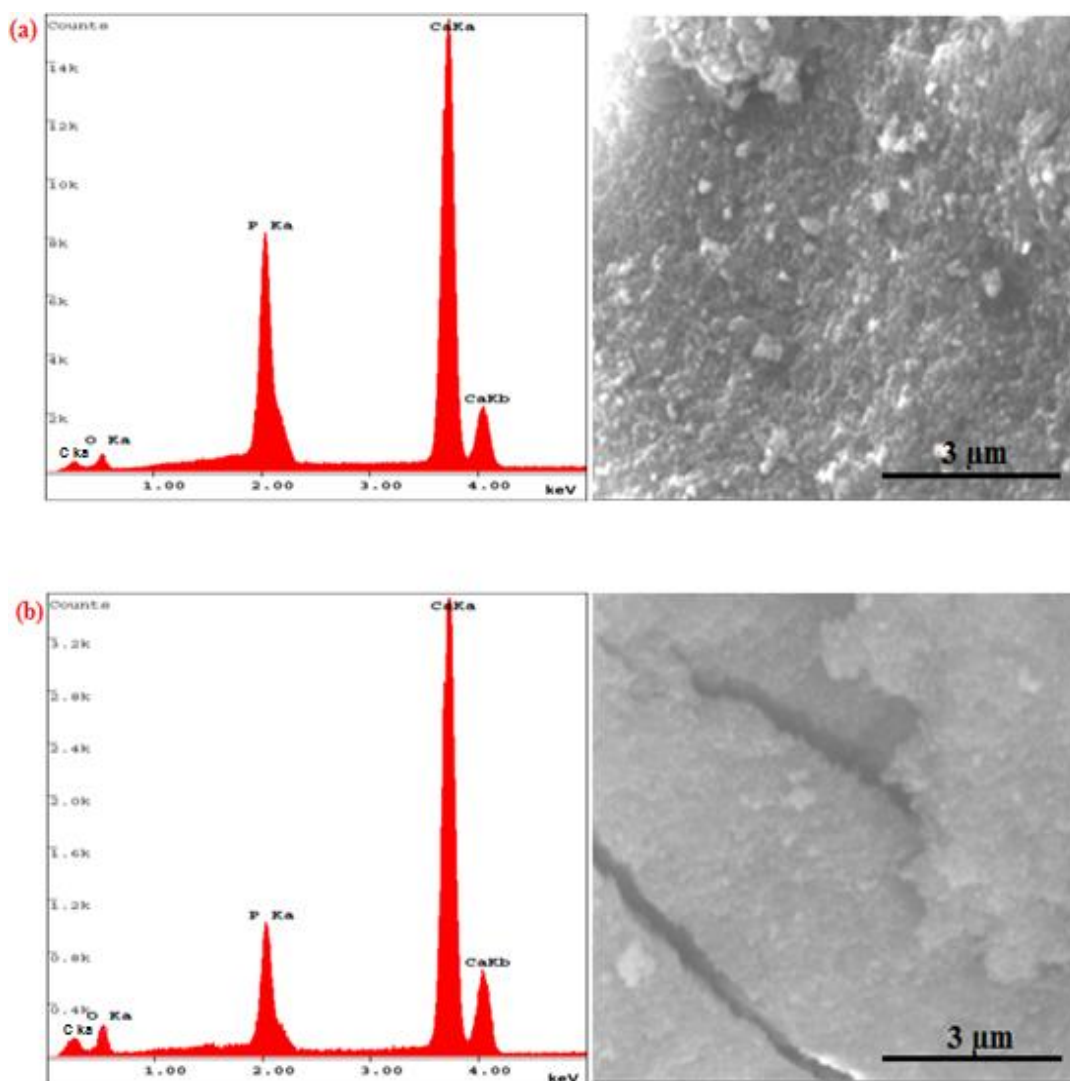


Figura 4.4 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método I, en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

En la Tabla 4.1 se presentan los resultados del análisis semicuantitativo EDS en diferentes regiones.

Sin embargo, el análisis EDS es un análisis semicuantitativo, superficial y no de profundidad. Por tanto este resultado no es confiable cuantitativamente, pero proporciona una idea de la distribución elemental en diferentes regiones de la muestra.

Las diferentes proporciones de los elementos Ca, P y O en ambas regiones de la muestra M_1 , corresponden a la presencia de las fases de Ca(OH)_2 y CaO , además de la fase Hap en la muestra y la presencia del débil pico de C, aumenta la probabilidad de que la fase de Hap carbonatada detectada por el análisis FTIR, esté presente.

Tabla 4.1 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_1 .

Análisis semicuantitativo de la muestra M_1				
Región	% Ca	% P	% O	% C
A	60,95	22,16	9,47	7,42
B	60,67	10,98	10,01	10,01

Las Figuras 4.5 y 4.7, muestran la morfología del polvo calcinado para los métodos II y III, muestras M_2 y M_3 respectivamente.

En ambos métodos se obtuvieron partículas que exhiben dos morfologías diferentes. Para cada método, analizamos dos secciones transversales, una de cada morfología encontrada, en dos diferentes aumentos. Santos et al. (2005) identificaron racimos de partículas de varias formas y tamaños para la Hap sintetizada por el método sol-gel.

La Figura 4.5(a) y (b) exhibe partículas alargadas muy finas en la forma de placas y varillas (*microrods*), que coinciden con las obtenidas por el método sol-gel en varios artículos [Yan et al., 2001; Bogdanoviciene et al., 2006; Murakami et al., 2012].

Otros autores sugieren la formación de “*whiskers*”, para partículas de morfologías similares. *Whiskers* son cristales individuales alargados, por lo general tienen un diámetro de sección transversal de 0,1-10 micras y longitudes de 10-1000 micras [Yoshimura et al., 1994; Roeder et al., 2006; Aizawa et al., 2005].

La morfología de las partículas de apatita sintetizadas, parecen coincidir con cristales, los cuales crecen con orientación preferencial al eje *c* paralela al eje longitudinal. Para confirmar esto será necesario practicar posteriormente un análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) a una partícula individual.

Sin embargo, la Figura 4.5(c) y (d) muestra una segunda morfología obtenida para las partículas del método II. Se exhiben partículas en forma de plaquetas similares a aquellas ya obtenidas para el método I.

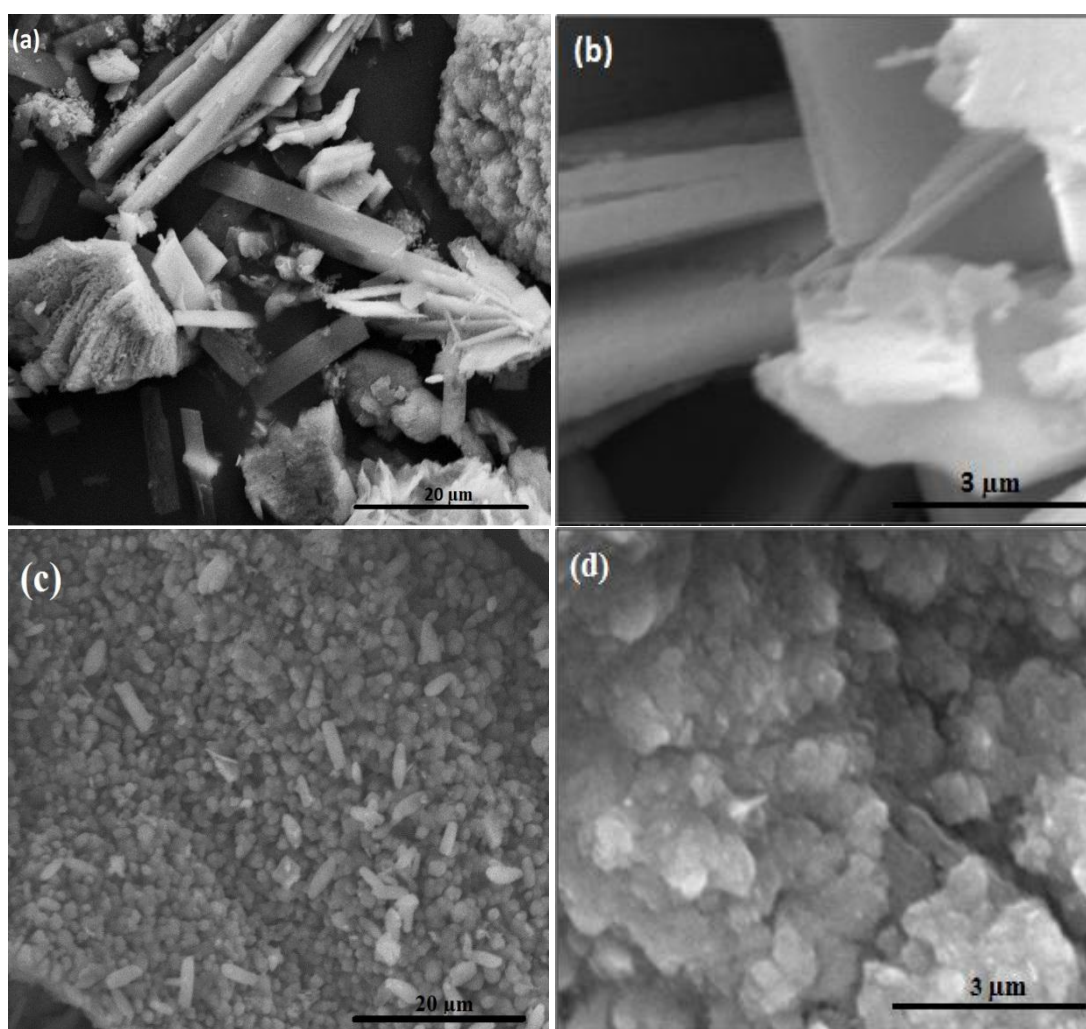


Figure 4.5 Micrografía (MEB) del polvo del método II, partículas en la forma de varillas en dos aumentos (a) 4000X y (b) 30000X, partículas en forma de plaquetas en dos aumentos (c) 4000X y (d) 30000X.

La Figura 4.6 presenta los espectros de EDS junto con sus micrografías, aplicadas a dos regiones distintas de la muestra de polvo calcinado obtenida para el método II.

Es posible observar que ambas regiones analizadas tienen los mismos elementos, pero en diferentes proporciones.

Del análisis del difractograma de DRX de ésta muestra M_2 se observa la presencia de un polvo cristalino bifásico en la muestra.

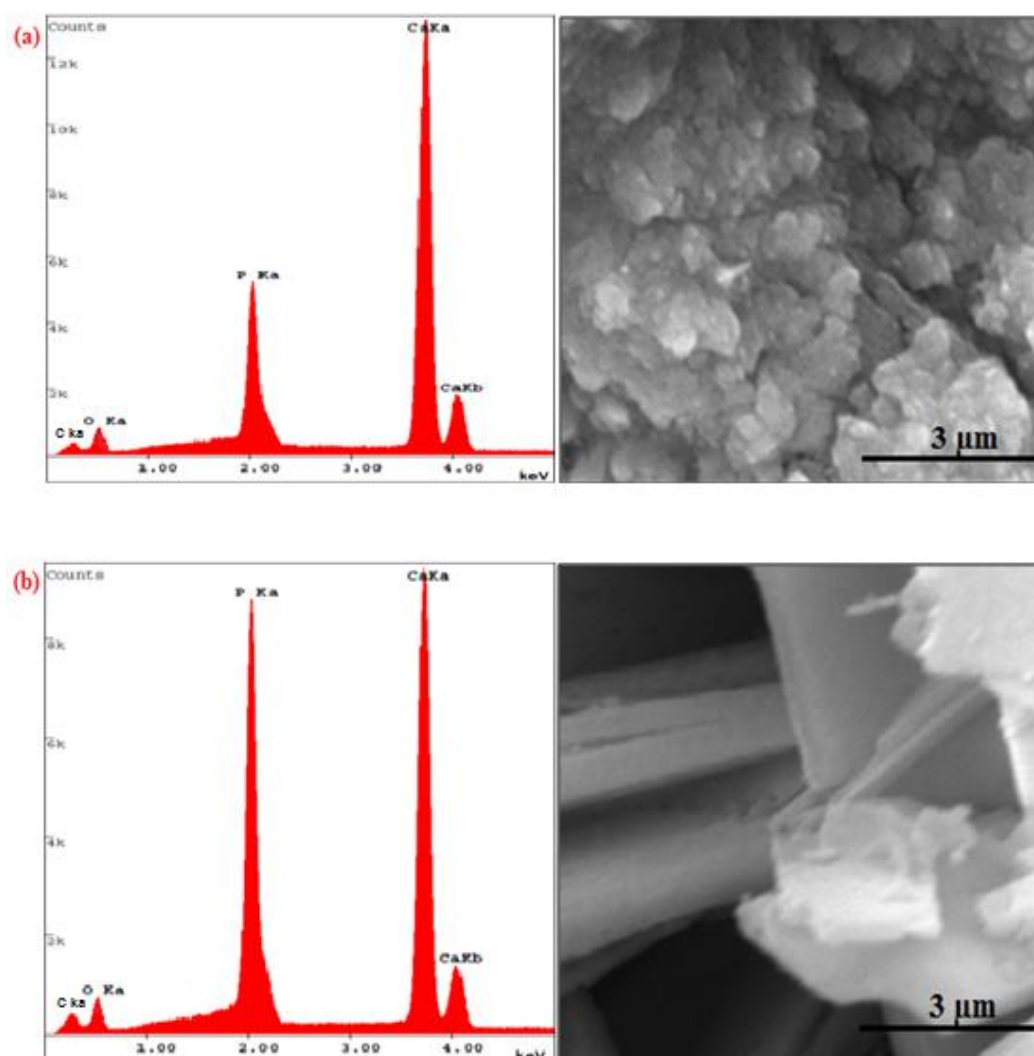


Figura 4.6 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método II, en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

En la Tabla 4.2, se presentan los resultados del análisis semicuantitativo de EDS, obtenido para ambas regiones.

La región A con partículas de morfología similar a plaquetas sinterizadas presenta mayor cantidad del elemento Ca en la muestra. La relación molar Ca/P del análisis semicuantitativo es $\text{Ca/P} \approx 2,9$, mucho mayor a 1,67.

La región B, donde al parecer se obtuvieron whiskers de Hap, presenta del análisis semicuantitativo una relación molar $\text{Ca/P} \approx 1,3$.

Las relaciones molares Ca/P, calculadas en ambas regiones, fueron consideradas en base a la Hap estequiometrica. Estrictamente hablando, esto no es correcto; pues los cálculos de las relaciones molares Ca/P deberían realizarse para cada fase presente en la muestra. Sin embargo, sirven como una comparación de la composición elemental de ambas regiones, pero no son confiables cuantitativamente.

La media relativa entre el porcentaje de calcio y el de fósforo es de 3,8 para la región A y 1,71 para la región B.

Tabla 4.2 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_2 .

Análisis semicuantitativo de la muestra M_2				
Región	% Ca	% P	% O	% C
A	59,32	15,65	17,59	7,43
B	47,17	27,57	13,71	11,55

En la Figura 4.7 se presentan las dos morfologías diferentes de las partículas obtenidas para la muestra M_3 del método III.

Así en la Figura 4.7(a) y (b) se exhiben partículas alargadas parecidas a *whiskers*, similares a las obtenidas por Liu et al. (2002), éstas parecen experimentar coalescencia entre las partículas pequeñas para dar otras mayores.

Sin embargo, la Figura 4.7 (c) y (d) exhibe partículas en forma de plaquetas, tal como las obtenidas en los métodos I y II.

Las dos morfologías de las partículas encontradas en los métodos II y III coinciden con la estructura hexagonal del cristal de Hap. Los *whiskers* son obtenidos por la orientación a lo largo del eje c tanto que el plano a-(b) es más ancho que el plano-c [Aizawa et al., 2005].

Sin embargo, no podemos suponer que las diferentes morfologías obtenidas en ambas muestras M₂ y M₃, correspondan a una u otra fase, Hap o β -TCP. Tampoco se tiene certeza de la causa probable de formación de estas morfologías no uniformes y no se puede afirmar que la misma ocurrió debido a la rápida formación del gel durante la titulación del fosfato sobre el nitrato. Pero sí podemos suponer que este hecho contribuyó a partículas de gran tamaño, ya que la rápida formación del gel, indica que el proceso de condensación fue favorecido antes que la hidrólisis.

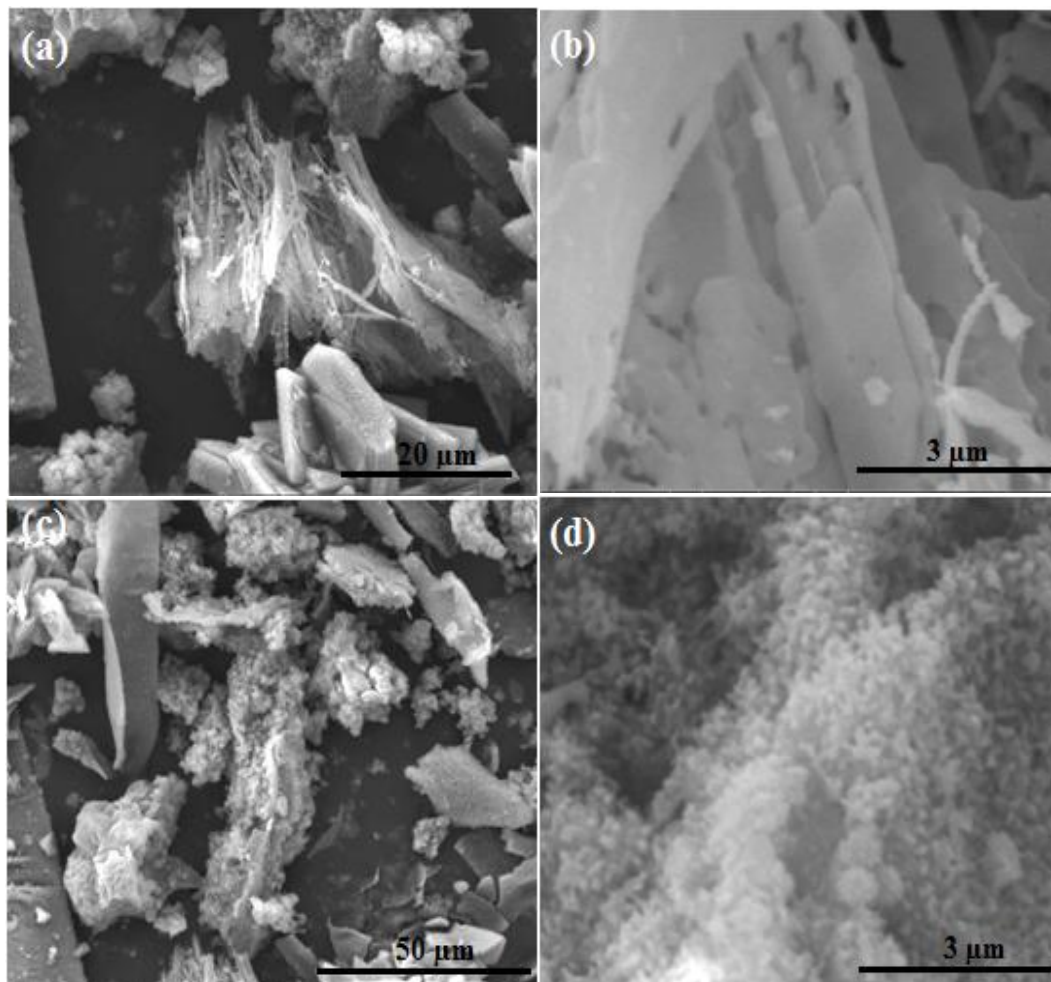


Figure 4.7 Micrografía del polvo del método III en dos aumentos, partículas en forma de varillas (a) 4000X y (b) 30000X, partículas en forma de plaquetas (c) 2000X y (d) 30000X.

En la Figura 4.8 se presentan dos espectros de EDS con sus respectivas micrografías practicadas a dos regiones distintas de la muestra de polvo calcinado M_3 , obtenida para el método III.

Se observa que la proporción de los elementos varía en ambas regiones y que en la región B, Figura 4.8(b); el pico correspondiente al elemento C se encuentra más acentuado. Esto podría indicar que esta región experimentó mayor sustitución del grupo carbonato. Pero no es correcto afirmarlo, tan sólo por el análisis de EDS semicuantitativo.

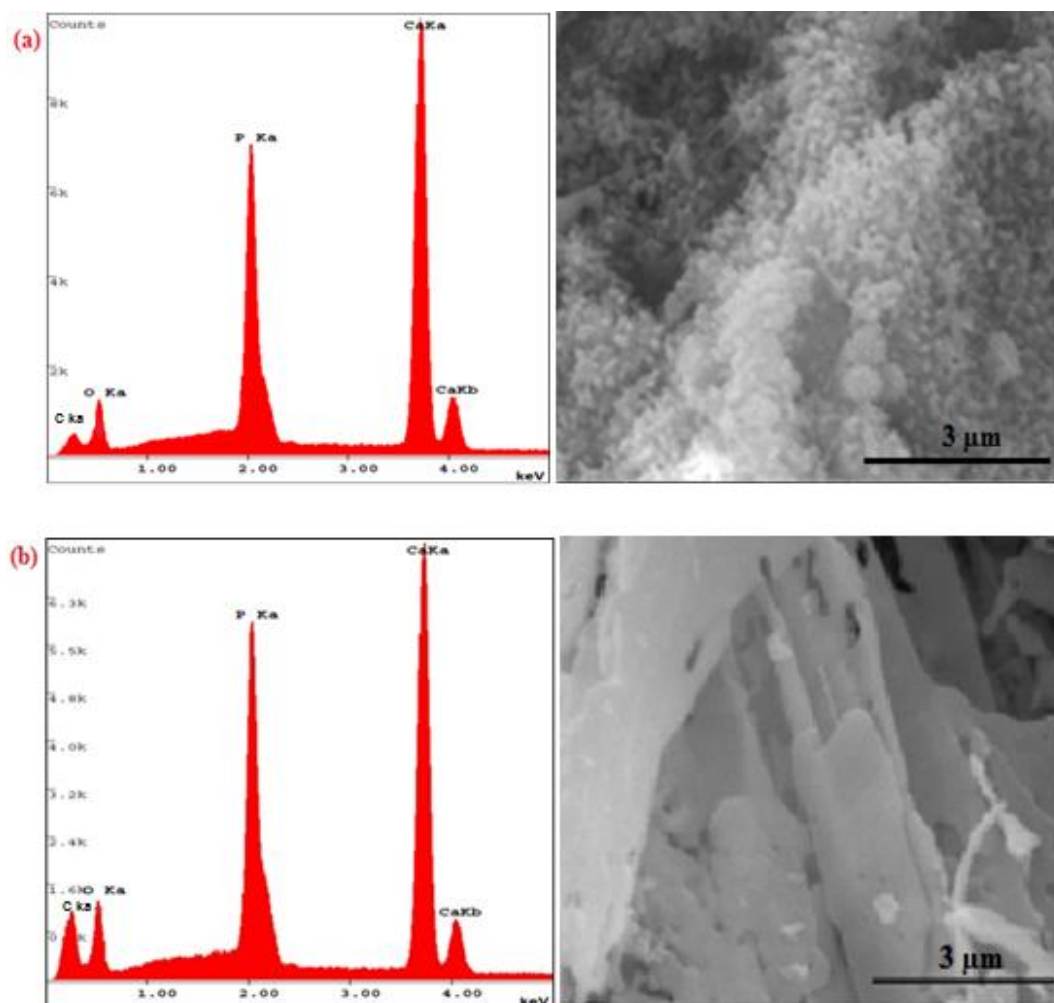


Figura 4.8 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método III, en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

La Tabla 4.3 presenta los resultados del análisis semicuantitativo de EDS, obtenidos para ambas regiones.

La relación molar Ca/P calculada, fue realizada en base a la Hap estequiometrica. Se obtuvo una relación molar Ca/P de aproximadamente 1,65 para la región A. La región B, donde se obtuvieron *whiskers* de Hap, presentó una relación molar Ca/P \approx 1,47.

Las medias relativas de Ca/P en ambas regiones A y B fueron de 2,13 y 1,89 respectivamente.

Estos resultados, como dijimos anteriormente, sirven sólo a modo comparativo de la composición elemental en ambas regiones.

Sin embargo, en ambas muestras M_2 y M_3 para la región B, donde se obtuvieron morfologías de *whiskers*, la relación molar de Ca/P fue menor a 1,67 en base a la fase pura de Hap.

Tabla 4.3 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M_3 .

Análisis semicuantitativo de la muestra M_3				
Región	% Ca	% P	% O	% C
A	44,54	20,94	22,65	11,87
B	34,07	17,97	22,94	25,02

La morfología del polvo obtenido en el método IV, se exhibe en la Figura 4.9 en dos aumentos.

En la Figura 4.9(a) se observa la muestra M_4 como si estuviese compuesta de aglomerados de partículas de gran tamaño y con morfología de plaquetas. Un aumento mayor, Figura 4.9(b), confirma que estos aglomerados están formados por pequeñas partículas esféricas de morfología uniforme, que al parecer se encuentran limitadas por cuellos, dejando pequeños poros de aproximadamente 0,1 a 1 μm de diámetro. Sin embargo, debido al corto periodo de tiempo y la baja temperatura de calcinación, inferimos que el proceso de sinterizado no tuvo lugar y que estos microporos se habrían formado tal vez por el desarrollo de una fase inicial del proceso de sinterizado.

Siendo que el método IV sólo tiene una variante con respecto al método II, se podría suponer que el EDTA.2Na contribuyó a la obtención de granos de formas iguales y a

la aglomeración de los mismos. Ya en otras rutas del método sol-gel, se observó que la naturaleza del agente complejante ejerce un control en la morfología la muestra cerámica en determinadas condiciones [Bogdanoviciene et al., 2006].

Las partículas obtenidas fueron de tamaño sub-micrométrico, al igual que las encontradas en otros trabajos [Bezzi et al., 2003; Koumoulidis et al., 2003; Santos et al., 2005; Bogdanoviciene et al., 2006]. Se presentaron en formas esféricas y coalesciendo una con otra para formar partículas de mayor tamaño. Esto podría ser una consecuencia del modificador orgánico EDTA.2Na o del proceso de tratamiento térmico, ya que se ha reportado la relación directa entre el incremento del tamaño del cristal con el aumento de la temperatura de calcinación [Hwang et al., 2000; Santos et al., 2005].

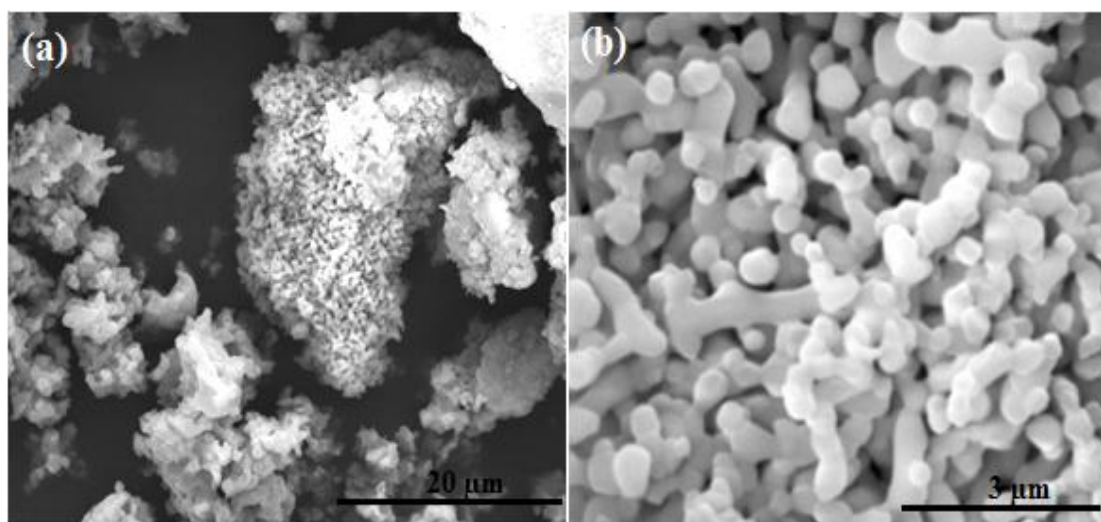


Figure 4.9 Micrografía (MEB) del método IV en dos aumentos, (a) 4000X (b) 30000X.

En la Figura 4.10 se presentan los espectros de EDS junto con sus respectivas micrografías, practicadas en dos regiones distintas de la muestra de polvo calcinada M₄.

Es posible observar que ambas regiones tienen los mismos elementos, pero en diferentes proporciones. En todas las regiones analizadas, se presentó un pico del elemento sodio para ésta muestra M_4 .

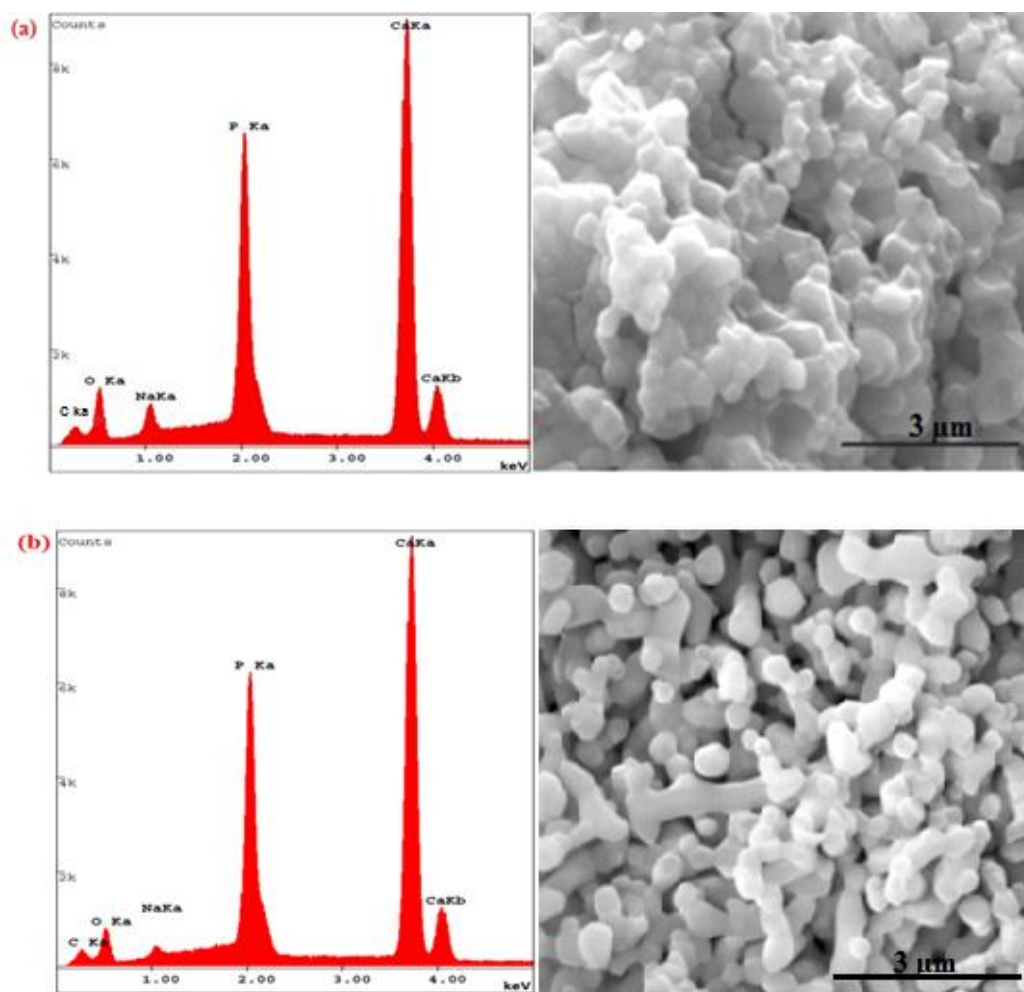


Figura 4.10 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado del método IV, en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

La Tabla 4.4 presenta los resultados del análisis semicuantitativo de EDS, obtenidos para ambas regiones.

La relación molar Ca/P del análisis semicuantitativo es de aproximadamente 1,6 para la región A. La región B, presenta del análisis semicuantitativo una relación molar Ca/P \approx 1,43. Los cálculos fueron realizados en base a Hap estequiométrica.

Las medias relativas Ca/P de ambas regiones A y B fue de 2,04 y 2,22 respectivamente.

Para esta muestra, se tiene la fase Hap con relación molar Ca/P = 1,67, además de la fase β -Renanita, con relación molar Ca/P = 1.

Sin embargo, los resultados sirven para inferir acerca de diferentes proporciones elementales en distintas regiones de la muestra.

Tabla 4.4 Resultados del análisis elemental semicuantitativo por EDS de la muestra M₃.

Análisis semicuantitativo de la muestra M₄					
Región	% Ca	% P	% O	% C	%Na
A	42,3	20,77	22,93	10,27	3,72
B	48,36	21,82	18,69	9,76	1,37

Finalmente, la influencia de la ruta de síntesis sol-gel sobre las fases obtenidas, para los materiales de fosfato de calcio, es evidente. Más aún, hemos demostrado en éste trabajo, que la adición de un modificador orgánico a la solución precursora, puede dar resultados diferentes, ya que la naturaleza complejante del quelato, al parecer impacta sobre la morfología uniforme del cristal y el uso de sal disódica del EDTA puede conducir a la formación de la fase β -Renanita.

4.1.4 Fluorescencia de rayos X (FRX/ED)

La composición química de las muestras, determinada por la técnica de FRX por energía dispersiva, es mostrada en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Composición química de las muestras M₁, M₂, M₃ y M₄ de los diferentes métodos.

Elemento	Porcentual (%)			
	Método I	Método II	Método III	Método IV
Ca	74,425	71,115	72,02	73,106
P	25,575	28,885	27,98	26,894

De los resultados de la Tabla 4.5, se determina la relación molar Ca/P de las muestras obtenidas en cada método ensayado. Dichos resultados son presentados en la Tabla 4.6 y fueron calculados en base a la fase Hap estequiométrica.

Tabla 4.6 Relación molar Ca/P de las muestras.

Ruta de síntesis	Relación Ca/P
Método I	2,16
Método II	1,91
Método III	1,99
Método IV	2,11

La relación molar Ca/P de la Hap estequiométrica es 1,67. Las relaciones molares obtenidas por la técnica de FRX para las muestras M₁, M₂, M₃ y M₄ fueron superiores al valor de 1,67 de la Hap estequiométrica.

Se analizan a continuación, algunas de las razones que podrían contribuir al aumento de esta relación molar Ca/P.

En la muestra M₁ se detectó por DRX la presencia de CaO e Ca(OH)₂ en la muestra y esta fase podría generar un aumento en la concentración de iones Ca²⁺ en la muestra.

De igual manera el análisis de los resultados del FTIR para estas muestras M₁, M₂ y M₃ constató la presencia del grupo funcional CO₃²⁻, determinadas para Hap carbonatada tipo-B, lo cual indica que algunos grupos fosfatos fueron reemplazados por grupos carbonatos.

Para el método IV sin embargo, la muestra M₄ arrojó la presencia del elemento sodio en un análisis semicuantitativo por EDS, el cual por la técnica de FRX no fue detectado en la muestra.

Esto podría ser debido a la limitación del equipo para detectar el elemento sodio, pues el límite de detección del mismo abarca desde el sodio hasta el titanio, lo cual muchas veces provoca que el sodio no sea detectado cuando el mismo se encuentra en bajas concentraciones. Este hecho junto a los resultados obtenidos por la técnica FTIR que indica presencia de Hap carbonatada tipo-B en la muestra; contribuye al aumento de la relación Ca/P en dicha muestra.

Para apatitas biológicamente formadas y sinterizadas, la relación molar Ca/P determinada en todos los casos fue mayor que 1,67 de la Hap estequiométrica [Janus et. al., 2008; Bahrololoom et al., 2009, Dorozhkin, 2011]. De manera que siendo las apatitas biológicas carbonatadas, presentan un aumento en la relación Ca/P.

4.1.5 BET

El análisis de área superficial sólo fue realizado para la muestra M₄. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Análisis BET del área superficial de la muestra M₄.

Muestra	Área superficial BET (m ² /g)	Volumen total de poro (cm ³ /g)		Tamaño de poro (Å)	
		Adsorción	Desorción	Adsorción	Desorción
M ₄	0,5612	0,001502	0,000774	107,0937	55,1818

Este resultado de área superficial muy baja (BET) confirma que las partículas obtenidas fueron de tamaños micrométricos y no nanométricos. Además proporciona una idea de la porosidad de las partículas.

Algunos estudios afirman que dependiendo de la temperatura de calcinación puede ocurrir el efecto de sinterización entre las partículas pequeñas, tal como se presenta en la Figura 4.9(a), donde se observan aglomerados con dimensiones de hasta 20µm.

Disminuyendo de esta manera la porosidad de las mismas y área superficial (BET) [Bose et al., 2003; Bianco et al., 2009; Kapoor et al., 2011].

Esto nos hace suponer que la temperatura de calcinación de 800°C podría ser muy alta para la formación de fosfatos de calcio de interés biomédico. Una temperatura inferior; tal vez, sea adecuada para la formación de estas fases y contribuya al aumento del área superficial de las muestras.

Estudios realizados en muestras de Hap comerciales de diferentes proveedores empleadas para implantes óseo, médico-dentales, mostraron diferentes valores del área superficial BET en cada muestra, que van desde 0,8 m²/g hasta 85 m²/g [Conz et al., 2005].

4.2 Experimento

Las muestras T₀, T₁, T₂ y T₃ obtenidas para cada tiempo de envejecimiento 1, 12, 24 y 48 horas, respectivamente, fueron caracterizadas para inferir acerca de las diferentes fases presentes, morfología y tamaño de las partículas obtenidas. Se presentan a continuación los resultados de la fase experimental y la discusión de los mismos para cada análisis realizado.

4.2.1 Fluorescencia de rayos X (XRF)

La composición química de las muestras, determinada por la técnica de FRX por energía dispersiva es mostrada en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Composición porcentual de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de envejecimientos T₀, T₁, T₂ y T₃.

Elemento	Porcentual (%)			
	(T ₀)	(T ₁)	(T ₂)	(T ₃)
Ca	73,083	73,697	73,96	73,704
P	26,917	26,303	26,04	26,296

De los resultados de la Tabla 4.8, se determina la relación molar Ca/P de las muestras obtenidas para cada tiempo de envejecimiento. Dichos resultados son presentados en la Tabla 4.9.

Es importante mencionar que el espectrofotómetro de FRX empleado para el análisis, sólo detecta elementos desde el sodio hasta el titanio [Fuente: Analista de FRX, Luana Barki]. Esta limitación del equipo hace que siendo el sodio, un límite de detección del instrumento, éste no sea detectado cuando se encuentra en bajas concentraciones en la muestra. Además, no fue posible detectar la presencia de C y O en la muestra, debido a limitaciones del instrumento.

Tabla 4.9 Relación Ca/P, para cada muestra.

Muestras	Relación Ca/P
M ₁ (T ₀)	2,1
M ₂ (T ₁)	2,17
M ₃ (T ₂)	2,2
M ₄ (T ₃)	2,17

Con estos resultados es probable que exista además de la fase β -Renanita, otras fases presentes, como óxidos o hidróxidos de calcio, además de la posible la formación de Hap carbonatada; ya que éstos contribuyen en gran medida a aumentar la relación Ca/P en la muestra, como se explicó en el pre-experimento.

4.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)

En el difractograma de la Figura 4.11 se observan los patrones de DRX de las muestras T₀, T₁, T₂ y T₃ calcinadas a 800°C. El difractograma completo para 2 θ de 10° a 90° puede observarse en el Anexo C.

En general se obtuvo diferentes fases para cada tiempo de envejecimiento.

Para la muestra T₀ se obtuvieron las fases: Hap, β -Renanita, y otro fosfato de Calcio y sodio identificado por la fórmula química Ca₁₀Na(PO₄)₇.

Para la muestra T₁ y T₃, se obtuvieron las fases: Hap, β -Renanita, y β -TCP. Como ya hemos mencionado en la parte pre-experimental, se tienen estudios *in vivo* del empleo como biomaterial de cada una de estas fases puras, que demuestran su potencial para aplicaciones biomédicas. También de sus combinaciones en biomateriales cerámicos bifásicos como; Hap - β -TCP y Hap - β -Renanita.

Como ambas combinaciones de cerámicas bifásicas han dado resultados alentadores en cuanto a su reabsorción en el tejido vivo y proliferación celular en la superficie del implante; una propuesta para trabajos futuros sería caracterizar cuantitativamente las fases de esta cerámica y realizar estudios sobre el comportamiento *in vivo* e *in vitro*, de esta cerámica trifásica (Hap- β -TCP y β -Rhenanite) [Knabe et al., 2004; S. Dorozhkin, 2012; A. Soueidan et al., 1995; M. Benahmed et al., 1996].

La termodinámica ayuda a inferir acerca de las fases formadas. La síntesis química por el método sol gel fue conducida manteniendo un pH > 9 y con una relación molar Ca/P \approx 1,67. En estas condiciones es posible la formación de CDA de composiciones variadas a partir de métodos vía húmeda. A elevadas temperaturas (800 – 1000°C), el CDA con una relación molar Ca/P \approx 1,58 conduce a la formación de un fosfato de calcio bifásico (BCP), compuesta de Hap y β -TCP en una proporción 60:40. Otras relaciones de CDA como Ca/P \approx 1,8 conduce a la formación de una mezcla de β -TCP pura [J.C. Heughebaert et al., 1994; B. León et al., 2009].

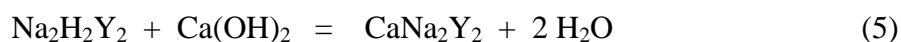
Considerando que tuvo lugar la formación de una fase β -Renanita (β -CaNaPO₄), de relación molar Ca/P = 1, es posible que precipite la fase CDA puesto que la relación estequiométrica inicial de los precursores mezclados fue alterada.

Para la muestra T₂, que presenta el mismo tiempo de envejecimiento de la muestra M₄ del método IV de la parte pre-experimental; pero para una síntesis de mayor cantidad de Hap, se observa la fase de fosfato de calcio y sodio (β -Renanita) e Hap, las cuales fueron obtenidas en el método IV con anterioridad, pero además se observan las fases de Ca(OH)₂ y Ca₂P₂O₇ acompañando a ambas fases. Esta fase de pirofosfato, un fosfato de calcio, no presenta para nuestros conocimientos estudios acerca de su biocompatibilidad y junto con el Ca(OH)₂, representan fases indeseables en la muestra.

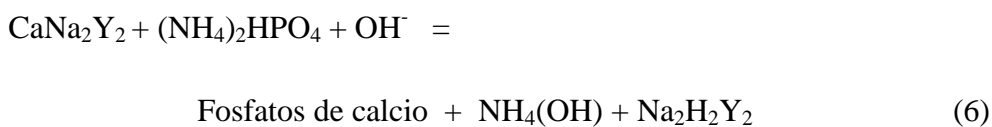
El Ca(OH)_2 podría formarse al inicio de la reacción entre el nitrato de calcio en solución básica amoniacal, según la siguiente reacción:



Sin embargo, este Ca(OH)_2 debería reaccionar con el agente complejante EDTA.2Na a $\text{pH} > 9$. Siendo la constante de formación del complejo Ca-EDTA (CaY^{2-}), $K_{\text{CaY}^{2-}} = 5,0 \cdot 10^{10}$ y a $\text{pH} > 8$, se ve favorecida la formación del complejo [Skoog et al., 2001].



Durante la mezcla de los precursores, esto es el segundo estadio de la reacción; el calcio es liberado en forma paulatina del complejo para reaccionar con el fostafo en solución amoniacal. Se espera que la siguiente reacción, tenga lugar.



La solubilidad teórica del Ca(OH)_2 en agua a 25°C es $1,18 \cdot 10^{-2}$ mol/L, para un valor de la constante de producto de solubilidad termodinámica, $K_{\text{ps}} = 6,5 \cdot 10^{-6}$. En medio básico se espera que este valor teórico de solubilidad, disminuya aún más [Skoog et al., 2001].

El Ca(OH)_2 podría haber experimentado una reacción incompleta, o de una reprecipitación de esta sal como consecuencia de la liberación de cationes Ca^{2+} en un segundo estadio de la reacción. Sin embargo, la temperatura de descomposición del

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ es inferior a 800°C , por lo que es posible que el tiempo de calcinación no haya sido suficiente para que esta descomposición en CaO se haya producido, ya que tampoco se observó el producto de descomposición en la muestra.

La fase pirofosfato es considerada un fosfato condensado, obtenido por condensación y polimerización de los grupos PO_4^{3-} . La síntesis estequiométrica de esta fase fue estudiada para diferentes concentraciones de los precursores, respetando la relación molar $\text{Ca/P} = 1$. En todos los casos se obtuvo una mezcla de las fases de β -TCP y $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ [Oliveira et al., 2009].

La formación de fosfato de calcio amorfo (ACP), es favorecida mezclando rápidamente soluciones muy concentradas de calcio y fosfato a elevado pH y baja temperatura. La forma ACP al inicio de la precipitación es favorecida debido a su menor energía superficial comparada al OCP o a la Hap. ACP cristaliza en CDA por hidrólisis interna y posterior disolución-reprecipitación. Esta conversión a CDA es retrasada por la presencia de inhibidores del crecimiento cristalino, como magnesio, pirofosfato o carbonato [E.D. Eanes et al., 1965].

Como la fase pirofosfato de calcio fue obtenida, la formación de la fase β -TCP tal vez se vio inhibida ya que este tricalcio fosfato no puede ser precipitado de soluciones acuosas. La fase β -TCP puede ser preparada solamente calentando CDA a temperaturas superiores a 800°C o por reacciones en el estado sólido [B. León et al., 2009].

Esto nos indica que el método IV es difícil de reproducir para una mayor escala y se debe estudiar en futuros trabajos, la influencia de cada variable independiente del método como, concentración óptima del agente quelante ($\text{EDTA}\cdot 2\text{Na}$), tiempo de mezcla, temperatura de mezcla, velocidad de goteo y agitación, volumen óptimo de agua para producir la hidrólisis; de manera a determinar la medida en que estas variables afectan la composición de la muestra para una síntesis a mayor escala.

Aguado (1996), estudiando la termodinámica del sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$, en ausencia de otros ácidos y bases, indicó que la formación de Hap por hidrólisis de un único fosfato de calcio, es cinéticamente muy lenta y que todas las

sales de fosfatos de calcio con relación molar Ca/P menor a la de la Hap, liberan H_3PO_4 en solución durante el proceso. En el caso del TTCP, la hidrólisis de esta sal produce $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como subproducto de la reacción.

Para llevar a cabo la reacción de hidrólisis hasta la totalidad de la consumición de la sal original, argumenta Aguado (1996), que sería necesario utilizar algún mecanismo que permita eliminar los subproductos ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4) de la reacción.

Dominar la química de las biocerámicas de fosfatos de calcio y la influencia de los parámetros del proceso en las fases formadas durante la síntesis, es crucial para lograr un proceso controlado de síntesis reproducible.

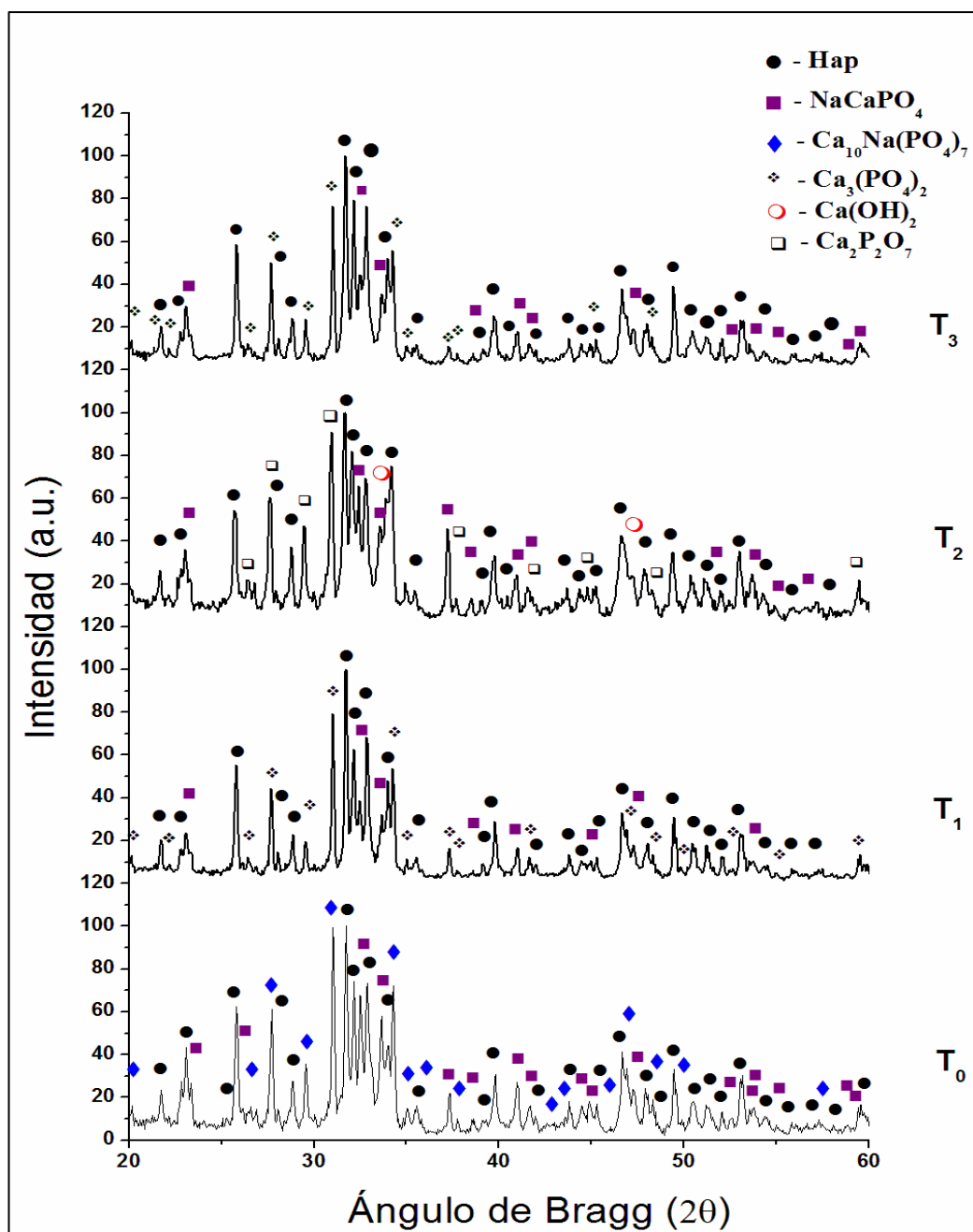


Figura 4.11 Difractograma de las muestras obtenidas para los diferentes tiempos de envejecimiento T_1 , T_2 , T_3 y T_4 .

4.2.3 Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las muestras calcinadas T_1 , T_2 , T_3 y T_4 se muestran en la Figura 4.12. Los picos principales de absorción de IR pueden ser atribuidos a los

siguientes grupos funcionales [Santos et al., 1995; Posset et al., 1998; Arias et al., 1998; Mayor et al., 1998].

Vibraciones características de grupos fosfatos (PO_4^{3-}) se muestran como una banda ancha localizada entre 990 y 1050 cm^{-1} , correspondientes a deformación axial simétrica, con un hombro a 1084 y 1120 cm^{-1} correspondiente a la vibración axial asimétrica. Dos picos bien definidos surgen alrededor de 570 y 605 cm^{-1} para el modo de deformación angular asimétrica.

El grupo hidroxilo (OH) presenta un modo de vibración que aparece alrededor de 630 cm^{-1} para el tipo deformación angular y en 3570 para el tipo axial [Choi et al., 2004; Weng et al., 1998; Agrawal et al., 2011]. Estas dos bandas son características del grupo O-H para la Hap cristalina [Stoch et al., 1999].

Sin embargo, se presentó un pico entre 3640 y 3645 cm^{-1} en todas las muestras T_0 , T_1 , T_2 y T_3 . Se tienen reportes del pico en 3645 cm^{-1} como vibraciones del grupo O-H de la fase $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [Santos et al., 1995; Posset et al., 1998; Arias et al., 1998; Mayor et al., 1998]. Sin embargo, esta fase sólo fue identificada por el análisis de DRX para la muestra T_2 .

El pico en 3670 cm^{-1} para la muestra T_0 coincide con la asignación a los picos agudos en 3570 cm^{-1} y 3670 cm^{-1} relacionados con la vibración axial de los iones OH^- en la red [Pramanik et al., 2005].

Existe una pequeña banda entre 720 y 722 cm^{-1} en todas las muestras T_0 , T_1 , T_2 y T_3 . Existen reportes, para el tipo de vibración axial de la fase P_2O_5 en ésta zona de baja frecuencia [Dayanand et al., 1996; Hygazy et al., 1985; Rafiqul et al., 2004]. Sin embargo, bandas en la región de $721,2 \text{ cm}^{-1}$ fueron identificados por otros autores, como correspondientes a vibraciones del grupo OH, para una muestra de fosfato de calcio bifásico [Oliveira et al., 2009].

Una banda ancha extendida en el rango de 2500 a 3700 cm^{-1} fue observada. La misma se correspondería con vibraciones axiales de la molécula de agua (H_2O) y otra banda pequeña entre para 1620 y 1650 cm^{-1} para el modo de deformación angular de

la misma molécula. Esto podría ser debido al carácter higroscópico del cristal de Hap [Koutsopoulos S., 2002; Kumar et al., 2012; Kapoor, 2011].

Se observan bandas adicionales correspondientes al grupo CO_3^{-2} , que aparecen de 1415 a 1462 y una banda a 875 cm^{-1} , para la Hap carbonatada tipo-B en las muestras T_1 , T_2 y T_3 . Pero la banda del grupo CO_3^{-2} se extiende de 1413 hasta 1470 cm^{-1} en T_0 lo que podría indicar que existe una banda en 1457 cm^{-1} y esto representaría la presencia de Hap carbonatada tipo-A para la muestra T_0 [Koutsopoulos S., 2002; Krajewski et al., 2005].

Para las muestras T_1 , T_2 y T_3 Figura 13(b), (c) y (d); la banda pequeña en 1216 cm^{-1} , no fue identificada.

Los grupos carbonatos probablemente estén presentes, pues aparecen nuevamente en todas las muestras T_1 , T_2 , T_3 y T_4 , podrían formarse a partir de moléculas de CO_2 de la atmósfera, así como a la presencia de átomos de C y O en la molécula de EDTA.2Na que podrían haber reaccionado durante el proceso [Wang et. al., 2006].

Para todas las muestras de la fase experimental, el análisis por DRX mostró la presencia de la fase $\beta\text{-NaCaPO}_4$ cristalina junto a la fase de Hap y otras fases. El espectro FTIR de la fase $\beta\text{-NaCaPO}_4$ coincide con el obtenido por Driessens et al. (1992). Donde las bandas correspondientes a deformaciones axiales observadas a 603 , 962 , 1020 y 1089 cm^{-1} fueron aportados tanto por la $\beta\text{-NaCaPO}_4$ y la Hap [Jalota et al., 2006].

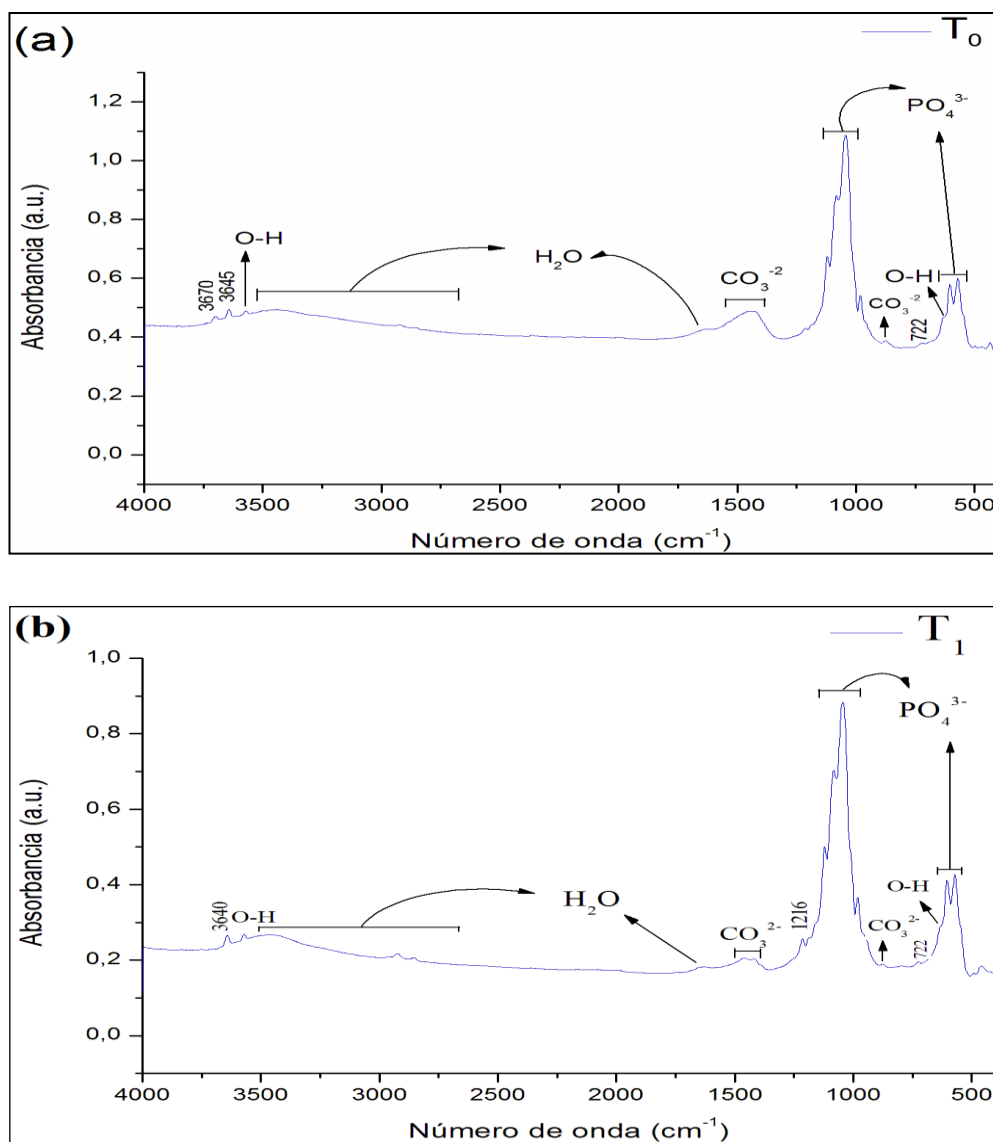


Figura 4.12 Espectro IR de las muestras calcinadas a 800°C, (a) T₁, (b) T₂, (c) T₃ y (d) T₄.

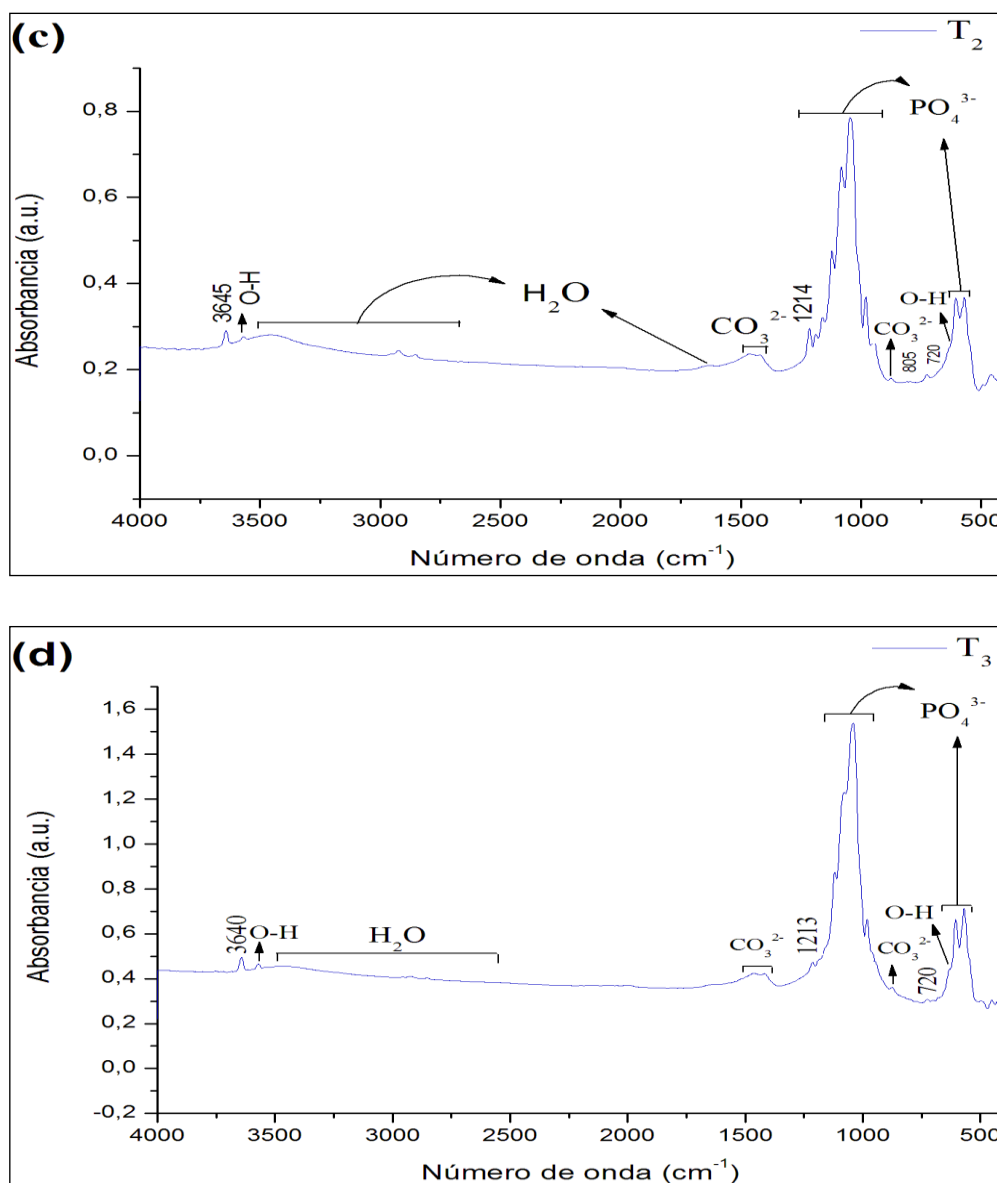


Figura 4.12 Espectro IR de las muestras calcinadas a 800°C, (a) T₁, (b) T₂, (c) T₃ y (d) T₄ (continuación).

El análisis Infrarrojo confirma la presencia de los grupos funcionales inorgánicos (fosfato, hidroxilo). Además, se supone la presencia de Hap carbonatada en todas las muestras, lo que coincide con los resultados de FRX obtenidos para estas muestras.

4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectrometría por dispersión de energía de rayos X

Se presentan las micrografías (MEB) del polvo calcinado a diferentes tiempos de envejecimiento.

La Figura 4.13 de la muestra T_0 es visto en dos aumentos. En la Figura 4.13(a), el polvo exhibe morfología de plaquetas sinterizadas. En la Figura 4.13(b) las partículas son vistas como esféricas y muy aglomeradas, como agregados de partículas muy pequeñas y de tamaño medio aproximado de 100-300 nm.

Morfologías similares fueron obtenidas en el método IV del pre-experimento para partículas de Hap y β -Renanita. Además, son coherente con las obtenidas por el método sol-gel en la literatura [Milev et al., 2003; Kim et al., 2004].

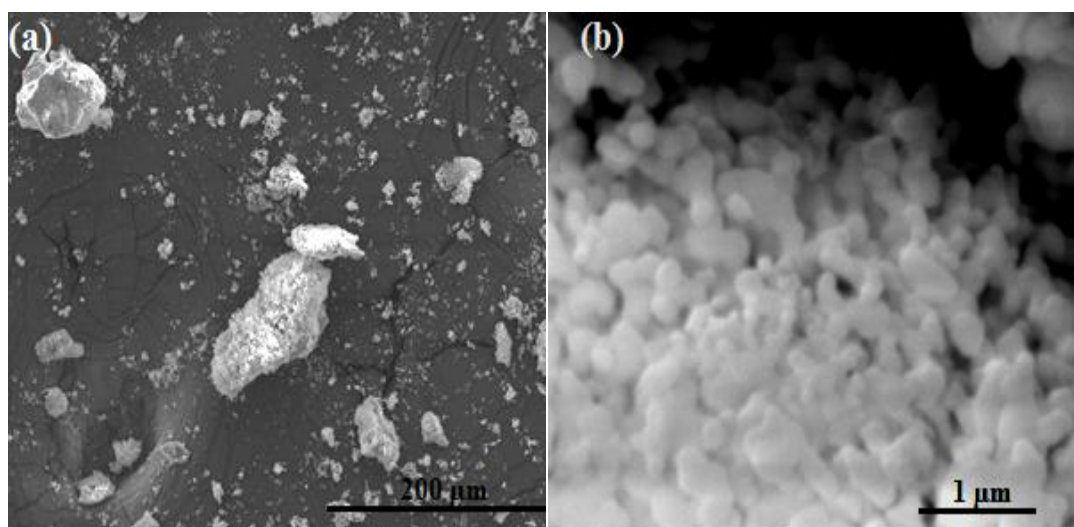


Figura 4.13 Micrografía (MEB) de la muestra T_0 , en dos aumentos (a) 500X (b) 50000X.

En la Figura 4.14, se muestran los espectros de EDS junto con sus respectivas micrografías, practicadas en dos regiones distintas de la muestra T_0 de polvo calcinado.

Es posible observar que ambas regiones tienen los mismos elementos Ca, P y Na, pero en diferentes proporciones.

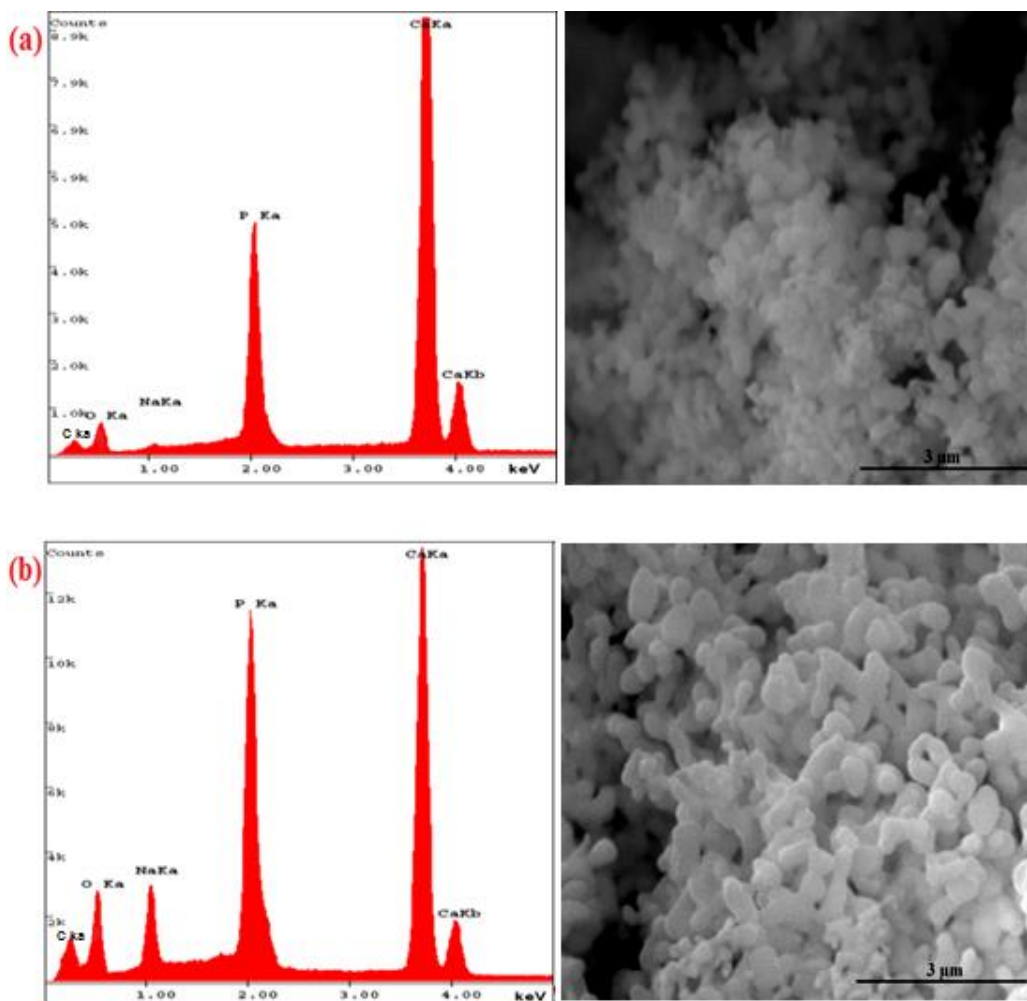


Figura 4.14. Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T_0 , en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

La Tabla 4.10 presenta los resultados del análisis semicuantitativo de EDS, obtenido para ambas regiones de la muestra T_0 .

La relación molar Ca/P del análisis semicuantitativo calculados en base a la Hap estequiométrica, es $Ca/P \approx 2,6$ para la región A.

La región B presenta una relación molar Ca/P \approx 1,36. Además, se obtuvo un porcentaje considerablemente superior del elemento C en esta región.

Para esta muestra se identificaron tres fases. Hap con relación molar estequiométrica de Ca/P = 1,67, β -Renanita con relación molar estequiométrica de Ca/P = 1 y una fase de fosfato de calcio y sodio, $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ con relación molar estequiométrica de Ca/P = 1,43.

Como se tienen varias fases presentes, se calculó la media relativa de Ca/P en ambas regiones, siendo 3,22 y 1,76 para las regiones A y B, respectivamente.

Los resultados obtenidos por el análisis EDS difieren de las relaciones molares estequiométricas de las distintas fases presentes y no son confiables por presentar resultados cuantitativos de forma localizada y superficial. Lo cual sirven para inferir acerca de diferentes proporciones elementales en distintas regiones de la muestra.

Tabla 4.10 Análisis semicuantitativo de EDS de la muestra T_0 .

Análisis semicuantitativo de la muestra T_0					
Región	% Ca	% P	% O	% C	% Na
A	57,42	16,88	16,86	7,82	1,01
B	30,08	17,11	23,23	23,35	6,24

En la Figura 4.15 se muestran las micrografías de la muestra T_1 . Para esta muestra, se obtuvo en una de las regiones analizadas (región A), Figura 4.15(a), aglomerados de partículas al parecer de morfologías esféricas, tipo plaquetas sinterizadas.

Al analizar esta misma región con un mayor aumento, Figura 4.15(b); se pudo observar que junto a las partículas esféricas existen otras, de morfología tipo varillas muy pequeñas. A diferencia de los *whiskers* obtenidos en los métodos II y III, estas varillas son mucho más pequeñas, aunque siguen siendo del orden de micrómetros.

En la región B se observa un aglomerado de gran tamaño de partículas al parecer esféricas, Figura 4.15(c).

Un mayor aumento en ésta región Figura 4.15(d) confirma la morfología esférica de éstas partículas. Sin embargo, es posible observar con buena claridad, como las partículas coalescen unas a otras formando microporos entre las mismas.

Si la sinterización es el responsable de este fenómeno de coalescencia, temperaturas de calcinación próximas a las de fusión de algunas de las fases presentes, debe haber tenido lugar [Randall, 1991]. La temperatura de calcinación de las muestras, fue 800°C.

Sin embargo, las imágenes del MEB, para la región B de la muestra T₁, muestran que es muy probable que el fenómeno haya tenido lugar y provocado el aumento del tamaño de partícula con la consecuente disminución del área superficial.

Podemos suponer que las partículas obtenidas en la fase gel del proceso fueron de tamaño nanométrico y los posteriores tratamientos térmicos, habrían contribuido al crecimiento y coalescencia de las mismas.

Para comprobar ésta teoría sería necesario practicar un análisis al microscopio electrónico de barrido de las muestras sin haber sufrido ningún tratamiento térmico.

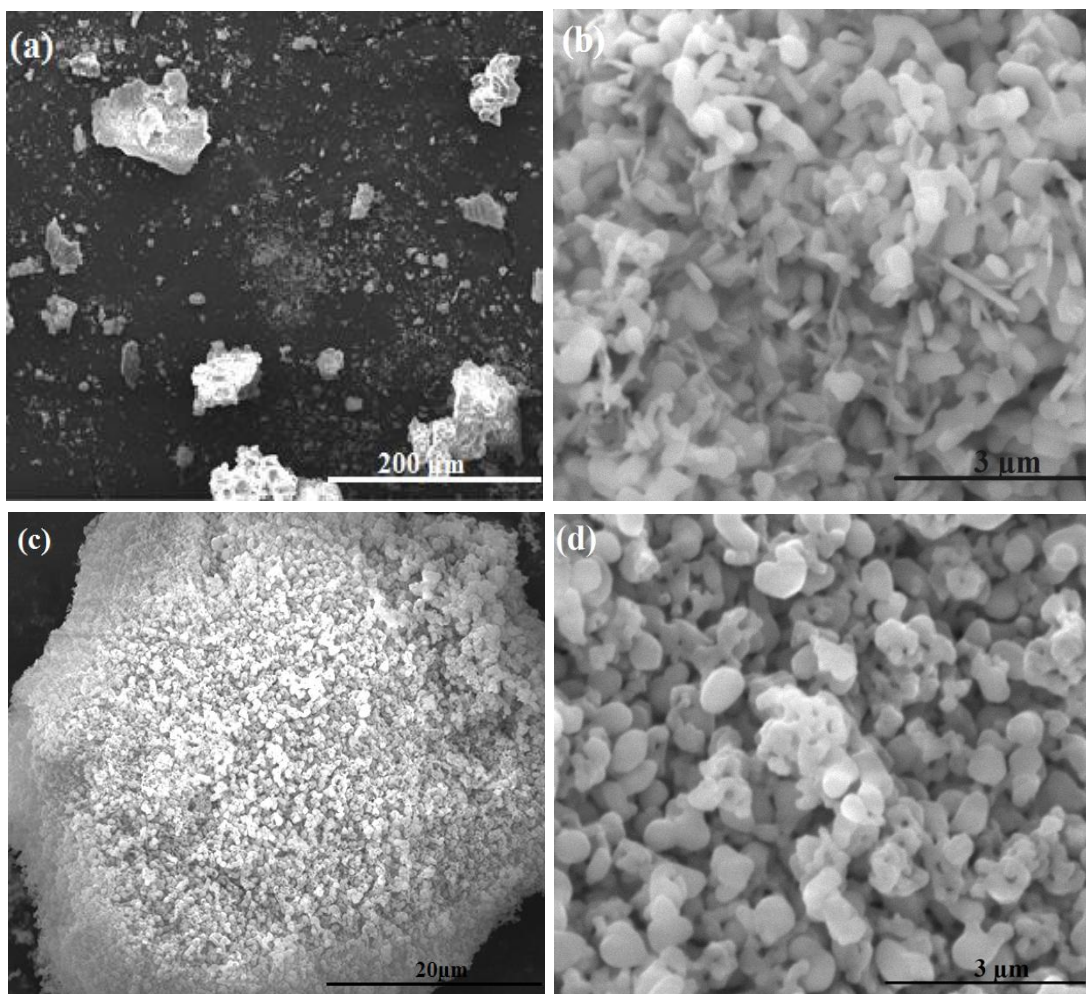


Figura 4.15 Micrografía (MEB) de la muestra T₁, región A en dos aumentos (a) 500X, (b) 30000X y región B en dos aumentos (c) 5000X y (d) 30000X.

En la Figura 4.16 se muestran los espectros de EDS junto con sus respectivas micrografías, practicadas en las regiones A y B de la muestra T₁ de polvo calcinado.

Es posible observar que ambas regiones tienen los mismos elementos Ca, P y Na, pero en diferentes proporciones.

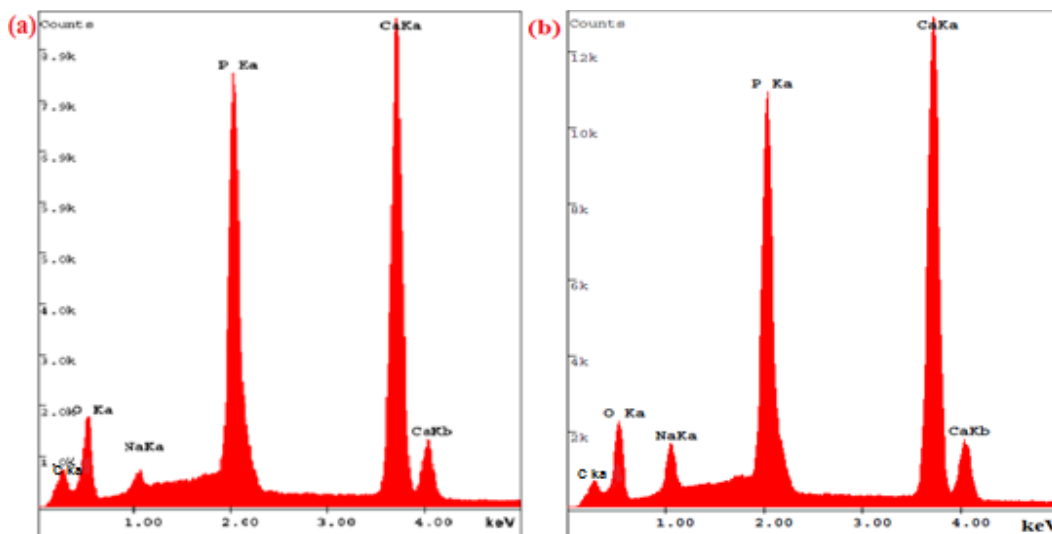


Figura 4.16. Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T_1 , en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

La Tabla 4.11, presenta los resultados del análisis semicuantitativo de EDS, obtenido para ambas regiones de la muestra T_1 .

La relación molar Ca/P, del análisis semicuantitativo obtenidos en base a la Hap, es $\text{Ca/P} \approx 1,38$ para la región A. La región B, presenta una relación $\text{Ca/P} \approx 1,41$. En ambas regiones se obtuvieron porcentajes considerables del elemento C.

Para esta muestra se identificaron tres fases. Hap con relación molar estequiométrica de $\text{Ca/P} = 1,67$, β -Renanita con relación molar estequiométrica $\text{Ca/P} = 1$ y β -TCP, con relación molar estequiométrica de $\text{Ca/P} = 1,5$.

Como se tienen varias fases presentes, se calculó la media relativa de Ca/P en ambas regiones, siendo 1,78 y 1,82 para las regiones A y B, respectivamente.

Los resultados obtenidos por el análisis EDS están en concordancia con la relación molar estequiométrica de las tres fases presentes. Sirven para inferir acerca de diferentes proporciones elementales en distintas regiones de la muestra.

Tabla 4.11 Análisis semicuantitativo EDS de la muestra T₁.

Análisis semicuantitativo de la muestra T1					
Región	% Ca	% P	% O	% C	%Na
A	37,56	21,12	24,99	14,74	1,59
B	38,67	21,27	24,57	11,03	4,45

En la Figura 4.17 se muestran las micrografías de la muestra T₂. Para esta muestra, se obtuvo todas en las regiones analizadas, morfologías similares.

En la Figura 17(a) se observa aglomerados de partículas al parecer de morfologías esféricas, tipo plaquetas sinterizadas. Un análisis con mayor aumento, Figura 17(b) fue capaz de demostrar que los aglomerados son de partículas esféricas, que al parecer coalescen unas a otras, de igual manera que en las muestras anteriores, para dar partículas de tamaños mayores.

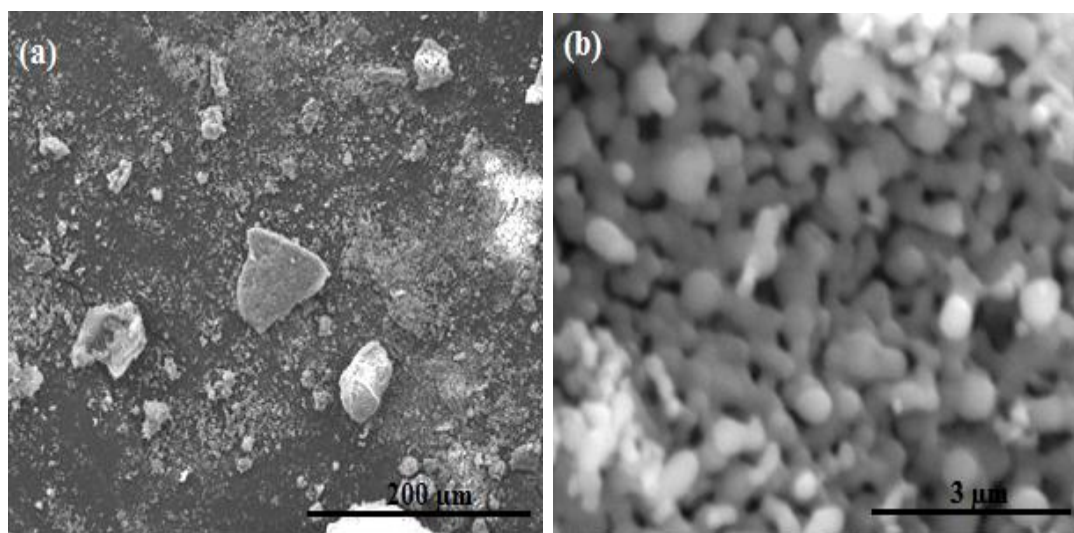


Figura 4.17. Micrografía (MEB) de la muestra T₂, en dos aumentos (a) 500X, (b) 30000X.

En la Figura 4.18 se muestran los espectros de EDS junto con sus respectivas micrografías, practicadas a dos regiones de la muestra T₂ de polvo calcinado.

Es posible observar que ambas regiones tienen los mismos elementos Ca, P y Na, pero en diferentes proporciones.

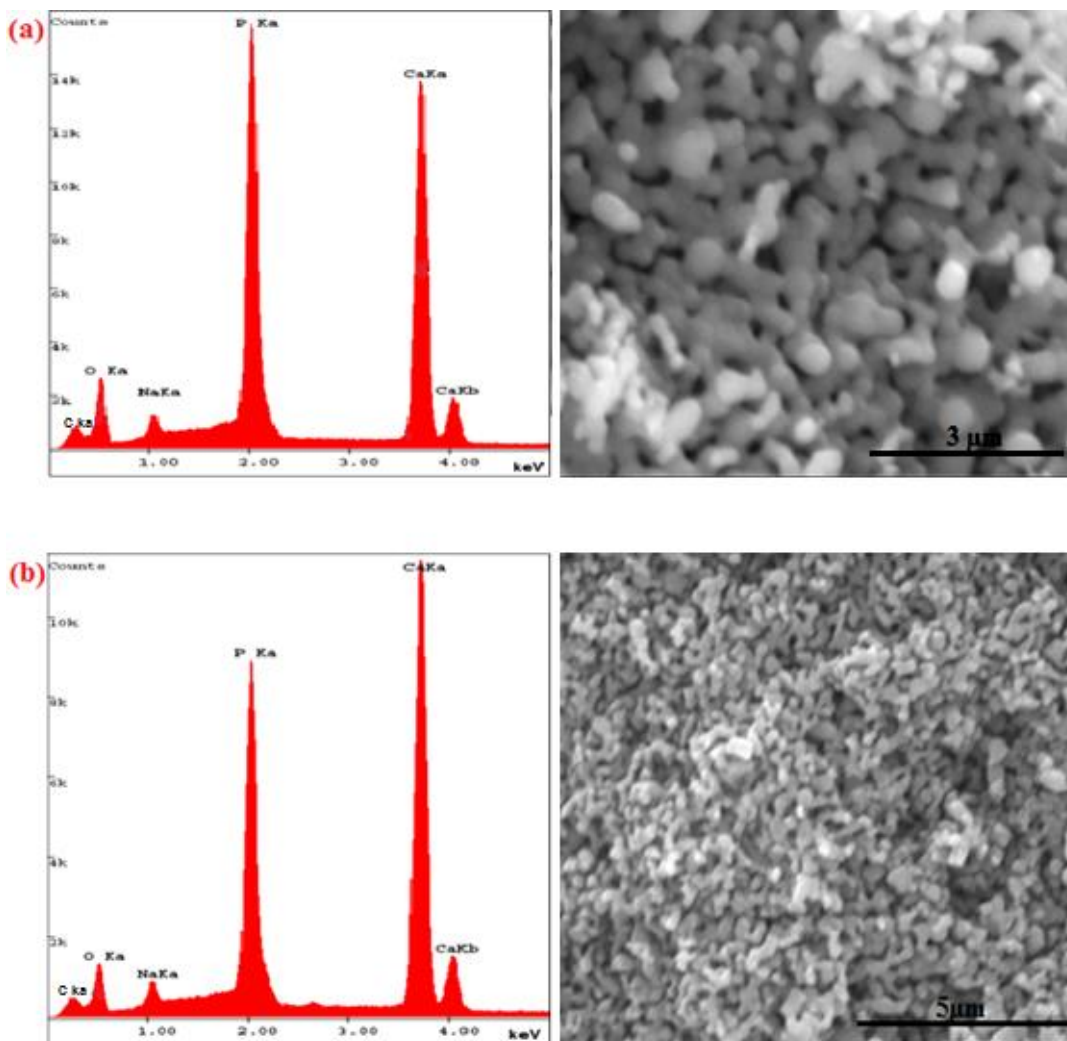


Figura 4.18 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T₂, en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

La Tabla 4.12, presenta los resultados del análisis semicuantitativo de EDS, obtenido para ambas regiones de la muestra T₂.

La relación molar Ca/P, del análisis semicuantitativo obtenidos en base a la Hap, es $\text{Ca/P} \approx 1,03$ para la región A. Además el análisis EDS de esta región arrojó 0,21 % de K, cantidad despreciable y considerada como impureza de los reactivos probablemente.

La región B presenta una relación $\text{Ca/P} \approx 1,53$.

En ambas regiones, se obtuvieron porcentajes considerables del elemento C.

Para esta muestra se identificaron tres fases. Hap con relación molar estequiométrica de $\text{Ca/P} = 1,67$, β -Renanita con relación molar estequiométrica $\text{Ca/P} = 1$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ con relación molar estequiométrica $\text{Ca/P} = 1$ y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ que contribuye al porcentaje del elemento Ca en la muestra.

Como se tienen varias fases presentes, se calculó la media relativa de Ca/P en ambas regiones, siendo 1,33 y 1,98 para las regiones A y B, respectivamente.

Los resultados obtenidos por el análisis EDS. Sirven para inferir acerca de diferentes proporciones elementales en distintas regiones de la muestra.

Tabla 4.12 Análisis semicuantitativo EDS de la muestra T₂.

Análisis semicuantivo de la muestra T₂					
Región	% Ca	% P	% O	% C	%Na
A	35,41	26,56	24,52	10,99	2,31
B	44,18	22,31	20,82	10	2,68

En la Figura 4.19, se muestran las micrografías de la muestra T₃. Para esta muestra, se obtuvo en todas las regiones analizadas, morfologías similares.

En la Figura 4.19(a) se observa aglomerados de partículas al parecer de morfologías esféricas, tipo plaquetas sinterizadas.

Un análisis con mayor aumento, Figura 4.19(b), pudo demostrar que los aglomerados son de partículas esféricas que al parecer coalescen unas a otras para dar partículas de tamaños mayores. Este fenómeno se presentó prácticamente en todas las muestras.

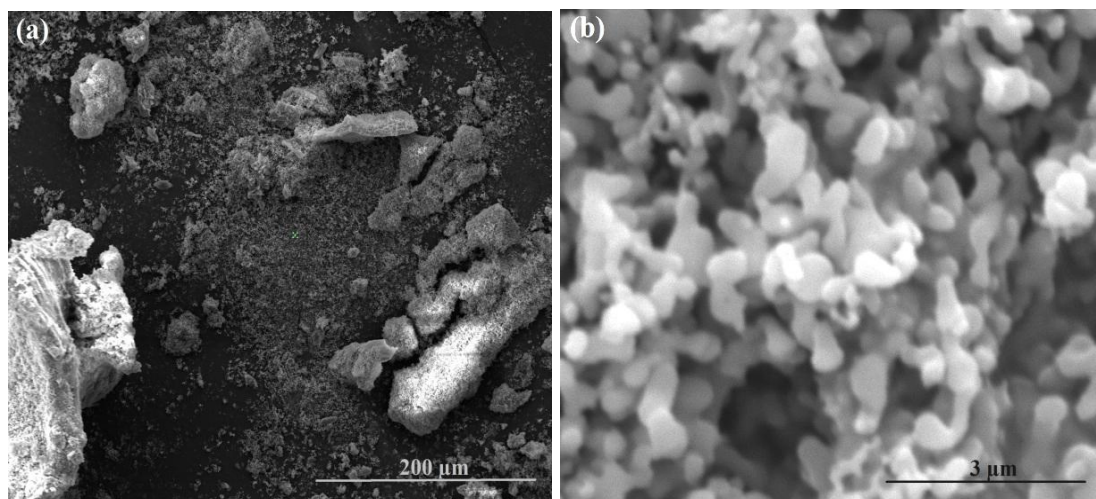


Figura 4.19. Micrografía (MEB) de la muestra T₃, en dos aumentos (a) 500X, (b) 30000X.

En la Figura 4.20 se muestran los espectros de EDS junto con sus respectivas micrografías, practicadas a dos regiones de la muestra T₃ de polvo calcinado.

Es posible observar que ambas regiones tienen los mismos elementos Ca, P y Na, pero en diferentes proporciones.

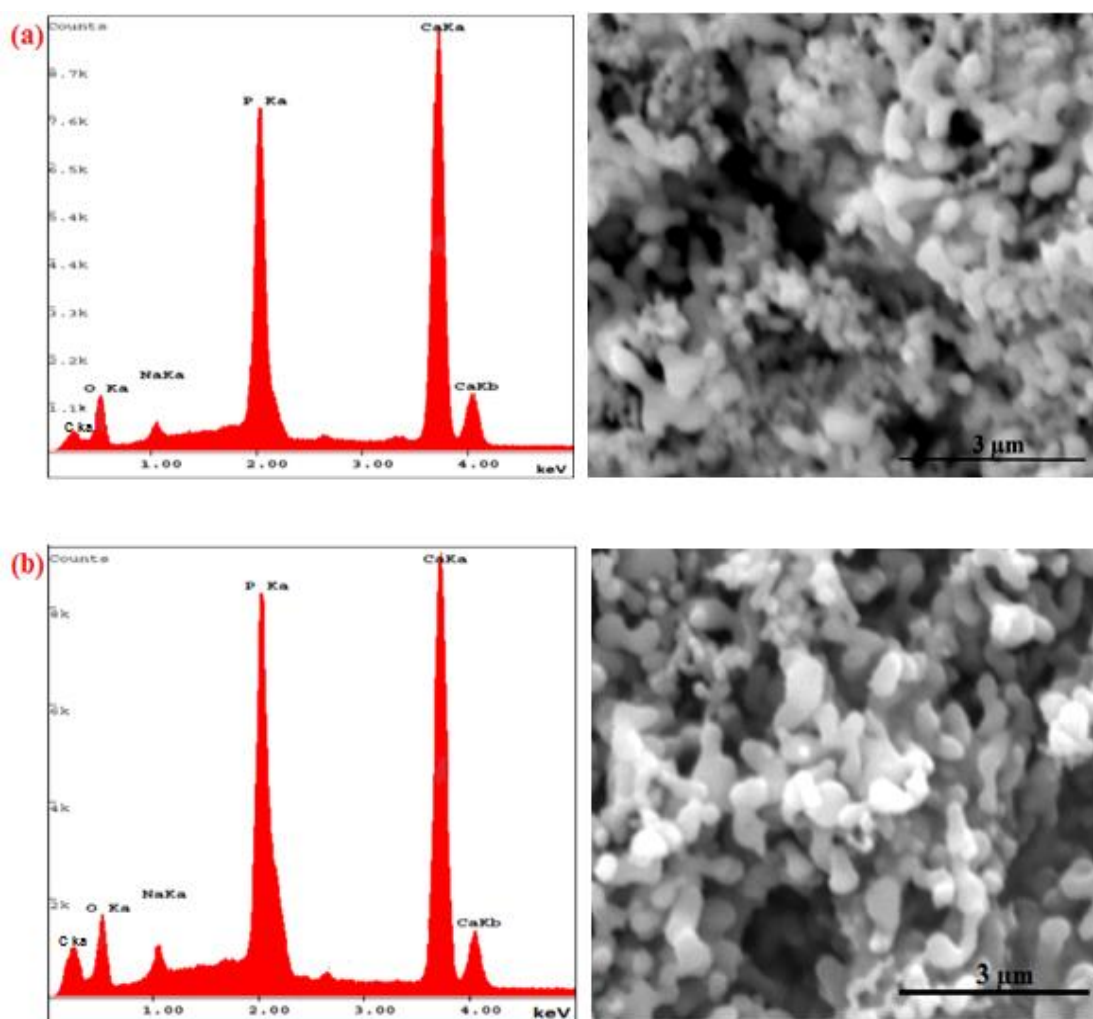


Figura 4.20 Espectro EDS y micrografía del polvo calcinado de la muestra T_3 , en dos regiones, (a) región A y (b) región B.

La Tabla 4.13 presenta los resultados del análisis semicuantitativo de EDS obtenido para ambas regiones de la muestra T_3 .

La relación molar Ca/P, del análisis semicuantitativo calculados en base a la Hap estequiométrica, es $Ca/P \approx 1,46$ para la región A. Además el análisis EDS de esta región arrojó 0,58 % de K y 0,21% de Cl, cantidades despreciables y consideradas como impurezas de los reactivos probablemente.

La región B presenta una relación Ca/P \approx 1,34.

En ambas regiones, se obtuvieron porcentajes considerables del elemento C.

Para esta muestra se identificaron tres fases. Hap con relación molar estequiométrica de Ca/P = 1,67, β -Renanita con relación estequiométrica Ca/P = 1 y β -TCP, con relación estequiométrica de Ca/P = 1,5.

Como se tienen varias fases presentes, se calculó la media relativa de Ca/P en ambas regiones, siendo 1,88 y 1,73 para las regiones A y B respectivamente.

Los resultados obtenidos por el análisis EDS, están muy en concordancia con la relación estequiométrica de las tres fases presentes, pero no son confiables cuantitativamente. Sirven sólo para inferir acerca de diferentes proporciones elementales en distintas regiones de la muestra.

Tabla 4.13 Análisis semicuantitativo EDS de la muestra T₃.

Análisis semicuantitativo de la muestra T₃					
Región	% Ca	% P	% O	% C	%Na
A	44,12	23,41	21,59	8,27	1,83
B	38,88	22,45	24,71	10,25	3,09

Para la parte experimental, los resultados del análisis MEB/EDS de las muestras T₀, T₁, T₂ y T₃ están en acuerdo con el análisis de DRX, FTIR obtenidos anteriormente; donde se observa la presencia de un polvo cristalino con varias fases en la muestra.

Además, los resultados obtenidos del análisis de FRX, arrojan una relación molar Ca/P \approx 2, indicando la posible presencia de Hap carbonatada y otras fases posibles en la muestra, que posteriormente fueron encontradas con los análisis de DRX y FTIR.

4.2.5 Determinación del área superficial, BET

El análisis de área superficial fue realizado para las muestras T₀, T₁, T₂ y T₃. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14 Resultados del análisis BET para las diferentes muestras.

Muestra	Área superficial BET (m ² /g)	Volumen total de poro (cm ³ /g)		Tamaño de poro (Å)	
		Adsorción	Desorción	Adsorción	Desorción
T0	2,7235	0,005446	0,004533		
T1	2,9535	0,006404	0,005258	86,7238	71,2071
T2	2,1458	0,004669	0,003589	87,0271	66,8964
T3	2,8087	0,006675	0,005335	95,0546	75,976

El área superficial BET fue similar, en todas las muestras. Eso significa que el tiempo de envejecimiento no tuvo gran influencia en el tamaño de partícula.

Podría ser debido a que todas las muestras fueron sometidas a las mismas condiciones de proceso, siendo la temperatura de calcinación de 800°C. A esta temperatura se podría esperar que haya ocurrido sinterización de las partículas, cuyas temperaturas de fusión sean próximas a 800°C. Por el análisis MEB, se observó la coalescencia de partículas pequeñas en otras mayores y el inicio del proceso de sinterización con la respectiva formación de cuello entre las partículas.

Esto nuevamente hace suponer, que el tamaño inicial de las partículas obtenidas en el gel, fue nanométrico y los posteriores tratamientos térmicos de secado y calcinación provocaron el aumento del tamaño de partícula, como se afirmó en trabajos anteriores [Bose et al., 2003; Bianco et al., 2009; Kapoor et al., 2011].

CONCLUSION

Acerca de la fase pre-experimental, se concluye lo siguiente:

La ruta de síntesis sol-gel ejerce una influencia evidente en las fases obtenidas para los materiales de fosfato de calcio.

Se obtuvieron diferentes morfologías de las partículas de acuerdo al método de síntesis estudiado.

Se ha demostrado que la velocidad de mezcla de los precursores, así como la presencia de un modificador orgánico en la solución precursora, puede dar diferentes resultados en cuanto a las fases de fosfatos de calcio y a la morfología de las partículas obtenidas.

La metodología practicada en el método I, resultó en las fases de CaO e Ca(OH)_2 , junto con la Hap.

Las metodologías practicadas en los métodos II y III fueron muy simples, de bajo costo y produjeron partículas de fosfato de calcio basadas en fases de β -TCP e Hap.

Se obtuvieron dos morfologías diferentes de partículas, de plaquetas sinterizadas y muy aglomeradas entre las mismas y en forma de varillas alargadas, las cuales aparentemente coinciden con cristales individuales denominados “wiskers”.

En el método IV, utilizando EDTA.2Na como modificador orgánico se obtuvieron partículas de morfología esféricas parecidas a plaquetas sinterizadas.

La muestra calcinada a 800°C del método IV presentó un fosfato bifásico de Hap y β -Renanita. Esto puede ser debido a la liberación de cationes de Na^+ en solución, que no fueron eliminados del medio y reaccionan para dar la fase β -Renanita.

Es la primera vez que se obtuvo este material bifásico de Hap y β -Renanita mediante la ruta sintética del método IV. Se ha demostrado un aumento de solubilidad de este biomaterial bifásico, con respecto a la fase de Hap pura.

Las imágenes micrográficas MEB de las muestras obtenidas para los diferentes métodos de prueba, reveló la formación de partículas de tamaño micrométrico.

Acerca de la fase experimental, se concluye lo siguiente:

Para una síntesis a mayor escala y en las condiciones estudiadas del método IV, los resultados del pre-experimento no fueron reproducibles.

El tiempo de envejecimiento no afectó el tamaño de partícula, pero si las fases presentes.

La técnica FTIR evidenció la presencia de cerámicas de fosfato de calcio compuestas por Hap-carbonatada en todas las muestras tanto de la fase experimental como pre-experimental.

Las imágenes micrográficas MEB de las muestras obtenidas para diferentes tiempos de envejecimiento, reveló la formación de partículas de tamaño micrométrico.

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Estudiar para los métodos II y III que presentaron fases biocompatibles de Hap y β -TCP, la influencia de los diferentes parámetros que afectan al proceso, tales como: velocidad, temperatura y tiempo de mezcla de los precursores, así como la influencia de diferentes tiempos de envejecimiento para cada una de tales variables.

Realizar la caracterización cuantitativa por DRX y el método Rietveld, de manera a conocer la proporción cuantitativa de las fases presentes para el método II, III y IV.

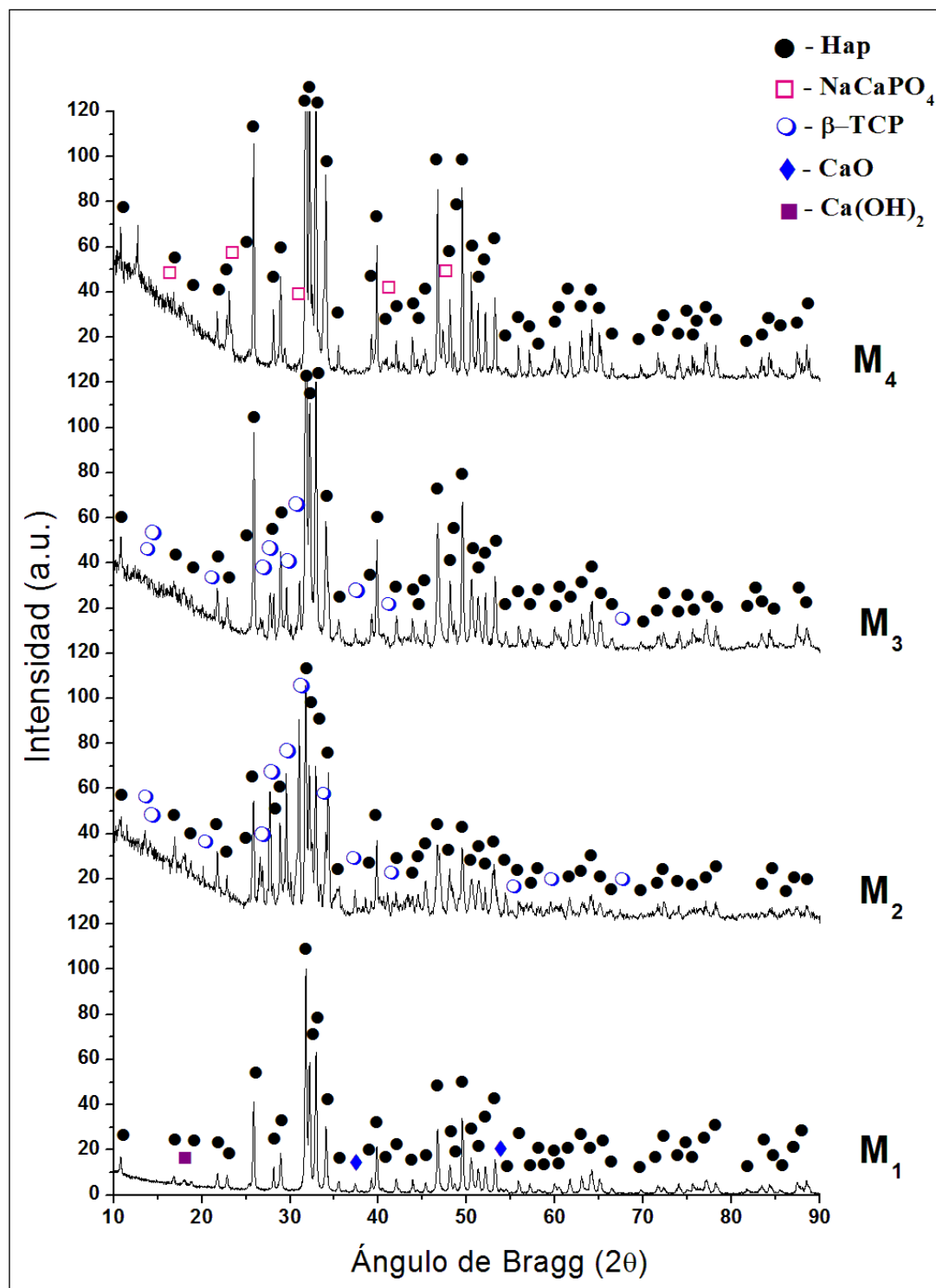
Realizar la calcinación de las muestras en vacío para comparar los resultados con los realizados con atmosfera de aire y el efecto de las reacciones con el C del CO₂ atmosférico.

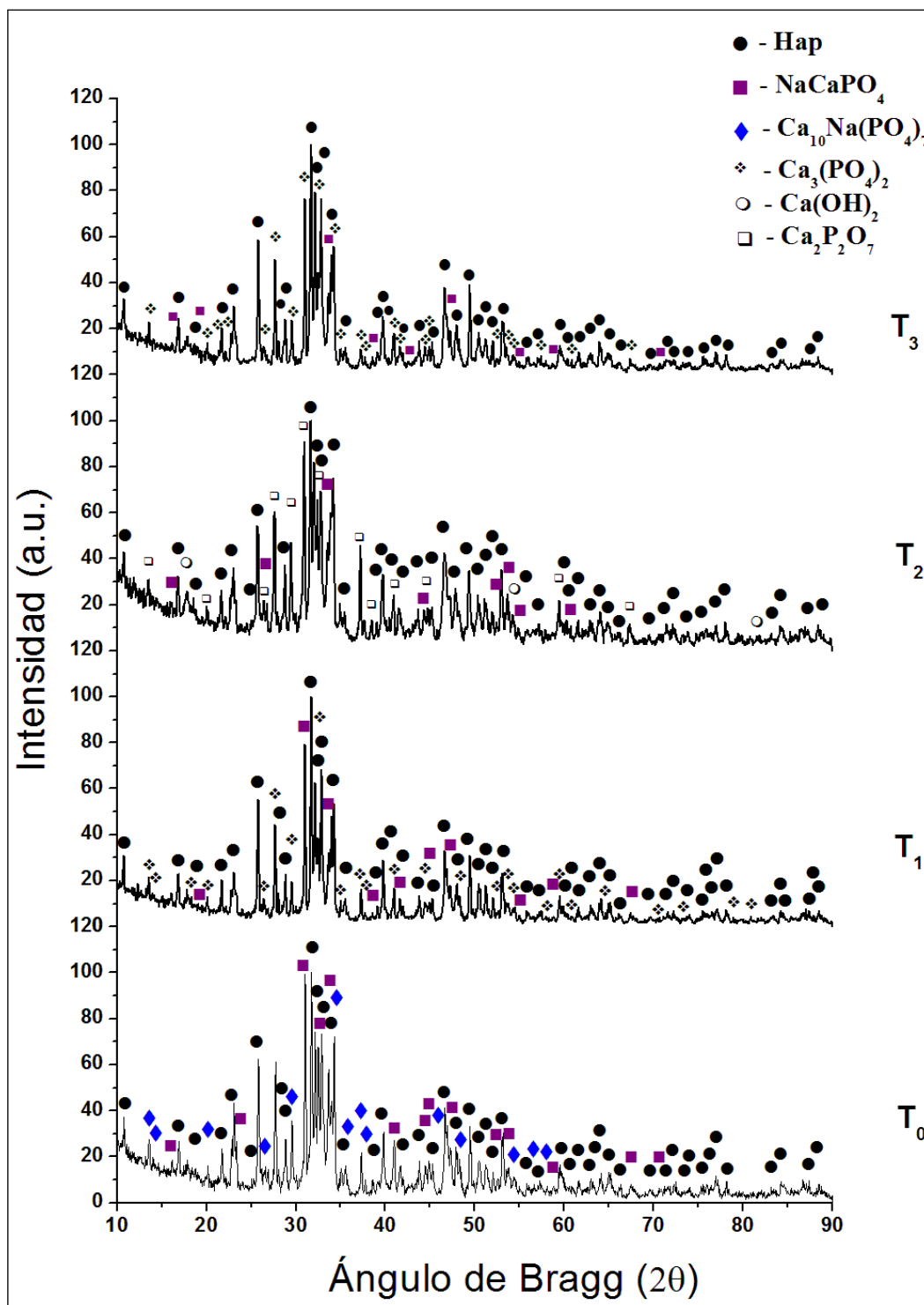
Caracterizar cuantitativamente las fases obtenidas en las muestras T₁ y T₃, a fin de realizar posteriormente estudios sobre el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de esta cerámica trifásica (Hap - β -TCP y β -Rhenanite).

ANEXOS

ANEXO A – Marcas registradas de fosfatos de calcio bifásico, trifásico y multifásico producidos comercialmente.

Ortofosfato de calcio	Nombre comercial y proctor
BCP (Hap + β -TCP)	4Bone (MIS, Israel)
	BCP BiCalPhos (Medtronic, MN)
	Biosel (Depuy Bioland, France)
	BonaGraft (Biotech One, Taiwan)
	BoneCeramic (Straumann, Switzerland)
	BoneSave (Stryker Orthopaedics, NJ)
	Calcicoat (Zimmer, IN)
	Calciresorb (Ceraver, France)
	CellCeram (Scaffdex Oy, Finland)
	Ceraform (Teknimed, France)
	Ceratite (NGK Spark Plug, Japan)
	CuriOs (Progentix Orthobiology BV, The Netherlands)
	Eurocer (FH Orthopedics, France)
	GenPhos Hap TCP (Baumer, Brazil)
	Graftys BCP (Graftys, France)
	Hatric (Arthrex, Naples, FL)
	Hydros (Biomatlante SA, France)
	Indost (Polystom, Russia)
	Kainos (Signus, Germany)
	MasterGraft Granules (Medtronic Sofamor Danek, TN)
	MBCP (Biomatlante SA, France)
	OrthoCer Hap TCP (Baumer, Brazil)
	OpteMx (Exactech, FL)
	OsSatura BCP (Integra Orthobiologics, CA)
	ossceram nano (Bredent Medical, Germany)
	Osteosynt (Einco, Brazil)
	Ostilic (Stryker Orthopaedics, NJ)
ReproBone (Ceramisys, UK)	
SBS 60/40 (ExpanScience, France)	
Scaffdex (Scaffdex Oy, Finland)	
TCH (Kasios, France)	
TriOsite (Zimmer, IN)	
Tribone 80 (Stryker, Europe)	
BCP (Hap + α -TCP)	Skelite (Millennium Biologix, Canada)
BCP (Hap + β -TCP) / collagen	Allograft (Zimmer, IN)
	Collagraft (Zimmer, IN)
BCP (Hap + β -TCP) / fibrin	TricOS (Baxter BioSurgery, France)
BCP (Hap + β -TCP) / silicon	FlexHA (Xomed, FL)
FA + BCP (Hap + β -TCP)	FtAP (Polystom, Russia)

ANEXO B – Difractograma de DRX para los polvos M_1 , M_2 , M_3 y M_4 .

ANEXO C - Difractograma de DRX para los polvos T₁, T₂, T₃ y T₄.

ANEXO D - Ficha cristalográfica de la Hap-carbonatada.

Name and formula

Reference code: 00-004-0697
 Mineral name: **Carbonate-apatite**
 PDF index name: Calcium Carbonate Phosphate Hydroxide
 Empirical formula: **Ca₁₀H₂O₂₆P₆**
 Chemical formula: **Ca₁₀(PO₄, CO₃OH)₆(OH)₂**

Crystallographic parameters

Crystal system: Unknown
 RIR: -

Status, subfiles and quality

Status: Marked as deleted by ICDD
 Subfiles: Inorganic
 Mineral
 Quality: Blank (B)

Comments

Deleted by: Berry parcel August 5, 1960, for Set 12.
 General comments: Reference reports hexagonal.

References

Primary reference: Prien, Frondel., *Private Communication*, **57**, 949, (1947)

Peak list

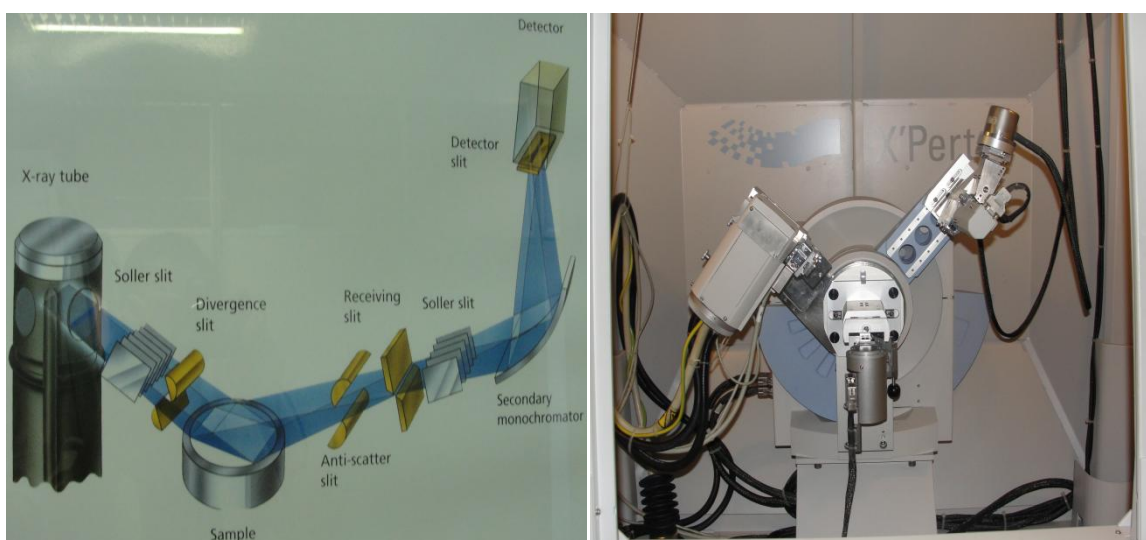
No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1				4,08000	21,765	20,0
2				3,90000	22,783	20,0
3				3,44000	25,879	80,0
4				3,18000	28,037	10,0
5				3,08000	28,967	20,0
6				2,82000	31,704	100,0
7				2,71000	33,027	90,0
8				2,62000	34,196	50,0
9				2,52000	35,598	10,0
10				2,25000	40,041	60,0
11				2,14000	42,195	10,0
12				2,06000	43,917	10,0
13				2,00000	45,306	10,0
14				1,92000	47,306	70,0
15				1,89000	48,104	30,0
16				1,83000	49,787	70,0
17				1,80000	50,674	40,0
18				1,77000	51,596	40,0
19				1,75000	52,230	40,0
20				1,64000	56,029	20,0

ANEXO E - Micromeritics ASAP 2020 Surface Area and Porosity Analyzer.

ANEXO F – “Difractómetro X” Pert Pro-Panalytical” –X.

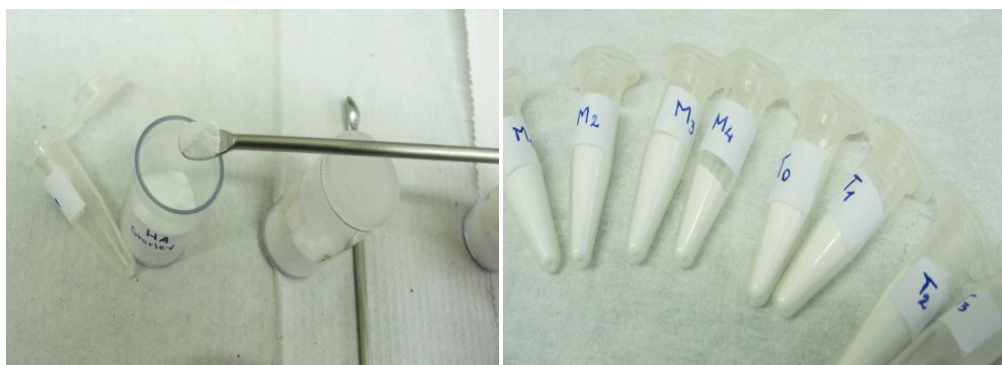


Fotografía del equipo de DRX.

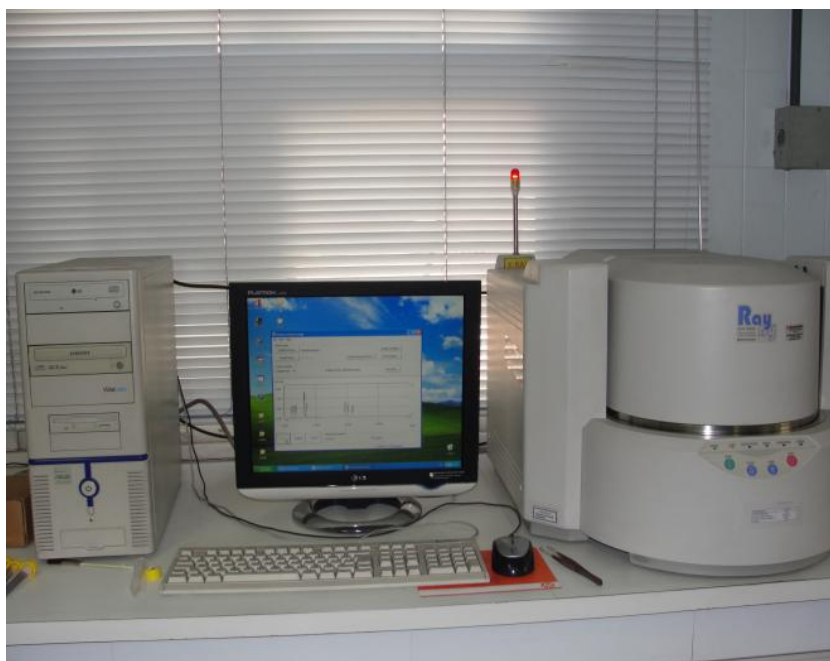


Esquema de funcionamiento de un difractómetro de rayos X

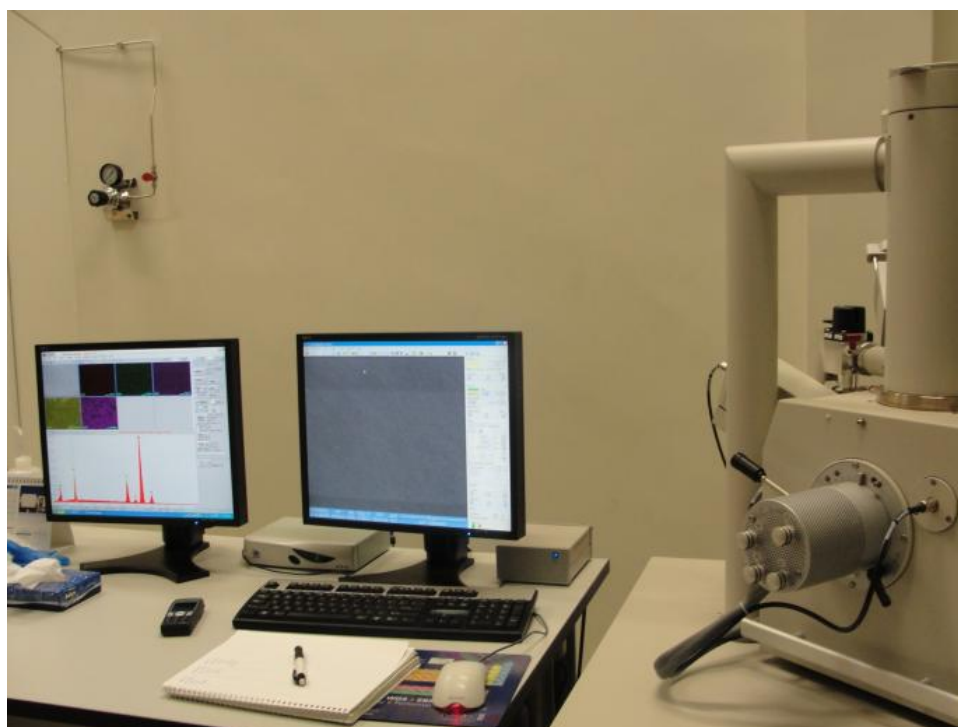
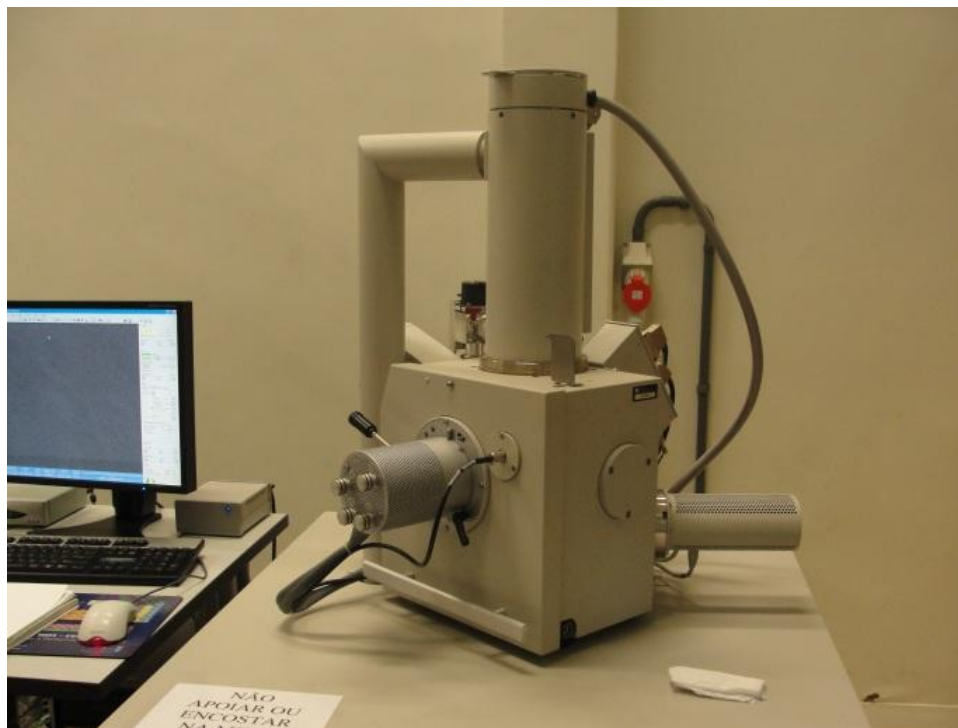
ANEXO G – Muestras del polvo de los fosfatos de calcio de calcio obtenidos por calcinación a 800°C.




ANEXO H – Espectrofotómetro de fluorescencia de rayos-X por energía dispersiva, “EDX 700 HS”



ANEXO I – Microscopio electrónico de barrido y energía dispersiva de rayos X (SEM-EDS), “FEI Inspect S” del CENANO/INT



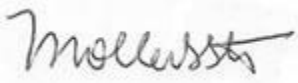
ANEXO J – Carta de aceptación de este trabajo para el COLAOB.

São Paulo, 08 de maio de 2012

Prezado Autor (a), Shirley Johanna Magalí Duarte Chávez

Temos o prazer de informar que o seu resumo intitulado: ***DIFFERENT ROUTES FOR OBTAINING HYDROXYAPATITE BY SOL-GEL*** foi aceito para apresentação em forma de **Poster** (posteriormente enviaremos a data e o horário) no 7º COLAOB – Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Lembramos que 28/06/2012 é a data limite para submissão do trabalho completo, cujo modelo se encontra no site www.metallum.com.br/7colaob. Recomendamos fortemente a reserva dos hotéis com antecedência devido ao grande número de trabalhos inscritos e a existência de outros eventos no mesmo período. Os pôsteres devem ser escritos em inglês com tamanho máximo de 120 cm x 90 cm (orientação tipo retrato).

Atenciosamente,



Mirella Oller Souza Santos
Gerente de Eventos

ANEXO K – Carta de aceptación de este trabajo para el CBECIMAT

CBECIMAT

Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais
04 a 08 de Novembro de 2012
Joinville - SC - Brasil

São Paulo, 04 de setembro de 2012

Prezado Autor (a), Shirley Johanna Magali Duarte Chávez

Temos o prazer de informar que o seu trabalho completo: *Comparison of sol-gel routes for synthesis of calcium phosphates* foi aceito para apresentação no 20º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

Atenciosamente,



Mirella Oller Souza Santos
Gerente de Eventos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. F. Aguado, Obtención y caracterización de nuevos cementos óseos de fosfatos de calcio en el sistema $\text{CaHPO}_4\text{---Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TDR B.26657-2008 (1996) [en línea]. Disponible en: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/6056>. Consultado: Abril 15, 2012.
- [2] K. Agrawal, G. Singh, D. Puri, S. Prakash. *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering* 10(8) (2011) 727-734.
- [3] M. Aizawa, A. E. Porter, S. M. Best, W. Bonfield. *Biomaterials* 26 (2005) 3427-3433.
- [4] H. Aoki. *Medical Applications of Hydroxyapatite*. Takayama Press System Center Co., Inc. 94-75937; (1994).
- [5] J.L. Arias, F.J. García-Sanz, M.B. Mayor, S. Chiussi, J. Pou, B. León, M. Pérez-Amor. *Biomaterials* 19 (1998) 883.
- [6] M.E. Bahrololoom, M. Javidi, S. Javadpour, J. Ma. *J Ceram Process Res* 10 (2009) 129-138.
- [7] S. Ban, S. Maruno, N. Arimoto, A. Hanada, J. Hasegawa. *J Biomed Mater Res*. 36 (1997) 9-15.
- [8] M. Benahmed, J.M. Bouler, D. Heymann, O. Gan, G. Daculsi. *Biomaterials* 17 (1996) 2173-2178.
- [9] O. Bermudez, M.G. Boltong, F.C.M. Driessens, M.P. Ginebra, E. Fernandez, J.A. Planell. *Biomaterials* 15 (1994) 1019-1023.
- [10] E.P. Bertin. *Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis*. New York. Plenum Press. (1970).
- [11] G. Bezzi, G. Celotti, E. Landi, T.M.G. La Torretta, I. Sopyan, A. Tampieri. *Mat Chem Phys* 78 (2003) 816-824.

- [12] A. Bianco, I. Cacciotti, M. Lombardi, L. Montanaro. *Mater Res Bull* 44 (2009) 345-354.
- [13] J. Black. *Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, (1992).
- [14] I. Bogdanoviciene, A. Beganskiene, K. Tõnsuaadu, J. Glaser, H.-J. Meyer, A. Kareiva. *Mat Res Bull* 41 (2006) 1754-1762.
- [15] G. Bonel. *Ann Chim* 7 (1972) 65.
- [16] S. Bose, S.K. Saha. *Chem Mater* 15 (2003) 4464-4469.
- [17] D.C. Bradley, R.C. Mehrotra, D.P. Guar. *Metal Oxides*. London: Academic Press, (1978).
- [18] P.I. Bränemark. *Tissue-Integrated Prostheses*. Quintessence Publishing co. (1986), pp. 99-116
- [19] T. Brendel, Engel, C. Russel. *J Mater Sci.: Mater. Med.* 3 (1992) 175-179.
- [20] W.E. Brown, *Nature* 196 (1962) 1048.
- [21] C.J. Buchko, K.M. Kozloff, D.C. Martin. *Biomaterials* 22 (2001) 1289.
- [22] E. Caroline, F.D. Gnanam. *Biomater Artif Organs* 16 (2002) 12-4.
- [23] C.s. Chai, K.a. Gross, K. Kannagara, B. Ben-nissan, L. Hanley, P. Layrolle. *Chemistry and Critical Ageing of Hydroxyapatite Sol-Gel Solutions*, In: *Bioceramics Volume 11 [Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine]*. New York : Eds.: R.Z. LeGeros and J.P. Le-Geros, (1998), p. 101-104.
- [24] S.K. Chapman. In: *Working with a Scanning Electron Microscope*. Orpington, Kent, UK. Lodgemark Press, (1986).
- [25] J. Chen, Y. Wang, X. Chen, L. Ren, Ch. Lai, W. He, Q. Zhang. *Mater Lett* 65 (2011) 1923-1926.

- [26] J. Choueka, J.L. Charvet, H. Alexander, Y.H. Oh, G. Joseph, N.C. Blumenthal, W.C. Lacourse. *J Biomed Mater Res* 29 (1995) 1309-15.
- [27] D. Choi, K. Marra, P.N. Kumta. *Materials Research Bulletin* 39 (2004) 417-432.
- [28] M.B. Conz, J. M. Granjeiro, G. de Almeida Soares. *Journal of Applied Oral Science* 13(2) (2005) 136-40.
- [29] J.R. Davis. *Handbook of materials for medical devices*. Materials Park, OH: ASM International (2003).
- [30] C. Dayanand, G. Nhkshamaiah, V. Jaya Tyagaraju, M. Salagram, A.S.R. Krishana Murthy. *J Mat Sci* 31 (1996) 1945.
- [31] K. De Groot. *Biomaterials* 1 (1980) 47-50.
- [32] K. De Groot. *Bioceramics of calcium phosphate*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., (1983).
- [33] K. De Groot. *Tissue Eng* 4 (1998) 337.
- [34] L. Di Silvio, M.J. Dalby, W. Bonfield. *Biomaterials* 23 (2002) 101.
- [35] W.J.A. Dhert. "Plasma-Sprayed Coatings and Hard-Tissue Compatibility. A Comparative Study". In: *Fluoroapatite, Magnesiumwhitlockite and Hydroxyapatite*. Ablasserdam: Ed.: B.V., Haveka. Offsetdrukkerij, (1992), p. 4-6.
- [36] E.I. Dorozhkina, S.V. Dorozhkin. *Chem Mater* 14 (2002) 4267-72.
- [37] S.V. Dorozhkin. *Russ Chem Bull Int Ed*, 52 (2003) 2369-75.
- [38] S.V. Dorozhkin/*BIO* 1 (2011) 1-51.
- [39] S.V. Dorozhkin. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 963-977.
- [40] F.C.M. Driessens. *Monographs in oral science*. v. 10. Basel: Karger (1982).

[41] F.C.M. Driessens, M.M.A. Ramselaar, H.G. Schaeken, A.L.H. Stols, P.J. van Mullem. *J Mater Sci: Mater Med* 3 (1992) 413– 417.

[42] F.C.M. Driessens, J.A. Planell, F.J. Gil. Calcium phosphate bone cements. In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part B. Applications*, DL Wise, D.J. Trantolo, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, J.D. Gresser, E.R. Schwarz, New York, , USA, Eds.: Marcel Dekker Inc., (1995).

[43] F.C.M. Driessens. *Fourth Euro Ceramics* 8 (1995) 77-83.

[44] T.D. Driskell. Early History of Calcium Phosphate Materials and Coatings in Characterization and Performance of Calcium Phosphate Coatings for Implants. In: *ASTM STP 1196, Philadelphia*, Eds.: E. Horowitz and J E Parr, Eds., American Society for Testing and Materials, (1994).

[45] E.D. Eanes, I.H. Gillesen, A.S. Posner. *Nature* 208 (1965) 365.

[46] J.C. Elliott. *J Appl Cryst* 13 (1980) 618.

[47] J.C. Elliot. Structures and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. *Studies in Inorganic Chemistry* 18. Amsterdam: Elsevier, (1994).

[48] S. Fujibayashi, M. Neo, H-M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura. *Biomaterials* 25 (2004) 443-450.

[49] P.V. Giannoudis, H. Dinopoulos, E. Tsiridis. *Injury* 36 (2005) S20-S27.

[50] I.R. Gibson, I. Rehman, S.M. Best, W. Bonfield. *J Mater Sci Mater Med* 11 (2000) 799-804.

[51] M.R. González, J.A. Solórzano, Encuentro de Historia de Cantabria (2º 2002 Santander). Servicio de publicaciones de la Universidad de Cantabria.

[52] P.J. Goodhew, F.J. Humphreys. In: *Electron Microscopy and Analysis*. London: Taylor & Francis, (1988).

[53] G. Guo, Y. Sun, Z. Wang, H. Guo. *Ceram Int* 31 (2005) 869-872.

- [54] P. Habibovic, J. Li, C.M. Van Der Valk, G. Meijer, P. Layrolle, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot. *Biomaterials* 26 (2005) 23.
- [55] T. Hanawa. Titanium and Its Oxide Film. A Substrate for Formation of Apatite, In: *The Bone-Biomaterial Interface*, Ed.: J.E.Davies. Toronto: University of Toronto Press. Chapter 4, (1991) p. 49-61.
- [56] L.L. Hench, E.C. Ethridge. *Biomaterials: An interfacial approach*. New York: Academic Press (1982).
- [57] L.L. Hench. "Ceramic Glasses and Glasses Ceramics". In: *Biomaterials Science: An Introductory Text*, Eds.: B.D. Ratner and A.S. Hoffman, Orlando: Academic Press (1991).
- [58] L.L. Hench. *J Am Ceram Soc* 74 (1991) 1487-1510.
- [59] L.L. Hench, J.M. Polak. *Science* 295 (2002) 1014-17.
- [60] J.C. Heughebaert, G. Montel. *Calcif. Tissue Int.* 34 (1982) 103.
- [61] K.A. Hing, S.M. Best, K.E. Tanner, W. Bonfield, P.A. Revell. *J Biomed Mater Res* 68 (2004) 187-200.
- [62] S.F. Hulbert, J.C. Bokros, L.L. Hench, J. Wilson, G. Heimke. In: *Ceramics in Clinical Applications*. Ed.: P. Vincenzini. Amsterdam: Elsevier, (1987) p. 3.
- [63] K. Hwang, J. Song, B. Kang, Y. Park. *Surf Coat Tec* 123 (2000) 252-255.
- [64] Hygazy A A & Bridge B, *J Mat Sci*, 20 (1985) 2345.
- [65] H. Ishizawa, M. Fujino, M. Ogino. *J Biomed Mater* 29 (1995) 1459- 1468.
- [66] S. Jalota, S.B. Bhaduri, A. C. Tas. *Wiley InterScience* (2006) DOI: 10.1002/jbm.b 30598.
- [67] A.M. Janus, M. Farina, K. Haberko, A. Rakowska, T. Panz. *Mikrochim Acta* 161 (2008) 349-353.

- [68] S. Joschek, B. Nies, R. Krotz, A. Goepferich. *Biomaterials* 21 (2000) 1645-1658.
- [69] S. Kamakura, Y. Sasano, T. Shimizu, K. Hatori, O. Suzuki, M. Kagayama, K. Motegi. *J Biomed Mater Res* 59 (2002) 29-34.
- [70] S. Kapoor, U. Batra, S. Kohli. *Journal of Materials Engineering and Performance* (2011) DOI: 10.1007/s11665-011-0059-1.
- [71] I. Kim, P.N. Kumta. *Mat Sci Eng B111* (2004) 232-236.
- [72] H-W. Kim, H-E. Kim, V. Salih, J.C. Knowles. *Willey Interscience* (2004) DOI: 10.1002/jbm.b.30073.
- [73] N. Kivrak, A.C. Taş. *J Am Ceram Soc* 81 (1998) 2245-52.
- [74] H.P. Klug, L.E. Alexander. In: *X-ray Diffraction Procedures*, 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. (1974).
- [75] C. Knabe, G. Berger G, R. Gildenhaar, C.R. Howlett, B. Markovic, H. Zreiqat. *Biomaterials* 25 (2004) 335-344.
- [76] G.C. Koumoulidis, A.P. Katsoulidis, A.K. Ladavos, P.J. Pomonis, Ch. C. Trapalis, A.T. Sdoukos, T.C. Vaimakis. *J Coll Inter Sci* 259 (2003) 254-260.
- [77] S. Koutsopoulos. *J Biomed Mater Res* (2002); 62:600-12.
- [78] A. Krajewski, M. Mazzocchi, P.L. Buldini, A. Ravaglioli, A. Tinti, P. Taddei, C. Fagnano. *Journal of Molecular Structure* 744-747 (2005) 221-228
- [79] G. Kumar, A. Thamizhavel, E.K. Girija. *Materials Letters* 76 (2012) 198-200.
- [80] S.H. Kwon, Y.K. Jun, S.H. Hong, H.E. Kim. *J Eur Ceram Soc* 23 (2003) 1039-1045.
- [81] D. Le Nihouannen, G. Daculsi, A. Saffarzadeh, O. Gauthier, S. Delplace, P. Pilet, P. Layrolle. *Bone* 36 (2005) 1086.

- [82] B. León, J.A. Jansen. In: *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*. Springer Science + Business Media, LLC (2009), p. 26.
- [83] R.Z. LeGeros, O.R. Trauz, J.P. LeGeros. *Science* 155 (1967) 1409.
- [84] R.Z. LeGeros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*. Monographs in Oral Science. v. 15. Basel, Karger (1991).
- [85] S.H. Li, J.R. De Wijn, P. Layrolle, K. De Groot. *J Biomed Mater Res* 61 (2002) 109.
- [86] S.H. Li, J.R. De Wijn, P. Layrolle, K. De Groot. *J Am Ceram Soc* 86 (2003) 65.
- [87] S. Lin, R.Z. LeGeros, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J.P. LeGeros. *Key Eng Mater* 240-242 (2004) 473-6
- [88] Y. Liu, W. Wang, Y. Zhan, Ch. Zheng, G. Wang. *Mat Lett* 56 (2002) 496-501.
- [89] M. Maciejewski, T.J. Brunner, S.F. Loher, W.J. Stark, A. Baiker. *Thermochim Acta* 468 (2008) 75-80.
- [90] B. Mayor, J. Arias, S. Chiussi, F. García, J. Pou, B. León, M. Pérez-Amor. *Thin Solid Films* 317 (1998) 363.
- [91] D.S. Metsger, T.D. Driskell, J.R. Paulsrud. *J Am Dent Assoc* 105 (1982) 1035-1038.
- [92] A. Milev, G.S.K. Kannangara, B. Ben-Nissan. *Mat Lett* 57 (2003) 1960-1965.
- [93] R.O. Muller. *Spectrochemical Analysis by X-Ray Fluorescence*. New York: Plenum Press. 1972.
- [94] S. Murakami, K. Kato, Y. Enari, M. Kamitakahara, N. Watanabe, K. Ioku. *Cer Int* 38 (2012) 1649-1654.
- [95] R. Murugan, S. Ramakrishna. Development of nanocomposites for bone grafting. *Comp. Sci. Tech.* 65 (2005) 2385.

- [96] S.V. Oliveira, K.M. Medeiros, E.P. Araújo, C.R.C. Braga, E.M. Araújo, M.V.L. Fook. *Revista Electrónica de Materiales y Procesos* 4(3) (2009) 11-20.
- [97] J.B. Park, S. Lakes. *Biomaterials: An introduction*, 3^{ra} Ed. Springer. New York (2007).
- [98] G. Peluso, L. Ambrosio, M. Cinquegrani, L. Nicolais, S. Saiello, G. Tajana. *Biomaterials* 12 (1991) 231.
- [99] Posset, E. Löcklin, R. Thull, W. Kiefer. *J Biomed Mater Res* 40 (1998) 640.
- [100] O.E. Petrov, E. Dyulgerova, L Petrov, R. Popova. *Mater Lett* 48 (2001) 162-7.
- [101] S. Pramanik, A. Kumar Agarwal, K.N. Rai. *Trends Biomaters Artif Organs* 19(1) (2005) 46-51.
- [102] M. Rafiqul Ahsan, M. Alfaz Uddin, M. Golam Mortuza. *Indian Journal of Pure & Applied Physics* 43 (2005) 89-99.
- [103] S. Ramakrishna, M. Ramalingam, T.S.S. Kumar, W.O. Soboyejo. *Biomaterials: A Nano Approach*. Ed.: Hardcover, CRC Press, (2010).
- [104] M.M.A. Ramselaar, F.C.M. Driessens, W. Kalk, J.R. de Wijn, P.J. van Mullem. *J Mater Sci: Mater Med* 2 (1991) 63-70.
- [105] M.M.A. Ramselaar, P.J. van Mullem, W. Kalk, J.R. de Wijn, A.L.H. Stols, F.C.M. Driessens. *J Mater Sci: Mater Med* 4 (1993) 311-317.
- [106] M.G. Randall. *Engineered Materials Handbook. Fundamentals of Sintering: Ceramics and Glasses*. v. 4. ASM International. (1991), p.260.
- [107] E.C.S. Rigo, L.C. Oliveira, L.A. Santos, A.O. Bosch, R.G. Carrodeguas. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* v. 15, n. 1-2, p. 21-29; (1999).
- [108] U. Ripamonti. *Biomaterials* 17 (1996) 31.
- [109] R. K. Roeder, G. L. Converse, H. Leng, W. Yue. *J Am Ceram Soc* 89(7) (2006) 2096 – 2104.

- [110] S.W. Russell, K. Luptak, C.T. Suchicital, T.L. Alford, V.B. Pizziconi. *J Am Ceram Soc* 79(4) (1996) 837-842.
- [111] M.N. Salimi, R.H. Bridson, L.M. Grover, G.A. Leeke. *Powder Technology* 218 (2012) 109-118.
- [112] M.L. Santos, A.O. Florentino, M.J. Saeki, A.H. Aparecida, M.V. Lia Fook, A.C. Guastaldi. *Ecl Quim* 30(3) (2005) 29-35.
- [113] R.V. Santos, R.N. Clayton. *American Mineralogist* 80 (1995) 336.
- [114] J.P. Schmitz, J.O. Hollinger, S.B. Milam. *J Oral Maxillofac Surg* 57 (1999) 1122-1126.
- [115] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Química Analítica*, 7^aEd., Mc Graw-Hill, México, (2001).
- [116] A. Slósarcsyk, E. Stobierska, Z. Paszkiewicz, M. Gawlicki. *J Am Ceram Soc* 79(10) (1996) 2539-44.
- [117] B. Smith. In: *Infrared Spectral Interpretation*. CRC Press, Boca Raton, FL, (1999), p. 3.
- [118] A. Soueidan, O.I. Gan, J.M. Boulter, F. Goin, G. Daculsi. *Cells Mater* 5 (1995) 31-44.
- [119] R.A. Sousa, R.L. Reis, A.M. Cunha, M.J. Bevis. *Comp Sci Tech* 63 (2003) 389-402.
- [120] A. Stoch, W. Jastrzębski, A. Brozek, B. Trybalska, M. Cichocińska, E. Szarawara. *Journal of Molecular Structure* 511-512 (1999) 287-294.
- [121] W. Suchanek, M. Yashima, M. Kakihana, M. Yoshimura. *J. Eur Ceram Soc* 18 (1998) 1923-1929.
- [122] N. Sykaras, A.M. Yakopino, V.A. Marker, R.A. Triplett, R.G. Woody. *J Oral Maxillofac Implants*, 15(5) (2000) 675-690.

- [123] R. Tang, M. Hass, W. Wu, S. Gulde, G.H. Nancollas. *J Colloid Interface Sci* 260 (2003) 379-384.
- [124] K.S. Tenhuisen, R.I. Martin, M. Klimkiewicz, P.W. Brown. *J Biomed Mater Res* 29 (1995) 803-10.
- [125] R. Tertian, F. Claisse. *Principles of Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis*. London: Heyden & Son, (1971).
- [126] S. Thelen, F. Barthelat, L.C. Brinson. *J Biomed Mater Res.*, 69A (2004) 601-610.
- [127] M. Vallet-Regí. "Introduction to the world of biomaterials", *Ann Quim Int Ed*, v. 93, (1997) p. S6 – S14.
- [128] Y.J. Wang, J.D. Chen, K. Wei, S.H. Zhang, X.D. Wang. *Mater Lett* 60 (2006) 3227-31.
- [129] W. Weng, J.L. Baptista. *Journal of materials science: materials in medicine* 9 (1998) 159-163.
- [130] S.A. Wesolowski, C. Dennis. *Fundamentals of vascular grafting*. New York: McGraw-Hill, (1963).
- [131] D.F. Williams. *Definitions in biomaterials*. In: *Progress in Biomedical Engineering (Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials)*. Amsterdam: Elsevier. v. 4, (1987).
- [132] H. Yamasaki, H. Sakai. *Biomaterials* 13 (1992) 308.
- [133] L. Yan, Y. Li, Z. Deng, J Zhuang, X. Sun. *J Inorg Mater* 3 (2001) 633-637.
- [134] M. Yoshimura, H. Suda, K. Okamoto, K. Ioku. *J Mat Sc* 29 (1994) 3399-3402.
- [135] H. Yuan, Z. Yang, J.D. De Bruijn, K. De Groot, X. Zhang. *Biomaterials* 22 (2001) 2617.

[136] H. Yuan, M. Van Del Doel, S. Li, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot, J.D. De Bruijn. *J Mater Sci Mater Med* 13 (2002) 127.

[137] G.A. Zarb, T. Albrektsson. *J Periodont Rest Dent* 11 (1991) 88-91.

[138] B.J.J. Zelinski, D.R. Uhlmann. *J Phys Chem Solids* 45(10) (1984) 1069-1090.

[139] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B.S. Hsiao. *Polymer* 43(16) (2002) 4403-4412.

[140] Z.Z. Zyman, M.V. Tkachenko, D.V. Polevodin. *J Mater Sci Mater Med* 19 (2008) 2819-25.