

RESUMEN

Es bien conocido que la hidroxiapatita puede incorporar diversos tipos de substituciones iónicas, con los cambios subsecuentes en sus parámetros estructurales y características fisicoquímicas. En estudios anteriores se ha presentado la mecosíntesis como un nuevo método para obtener cristales nanométricos de hidroxiapatita con un buen control de la estequiometría. Aún más, esta técnica permite la incorporación de diversos iones en la estructura apatítica.

Tres formulaciones fueron realizadas en un molino planetario de bolas (Fritsch). Primero, para obtener una hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), segundo una hidroxiapatita substituida con silicio (Si-HA) y tercero una hidroxiapatita deficiente en calcio substituida por silicio (Si-CDHA) con 2 silicatos de calcio diferentes.

Para hacer estas reacciones, los reactivos siguientes fueron utilizados: fosfato dicálcico dihidratada (DCPD), óxido de calcio (CaO) y silicato de calcio (CSH amorfo o CaSiO_3 comercial). Estos fueron molidos a una velocidad de 350 rpm y la masa molida total era 40 gramos para cada reacción.

Los productos obtenidos en cada una de las reacciones realizadas se estudiaron por espectroscopía de infrarojos y difracción de rayos X para distintos tiempos de molido intermedios, a fin de estudiar la evolución de la reacción con el tiempo de molido. De dichos análisis se concluye que la introducción de iones silicio en la estructura apatítica aumenta su cristalinidad y su estabilidad a altas temperaturas, además de verse reflejada en la aparición de bandas adicionales en los espectros de infrarojos. Dichos espectros de infrarojos mostraron que las hidroxiapatitas substituidas con silicio sintetizadas contenían además iones carbonato según substituciones de tipo A, B o AB. Cabe destacar, que en el caso de la síntesis de hidroxiapatita deficiente en calcio sin introducción de iones silicio, se observa la transformación de dicha hidroxiapatita a fosfato tricálcico β para tiempos largos de molido.

La morfología de las hidroxiapatitas sintetizadas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido ambiental, poniendo de manifiesto el tamaño nanométrico de los cristales de hidroxiapatita tanto para la hidroxiapatita deficiente en calcio sin substitución de iones silicio como en el caso de contener iones silicio.

2 Preparación y caracterización de hidroxiapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecanosíntesis

Los dos silicatos de calcio utilizados en el estudio se analizaron mediante difracción de rayos X, espectroscopía de infrarojos y granulometría, para poder determinar la influencia de su utilización como fuentes de silicio en las reacciones de síntesis de hidroxiapatitas substituidas con silicio.

Esta comparación se hizo necesaria ya que los resultados de espectroscopía de infrarojos mostraron diferencias según el silicato de calcio utilizado.

Finalmente, se realizó un estudio de la contaminación de ágata proveniente del tarro y las bolas del molino. Debido a que el molino utilizado es de ágata con un 99.9% de SiO_2 y muy poca cantidad de otras impurezas, se espera que esta contaminación no tenga un efecto excesivamente negativo en las propiedades biológicas de los fosfatos de calcio sintetizados.

Del estudio realizado se concluye la posibilidad de sintetizar hidroxiapatita deficiente en calcio y fosfato tricálcico β nanométricos a partir de mecanosíntesis. Permitiéndose además la introducción de iones silicio y carbonato en su estructura. Por todo ello, la mecanosíntesis es una técnica que permite sintetizar hidroxiapatitas con grandes propiedades para una potencial bioactividad, como son el contenido de sustituciones iónicas de silicio y carbonato, así como el tamaño nanométrico de sus cristales.

INDICE

RESUMEN	1
INDICE	3
1. PREFACIO	5
1.1 ORIGEN DEL PROYECTO	5
1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	6
1.3 ALCANCE DEL PROYECTO.....	7
2. FUNDAMENTOS TEORICOS	8
2.1 EL HUESO	8
2.2 BIOMATERIALES	10
2.3 BIOCERÁMICAS	11
2.4 FOSFATOS DE CALCIO	13
2.5 HIDROXIAPATITA	13
2.5.1 Introducción	13
2.5.2 Interés de la hidroxiapatita sintética.....	14
2.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA HA	15
2.6.1 Precipitación de HA a baja temperatura	15
2.6.2 Sinterización en estado sólido	15
2.6.3 La mecanosíntesis	16
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1 REACCIONES POR MECANOSÍNTESIS	19
3.1.1 PROCESO DE MOLIDO.....	19
3.1.2 PRODUCTOS SINTETIZADOS	21
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS	25
3.2.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	26
3.2.2 INFRARROJOS	27
3.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARIDO AMBIENTAL	28
3.3 ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN	28

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MOLIDO	30
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO POR DRX	31
4.2.1 Hidroxiapatita deficiente en calcio	31
4.2.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio amorfo	33
4.2.3 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida por silicio comercial	35
4.2.4 Hidroxiapatita substituida con silicio	37
4.2.5 Reactivos utilizados como fuentes de silicio	37
4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL PRODUCTO POR FTIR	39
4.3.1 Reactivos utilizados	39
4.3.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio	41
4.3.3 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio amorfo	46
4.3.4 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio comercial	51
4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL PRODUCTO POR SEM	53
4.4.1 Hidroxiapatita deficiente en calcio	53
4.4.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio amorfo	54
4.4.3 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio comercial	54
4.5 GRANULOMETRIA	56
4.6 ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN	57
ANEXOS	65
PRESUPUESTO	65
TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN EMPLEADAS	66
Difracción de rayos X	66
Infrarrojos	68
Microscopia electronica por barrido ambiental	68
Centrifugacion diferencial	70

1. PREFACIO

1.1 ORIGEN DEL PROYECTO

La búsqueda de materiales que puedan sustituir y añadirse a las diferentes partes del cuerpo humano parece hoy en día imprescindible en el objetivo de ofrecer una mejor calidad de vida a personas que sufren ciertos padecimientos crónicos sin solución medica. El desarrollo de nuevos materiales y sistemas utilizados en Medicina fue vertiginoso pero ha permitido que hoy se puedan reemplazar numerosos órganos y tejidos con resultados satisfactorios.

Efectivamente, hoy más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes.

Los materiales que se emplean para la fabricación de implantes son de naturaleza diversa; pueden elaborarse con tejidos de los mismos pacientes (autoinjerto), con tejidos de algun donante humano (homoinjerto) o de otras especies (heteroinjerto), asi como a partir de materiales hechos por el propio hombre (aloinjertos); a estos últimos se les conoce como biomateriales, y pueden ser de origen sintético o natural (pero modificados por el hombre). Estos se utilizan en la fabricación de dispositivos medicos capaces de desempeñar diferentes funciones en el organismo humano.

Pero uno de los principales problemas que afronta la medicina de hoy es el incremento considerable de las patologías relacionadas con los problemas óseos.

Efectivamente, en primer lugar, la mitad de las enfermedades crónicas que sufren las personas mayores de 65 años están relacionadas con problemas en las articulaciones. Este aumento de las enfermedades del hueso esperado en el siglo 21 y su impacto previsto en individuos y sociedades ha sido el comienzo para lanzar las investigaciones sobre el tema de nuevos materiales capaces de regenerar el hueso.

Y segundo, aunque el tejido óseo posee la capacidad de crecer y de regenerarse naturalmente, el proceso de la reparación del hueso es deteriorado en muchos casos clínicos y patológicos. Por ejemplo, la pérdida masiva del hueso causada por trauma y la resección del tumor así como deformidades requiere cirugía reconstructiva.

Si a estos factores sociológicos y médicos se les añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede entender el crecimiento acelerado en la utilización de prótesis, implantes, sistemas y aparatos médicos.

1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

En la última década, el interés por los cementos de fosfatos de calcio ha ido en aumento debido a las posibilidades en las prácticas quirúrgicas, ya sea como relleno de cavidades óseas, sustitución de hueso, recubrimiento de prótesis metálicas (aplicado principalmente las prótesis de cadera y tobillo), así como dispositivos de liberación controlada de fármacos, substratos para el crecimiento de nuevo tejido (ingeniería de tejidos), etc.

El presente proyecto final de carrera se enmarca en el estudio la Hidroxiapatita. Las apatitas tienen mucho interés en el campo de los biomateriales porque su composición química y su estructura son equivalentes a la fase mineral del hueso. El objetivo de este proyecto es obtener un producto parecido a la Hidroxiapatita biológica y que sea lo más bioactivo posible a fin de ser incorporado en el cuerpo con éxito. Para ello se sintetizarán una hidroxiapatita deficiente en calcio con una relación molar Ca/P de 1.5 y una hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con iones silicio con una relación Ca/(P+Si) de 1.5. Además se estudiará la introducción de dichos iones silicio en la estructura apatítica según dos reactivos utilizados como fuentes de silicio: por una parte un silicato de calcio hidratado amorfo sintetizado en el laboratorio y un silicato de calcio comercial. También se estudiará la síntesis de una hidroxiapatita estequiométrica substituida con silicio, a fin de analizar la posibilidad de dicha sustitución iónica en hidroxiapatitas con diferentes estquiometrías molares.

Además las reacciones se harán por una técnica todavía poco convencional: la mecanosíntesis. En efecto, la mayor parte de las reacciones que dan hidroxiapatita se hacen con disolvente y en agua. Hoy en día, la atención para reacciones en estado sólido crece debido a los requisitos ecológicos y a la necesidad para purificar cantidades grandes de basuras.

La mayoría de las tentativas clásicas en mecanosíntesis estuvieron dirigidas para conseguir productos directamente del tarro de un molino. Su desventaja principal es la contaminación, la cual se estudiará como apartada final.

1.3 ALCANCE DEL PROYECTO

El alcance de este proyecto se divide en cuatro estudios según las diferentes técnicas empleadas para caracterizar las tres formulaciones de Hidroxiapatita hechas: hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio (Si-CDHA), hidroxiapatita estequiométrica substituida con silicio (Si-HA). Dichas hidroxiapatitas se caracterizan por las siguientes relaciones molares:

- CDHA \rightarrow Ca/P = 1.5
- Si-CDHA \rightarrow Ca/(P+Si) = 1.5
- Si-HA \rightarrow Ca/(P+Si) = 1.67

La relación Ca/(P+Si) será la más estudiada ya que la tendencia actual es que la HA más similar a la fase mineral del hueso es la deficiente en calcio, siendo el silicio un ión con importantes efectos en los procesos de remodelación ósea .

Todas las reacciones se han hecho en un molino de bolas FRITSCH (ágata) a una velocidad de 350rpm. El alcance es determinar los componentes de las HA por Infrarrojos y Difracción de rayos X, así como determinar su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido.

También se estudiara la contaminación de ágata obtenida principalmente por el tarro y las bolas del molino.

2. FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1 EL HUESO

➤ Funciones principales

El esqueleto humano está compuesto por 206 huesos, sin contar los dientes. El hueso está formado por un tejido vivo que forma el esqueleto humano, junto al tejido cartilaginoso. Cumple numerosas funciones en el organismo.

En primer lugar, el hueso proporciona forma y soporte al cuerpo, protege a los órganos internos frente a los traumatismos. En segundo lugar, facilita la locomoción y actúa como lugar de almacenamiento de minerales, especialmente calcio y fósforo, que a su vez pueden ser liberados para mantener el equilibrio entre los líquidos corporales. Además, la médula ósea suministra al organismo los glóbulos rojos que actúan como portadores de nutrientes para el sistema inmunológico.

Existen dos tipos de hueso:

- **Cortical o compacto.** Forma la capa externa y más dura de los huesos, aunque la mayor parte se encuentra en las diáfisis (parte central) de los huesos largos. Supone el 80% de la masa esquelética. Proporciona protección, sostén y resiste los esfuerzos que se producen en los movimientos.

- **Trabecular o esponjoso.** Forma la mayor parte del cuerpo vertebral, las epífisis (extremos) de los huesos largos y está presente en otros lugares. Consta de unas laminillas dispuestas en red llamadas trabéculas; dentro de cada trabécula se encuentran las células que reciben directamente los nutrientes de la sangre que circula por las cavidades medulares. Es la parte metabólica más activa del esqueleto.

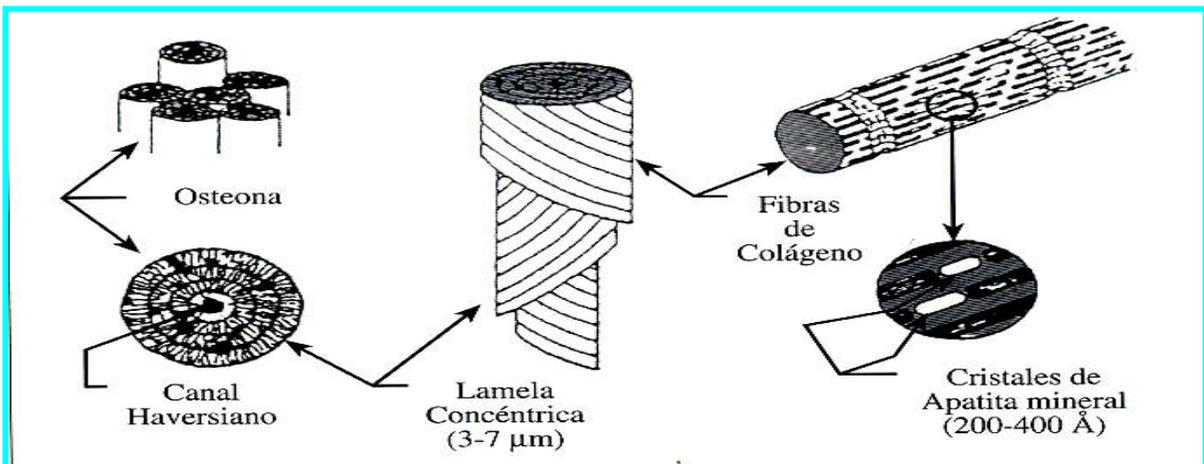
➤ Componentes del hueso

- **Matriz ósea o inorgánica**

El componente mineral está principalmente compuesto por los cationes calcio y magnesio y por el anión fosfato, en forma de hidroxiapatita. La dureza del hueso se debe a las sales de calcio, que forman parte fundamental de su estructura.

- Matriz orgánica

También se denomina osteoide; representa el 25% del peso y el 38% del volumen del hueso adulto. La mayor parte de la matriz orgánica la constituye el colágeno (94%); la otra parte, o sustancia fundamental, está formada por líquido extracelular y complejo carbohidratoproteína. La osteocalcina es la segunda proteína más abundante en los huesos después del colágeno; se cree que influye en la mineralización ósea, uniéndose en parte el componente mineral del hueso, la hidroxiapatita.



Esquema 1: Estructura del hueso.

El hueso está compuesto por varios tipos de células:

- **Osteoprogenitoras y osteógenas:** células madre, las únicas con capacidad de división cuyas células hijas se transforman en osteoblastos.
- **Osteoblastos:** sintetizan las fibras de colágeno y suponen la sustancia fundamental del hueso. Tienen la función de formar el tejido óseo.
- **Osteocitos:** son los osteoblastos ya incorporados a la matriz ósea ya calcificada y son los encargados de mantener vivo el tejido óseo.
- **Osteoclastos:** son las células encargadas de la resorción y eliminación del tejido óseo no deseado, imprescindibles para el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normal del hueso.

2.2 BIOMATERIALES

Inicialmente, que fue hace relativamente poco tiempo, durante el último tercio del siglo XX, los biomateriales eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo, hoy en día muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo médico.

Desde 1991 y la segunda reunión de consenso sobre definiciones en el campo de Biomateriales, un biomaterial es *"un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo"*.

En la actualidad, se formulan tres importantes cuestiones sobre los biomateriales:

- ¿Qué calidad de vida proporcionarán?
- ¿Cuánto durarán?
- ¿Cuál es su precio?

Ahora bien, para que un material sea aceptado en su aplicación como biomaterial tiene que superar toda una serie de ensayos, rígidamente controlados, que exigen el cumplimiento de normas muy estrictas relacionadas con el carácter no tóxico, no carcinogénico, biocompatible y no generador de efectos adversos en el organismo. Por ello, cuando se analizan las posibilidades de utilización de un producto como biomaterial, hay que tener en cuenta tres conceptos clave: biocompatibilidad, biofuncionalidad y biodegradación.

Por biocompatibilidad se entiende la capacidad del biomaterial o dispositivo médico implantable para ser tolerado por el organismo o aceptado por el medio biológico que lo va a rodear, una vez implantado. Pero además, cualquier diseño debe presentar buenas características biofuncionales, pues debe ofrecer la suficiente estabilidad e integridad para mantener unas condiciones óptimas del proceso curativo. Por último, la biodegradación considera la descomposición del material, con rotura de los enlaces y su destrucción o modificación, en un medio tan agresivo como lo es el organismo humano.

2.3 BIOCERÁMICAS

Las cerámicas son materiales inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos unidos principalmente por enlaces iónicos (electrostáticos) y uniones covalentes (electrones compartidos).

Para tener buenas propiedades, los materiales cerámicos han adquirido recientemente una gran importancia como materiales substitutivos de tejido duro. En la figura siguiente, se representa una posible clasificación de las biocerámicas empleadas en la actualidad, desde un punto de vista de su composición química:

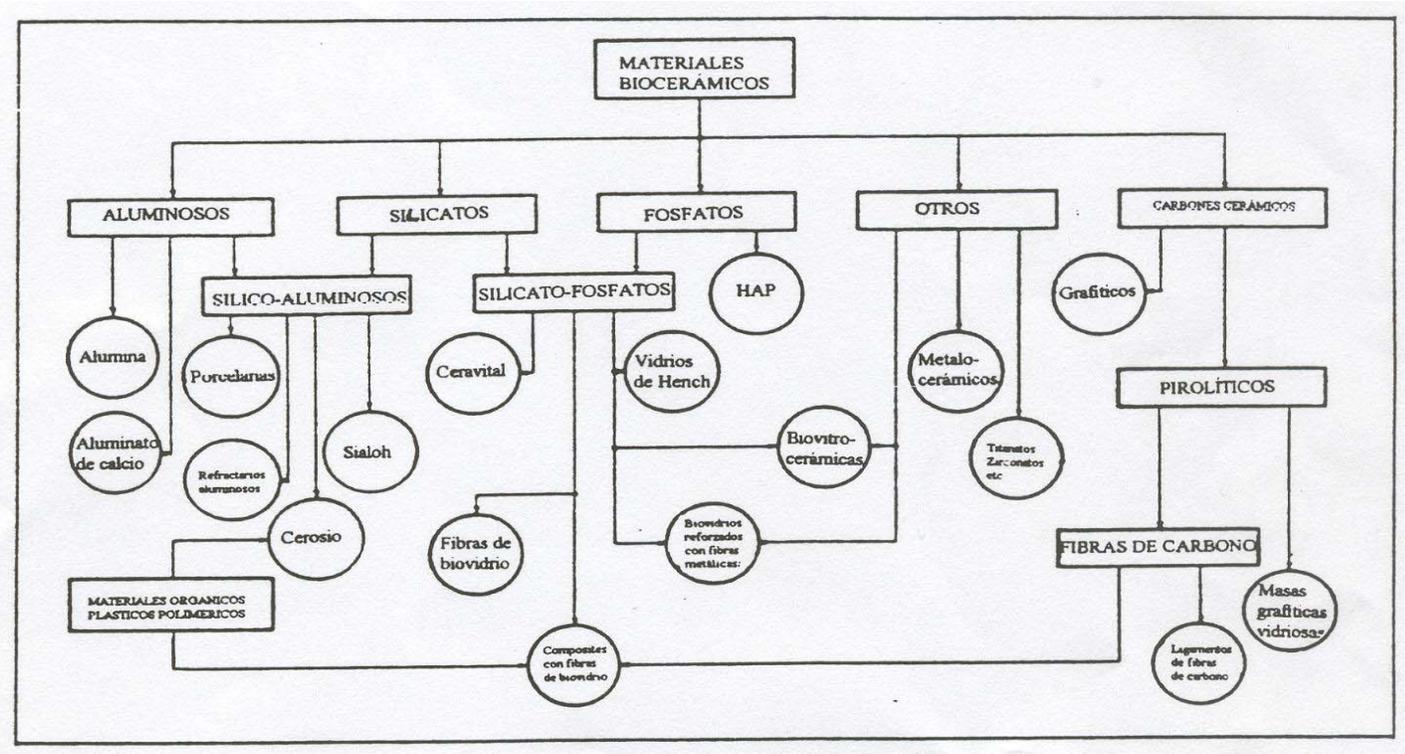
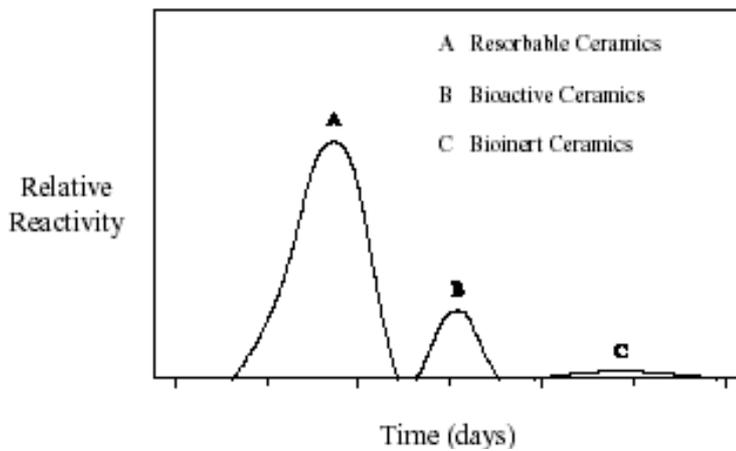


Tabla 1: Clasificación por grupos de los materiales biocerámicos.

Teniendo en cuenta el tipo de respuesta que inducen en el tejido circundante, se puede establecer otra clasificación de las biocerámicas en distintos grupos:



Reactividad de los tipos de biocerámicas.

- **Cerámicas casi inertes**, que provocan la formación de una capsula fibrosa entre el tejido circundante y la superficie del implante. Pueden ser utilizadas en forma densa o porosa, para facilitar el crecimiento óseo entre los poros del implante, lo que confiere una fijación mecánica del mismo. Un ejemplo es la alúmina, (Al_2O_3), que fue la primera cerámica usada extensamente en la practica clínica, en algunos componentes de prótesis articulares y como implantes dentales, por sus excelentes cualidades de resistencia mecánica y resistencia al desgaste.

- **Cerámicas bioactivas**, que suscitan una respuesta biológica específica en la interfaz del material, que lleva a la formación de un enlace entre el tejido óseo y el implante. Dentro de este grupo pueden distinguirse dos categorías muy amplias: los vidrios bioactivos, y las cerámicas basadas en hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio.

- **Cerámicas reabsorbibles**, que después de ser implantadas van siendo reabsorbidas. El objetivo es que vayan siendo reemplazadas por el tejido óseo. Sin embargo, esto implica una correlación entre la velocidad de reabsorción de la cerámica y la velocidad de regeneración del hueso, que no siempre se da. En este grupo se encuentran el sulfato cálcico y algunos fosfatos de calcio.

2.4 FOSFATOS DE CALCIO

Cuando se piensa en reparar una parte del esqueleto, a priori podrían existir dos posibilidades muy distintas, reemplazar la parte dañada, o sustituirla regenerando el hueso. Este planteamiento hace pensar en un campo de investigación muy importante, dirigido a conseguir biocerámicas



Fosfatos de calcio de diferentes formas y tamaños.

basadas en fosfatos de calcio, que tengan buena resistencia mecánica y que puedan conducir a la regeneración de hueso.

Efectivamente, las cerámicas bioactivas, y más concretamente los fosfatos de calcio suscitan el interés estos últimos años debido a sus usos clínicos múltiples: el relleno de hueso defectuoso, reconstrucción del hueso, reemplazo del hueso, recubrimiento de prótesis en metal (especialmente para prótesis de cadera y de rodilla), etc. Los más significativos como la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) o el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) se introdujeron como substitutos óseos en los años 70. Sin embargo, el método de fabricación de estas cerámicas, habitualmente sinterización a alta temperatura, representa un inconveniente importante para este tipo de materiales, ya que condiciona su tamaño y su forma, que se deben definir previamente a la implantación. Esto causa a menudo problemas de adaptación y fijación en la cavidad donde deben ser colocados.

2.5 HIDROXIAPATITA

2.5.1 Introducción

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como *biocompatibilidad*, *bioactividad*, *osteoconductividad* y *unión directa al hueso*. La HA en su forma monolítica no es conveniente para usar en partes que soporten peso. Por eso, la HA es ideal para usar como un recubrimiento de implantes metálicos (como el titanio por ejemplo). En la tabla 2 se recogen los datos de las propiedades de algunas biocerámicas y de los 2 componentes del hueso:

	Bioglass	HAP	A-W	Dense natural bone	Spongy natural bone
Density g·cm ⁻³	2.68	3.16	3.07	1.6-2.1	
Hardness HV	458	600	680		
Compressed strength MPa		500-1000	1080	100-230	2-12
Bending strength MPa	42	115-200	215	50-150	
Young modulus GPa	35	80-110	118	7-30	0.05-0.5
Breaking tenacity MPa·m ^{1/2}		1.0	2.0	2-6	
Bone invasion speed into ceramics space	Highest	Low	high		
Containing SiO ₄ ²⁻ (may be toxic)	Yes	No	Yes		

Tabla 2: Propiedades de algunas bioceramicas y de los componentes el hueso.

2.5.2 Interés de la hidroxiapatita sintética

Como se ha dicho antes, la HA tiene muy buenas propiedades tales como bioactividad, sin embargo, si lo que se busca no es sólo la integración sino la regeneración del tejido óseo, es decir, la substitución del biomaterial por tejido neoformado, es necesario contar con un material que además de ser bioactivo sea reabsorbible. El comportamiento de la HA depende de forma muy marcada de sus características específicas (estequiometría, cristalinidad, defectos, etc.), de forma que la HA sintética obtenida por sinterización a alta temperatura se considera prácticamente no reabsorbible, mientras que las apatitas carbonatadas, substituidas por silicio o deficiente en calcio de características similares a las biológicas son reabsorbibles. En consecuencia, si lo que se busca es un material que sea reabsorbible, es necesario de buscar métodos de obtención análogos a los procesos naturales.

Aunque la HA estequiométrica tiene la fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con relación $\text{Ca/P} = 1.67$, es sabido que la estructura apatítica es estable en un rango amplio de composiciones, que presentan deficiencias en calcio. Los métodos tradicionalmente más utilizados en la formación de hidroxiapatita son la síntesis por precipitación a bajas temperaturas y la sinterización a altas temperaturas. La obtención de HA por precipitación permite obtener HAs deficientes en calcio, aunque se trata de un proceso de larga duración en el que se hace muy difícil el control de la estequiometría. En los métodos de síntesis a alta temperatura, la hidroxiapatita obtenida es estequiométrica, muy cristalina y poco reactiva.

En ambos casos se hace difícil obtener una hidroxiapatita de características similares a la biológica, con un control preciso de la estequiometría y la incorporación de especies iónicas de forma controlada.

Estudios recientes apuntan la posibilidad de sintetizar hidroxiapatita mediante la técnica de mecano-síntesis, basada en la activación de una reacción química mediante la energía mecánica creada en un proceso de molido (1-3). Esta técnica se empezó a utilizar a principios de los 70, con el nombre de “mechanical alloying”, para la producción de superaleaciones metálicas. Hoy en día, la activación mecánica mediante molido se usa en la producción de un amplio número de productos, desde amorfos o nanocristalinos a superaleaciones o intermetálicos (4).

2.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA HA

Hay varios mecanismos de formación de la Hidroxiapatita, incluyendo la precipitación a baja temperatura, la sinterización en estado sólido, la mecano-síntesis, etc.

2.6.1 Precipitación de HA a baja temperatura

La razón principal por la cual se utiliza la precipitación para hacer polvos de cerámica es que da un producto sólido puro, rechazando al elemento flotante la mayoría de las impurezas. Además, con la precipitación la morfología de las partículas y la distribución de tamaño de las partículas se pueden controlar a un cierto grado. Sin embargo, la precipitación tiene el inconveniente que el producto final en forma de polvo debe separarse de su flotante y secar. La preparación hecha a partir de sodio y potasio conduce a la incorporación de estos cationes y a veces puede resultar un sólido con una mala pureza presentando una inestabilidad térmica. El mejor método de precipitación utiliza el fosfato de amonio y sales de nitrato de calcio. Los iones de amonio pueden ser eliminados calentando el sistema hasta 500°C. Pero los iones de carbono e hidrogeno, que desafortunadamente, están siempre presentes durante la preparación, son los responsables que las apatitas precipitadas no sean estequiométricas.

2.6.2 Sinterización en estado sólido

La síntesis de HA por sinterización consiste en el sinterizado a altas temperaturas de una fuente de iones fosfato, como por ejemplo el fosfato dicálcico (CaHPO_4), y otra de iones

calcio, como el óxido de calcio (CaO); teniendo en cuenta la relación molar Ca/P deseada (1.67 para la HA). Ahora bien, estas HA's suelen ser muy cristalinas lo cual las hace poco bioactivas.

2.6.3 La mecanosíntesis

Durante el proceso de molido, existen distintos parámetros experimentales que influyen en la cinética de la reacción, como por ejemplo el tipo de molino, la velocidad de molido, el tiempo de molido, etc. La influencia de estos parámetros experimentales ha sido ampliamente estudiada en el caso de “mechanical alloying”(4), pero no se han encontrado en la literatura estudios referentes a la mecanosíntesis de fosfatos de calcio.

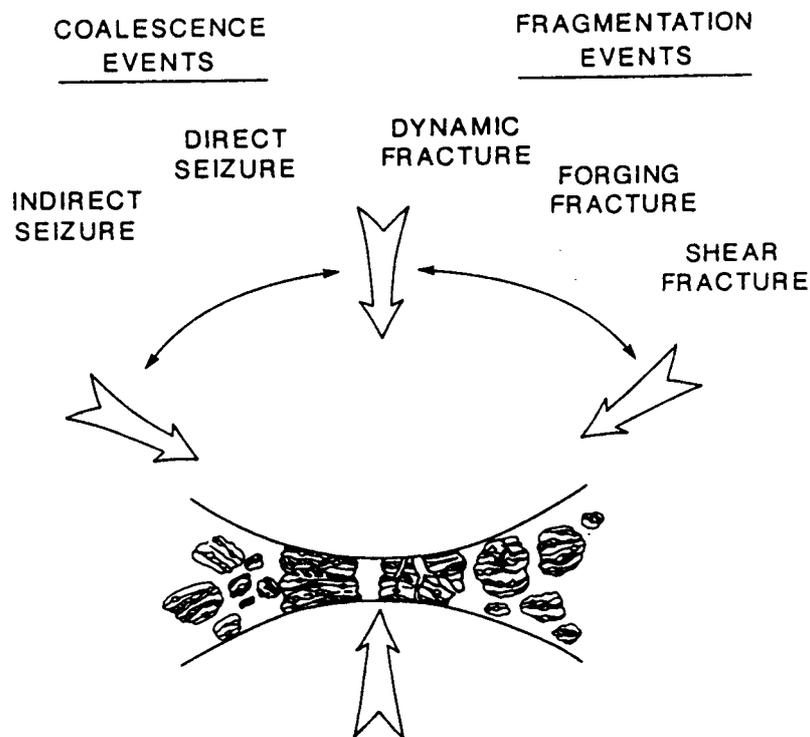


Figura 1: Esquema de los procesos de fragmentación y coalescencia característicos en “mechanical alloying”.

En la síntesis química convencional, las moléculas reactivas se encuentran una con otra con el movimiento térmico al azar en un líquido o vapor. En la mecanosíntesis, las moléculas se unen a los sistemas mecánicos moleculares y sus encuentros resultan de los movimientos mecánicos que las traen juntas en secuencias, posiciones, y orientaciones. El proceso de mecanosíntesis puede evitar reacciones indeseadas manteniendo los reactivos potenciales

separados y puede favorecer fuertemente reacciones deseadas sosteniendo los reactivos juntos en las orientaciones óptimas para diferentes tiempos de vibración molecular.

Existe diferentes maquinas que pueden ser utilizadas para obtener productos por mecano-síntesis:

- **Molino planetario de bolas;**
- **attritor;**
- **1D – vibratorio maquina;**
- **3D – vibratorio maquina.**

Sin embargo, hoy en día, la mayoría parte de las reacciones de mecano-síntesis se hacen en un molino planetario de bolas. La mecano-síntesis se ha desarrollado en los años 70 en la industria aeronáutica para obtener aleación a base de níquel con buenas propiedades mecánicas a altas temperaturas, es un proceso de pulverización mecánica que puede tener lugar en una atmósfera inerte o con aire en un molino de alta energía. El principio de pulverización consiste en provocar una serie de choques y colisiones por algunas bolas con el objetivo de obtener un producto en polvo con un tamaño de partícula muy pequeño. El aumento del tiempo de molido conduce a un aumento del número de interfaz y el área del componente elemental disminuye de milímetro hasta micrómetro.

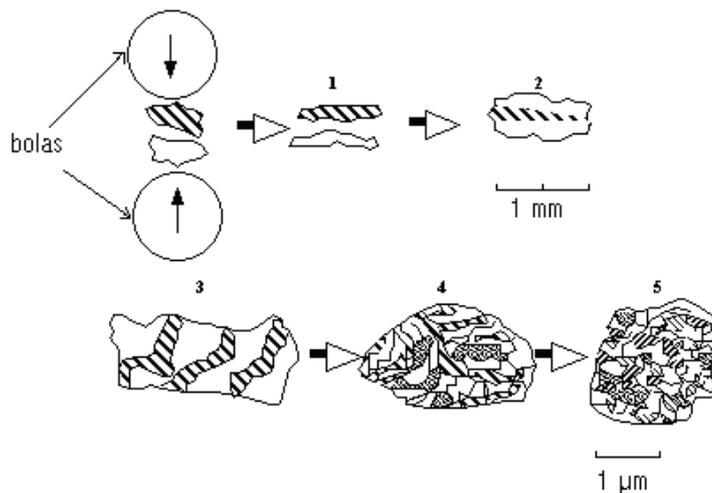


Figura 2: Comportamiento general de las partículas durante el proceso de mecano-síntesis

Hoy en día, la mecano-síntesis representa un método de elaboración para toda clase de compuestos tanto para la composición como para las características microestructurales. Pero

18 Preparación y caracterización de hidroxiapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecosíntesis

este proceso es sobre todo utilizado para obtener un material amorfo y en particular, estudiar los mecanismos que aportan este estado amorfo. Sus ventajas son:

- ✓ Es un método simple;
- ✓ Se puede controlar la estequiometría;
- ✓ Posibilidad de introducción de iones;
- ✓ Se puede controlar la cinética mediante los parámetros de molido

En el proceso de mecosíntesis se hace fácil el control de la relación molar Ca/P de la hidroxiapatita que deseamos obtener y además permite la incorporación de ciertos iones en su estructura cristalina.

Recientemente, se han publicado estudios sobre el aumento de la bioactividad de la hidroxiapatita al incorporar iones silicatos en su estructura cristalina (5). En estos estudios, la incorporación de los iones silicatos en la hidroxiapatita se ha realizado mediante métodos de precipitación a bajas temperaturas, lo cual hace difícil el control de las estequiometrías obtenidas. La mecosíntesis puede ser una vía que permita realizar esta incorporación iónica en la hidroxiapatita con unas estequiometrías controladas.

3. MATERIALES Y METODOS

La primera parte del proyecto engloba la síntesis y la preparación de las formulaciones de hidroxiapatita, esto se realizó integralmente en el departamento de "Biomateriales" de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona (UPC) así como el estudio de la microestructura (por microscopía electrónica de transmisión y barrido ambiental) y la composición de fases mediante difracción de rayos X (DRX). La caracterización de las muestras por infrarrojos, el estudio de contaminación y parte del estudio por DRX se llevaron a cabo en las instalaciones de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona.

3.1 REACCIONES POR MECANOSÍNTESIS

Las reacciones estudiadas presentan una sola variable: dependen de la cantidad y del tipo de reactivos introducidos en el molino pero un estudio paralelo sobre el tipo de junta utilizado fue hecho para una formulación. Los parámetros relacionados con el molino son: la velocidad de molido (N, rpm), el número de bolas, sus diámetro y sus masa. Los parámetros relacionados con los reactivos son la masa inicial introducida y la relación molar Ca/P entre ellos.

3.1.1 PROCESO DE MOLIDO

3.1.1.1 Características del molino

El molino utilizado en el laboratorio, es un molino planetario de bolas, modelo Fritsch Pulverisette 6. La alimentación es $f = 50\text{Hz}$,

220V. El rango de velocidad de este molino es de 220rpm a 680rpm y está equipado de un minutero. Para asegurarse que todo el polvo contenido dentro del tarro reacciona bien, es importante de apagar el equipo cada 2 horas y de rascar el polvo de las paredes como se ve en la fotografía 3.



Fotografía 1: Molino planetario de bolas en funcionamiento (FRITSCH Pulverisette 6).



Fotografía 2: Molino planetario de bolas abierto (FRITSCH Pulverisette 6).

El molino Pulverisette de Fritsch hace girar el tarro de ágata con un radio r_d de excentricidad igual a 1,5, lo que corresponde a la longitud entre el centro del tarro y el centro del disco de rotación dónde esta colocado el tarro, tal como se ve en el esquema siguiente en vista plana:

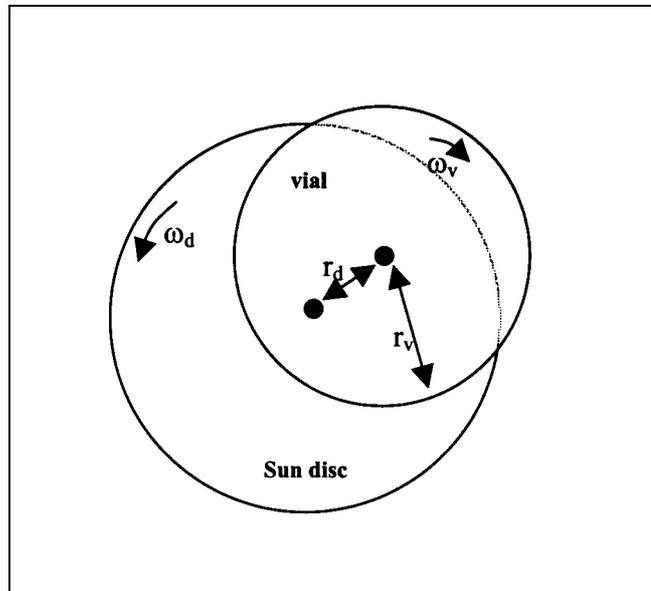


Figura 3: Diagrama del molino planetario de bolas.

3.1.1.2 Parámetros de molido utilizados

Los parámetros fijados para las diferentes formulaciones de hidroxiapatita son: el número de bolas, sus diámetros y sus masas (sabiendo que las bolas disminuyen en tamaño y masa durante la reacción). En nuestro caso, el número de bolas es de 6 que tienen un volumen y una masa casi similar. La masa total de reactivos insertados es 40g para cada reacción y la velocidad de molido es de 350 revolución por minuto.

El único parámetro variable en las reacciones es la relación molar Ca/P que permite de obtener las diferentes formulaciones de hidroxiapatita. Las formulaciones sintetizadas se describen en el apartado siguiente.



Fotografía 3: Tarro lleno durante una reacción.

En la tabla siguiente, están reunidos las características del molino utilizado así como los parámetros de molido:

		Fritsch
Tarro	Material	Ágata (99,9%SiO ₂)
	Radio r _v (cm)	5
	Volumen(ml)	500
6 Bolas	Material	Ágata (99,9%SiO ₂)
	Diámetro (cm)	3
	Masa (g)	37
	Área superficial (cm ²)	28,3
Velocidad w _d (rpm)		350
Excentricidad r _d (cm)		1.5

Tabla 3: Características del molino y parámetros de molido.

3.1.1.3 Efecto de la masa y del área superficial de las bolas

El molino se utilizó con una velocidad de rotación de 350rpm y sin cualquier cambio en la dirección de rotación. El número y el diámetro de las bolas se ajustaron para obtener masas totales y áreas superficiales lo más adecuados al tipo de reacción y de los productos introducidos. Antes de cada reacción, la masa total de las 6 bolas así como los diámetros de cada una fueron pesados para ver la evolución de la área superficial y la pérdida de masa según el tiempo (6). Una tabla agrupa estos datos en la parte 5.1 de resultados y discusión.

3.1.2 PRODUCTOS SINTETIZADOS

3.1.2.1 Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)

Para la obtención de hidroxiapatita deficiente en calcio con una relación Ca/P = 1,5, se llevó a cabo la siguiente reacción:



Los productos químicos son reactivos comprados a Aldrich (óxido de calcio, CaO de referencia: 24,856-8) y Fluka (fosfato dicálcico dihidratado, DCPD: CaHPO₄.H₂O de referencia: 360466). El comercial CaO fue calentado hasta 950°C durante 2 horas para extraer

22 Preparación y caracterización de hidroxapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecano-síntesis

el H_2O y el CO_2 ; posteriormente se guardó en una estufa para guardar el óxido de la contaminación. Guardaremos estos mismos reactivos para las reacciones siguientes.

Se molió una masa total de reactivos de 40g. Se tomaron 400mg de polvo para los tiempos de molido: 15min, 30min, 45min, 1h, 1h30 y 1,200g para los tiempos: 2h, 6h, 10h, 20h, 24h.

Se realizó el test de la fenolftaleína para ver si el CaO había reaccionado en su totalidad. Este test consiste en tomar un poco de polvo, añadir agua destilada y algunas gotas de fenolftaleína. Si la mezcla cambia hasta un color rosa, esto significa que queda CaO en el producto y a la inversa si el color queda así, esto significa que no hay más de CaO. Para saber exactamente el tiempo final de reacción, se hizo una prueba cada 30 minutos.

Esta prueba nos ha dado un color invisible para el tiempo de 1 hora. Es decir que el CaO se ha incorporado totalmente a 1 hora de molido. Finalmente, a $t = 24h$, tenemos 22,540g de CDHA.

Se fabricaron dos nuevas juntas más adecuadas para el tarro porque la de teflón utilizada hasta ahora permite la fuga de polvo fuera de éste. Para ello, se compró una larga lámina de 2 milímetros de silicona a la que se le realizó un círculo de la misma anchura que el tarro (fotografía 4), a su vez se compró una lámina de caucho y se realizó otro círculo para poder ser introducido en el tarro (fotografía 5). Para ver el efecto de las nuevas juntas se ha hecho la misma reacción descrita anteriormente colocando la nueva junta de silicona (foto 4) y una tercera reacción colocando las dos nuevas juntas (fotografía 5).

Se realizaron las tres pruebas moliendo 1 hora que el CaO se hubiese incorporado totalmente. Posteriormente se han pesado las masas finales y se calentó una parte de cada muestra en el horno hasta $950^{\circ}C$ para analizar los compuestos finales por Infrarrojos.



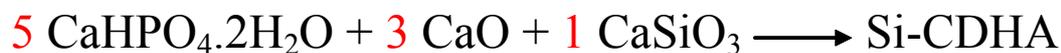
Fotografía 4: tarro con la junta en silicona.



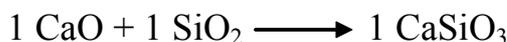
Fotografía 5: tarro con las 2 juntas.

3.1.2.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida por silicio (Si-CDHA)

Para la obtención de la hidroxiapatita deficiente en calcio substituida por silicio con una relación molar Ca/(P+Si) igual a 1,5, se utilizó la siguiente reacción:



Esta reacción se llevó a cabo con dos fuentes de silicio: un silicato de calcio hidratado amorfo (CSHA) sintetizado vía mecanosíntesis y un CaSiO_3 comercial (Aldrich, de referencia 372668-250G). En el caso del silicato amorfo, la mecanosíntesis se llevo a cabo según la reacción:



El CSHA se realizó un estudio anterior llevado a cabo en Francia (7).

Al igual que en la reacción anterior, se molió una masa total de reactivos de 40g.

Tal y como haremos para cada reacción, hemos calculado las proporciones de reactivos para obtener 2g de la muestra al tiempo $t = 0\text{s}$.

Se tomaron 800mg de polvo para los tiempos: 2, 6, 10, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 horas.

➤ **Tratamientos térmicos**

El horno utilizado para los tratamientos térmicos desarrollados a lo largo de este proyecto fue un Hobersal, modelo CNR-58. En todos los tratamientos realizados se utilizaron rampas de calentamiento de $4^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a la temperatura de sinterización deseada.

Se calentaron las muestras hasta 950°C durante 2 horas. Esta calefacción se ha hecho para 2 razones. Primero, era necesario detectar la presencia de silicato de calcio para diferentes tiempos de molido. Segundo, en el objetivo de ver el efecto de la incorporación de silicato sobre la estabilidad de la CDHA a altas temperaturas.

La siguiente reacción es la misma que anteriormente pero con un CaSiO_3 comercial comprado a Aldrich.

Antes de hacer la reacción, queríamos ver la cantidad de agua contenida en este CaSiO_3 (Aldrich), entonces hemos puesto 250mg del reactivo en 4 crisoles para calentarlos a 950°C y ver la pérdida de masa:

24 Preparación y caracterización de hidroxiapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecano-síntesis

Masa de CaSiO ₃ introducida (mg)	Masa de CaSiO ₃ recuperada (mg)	Porcentaje de pérdida de masa (%)
250,2	188,64	24,6
250,6	188,38	24,8
249,7	187,47	24,9
243,7	183,54	24,7

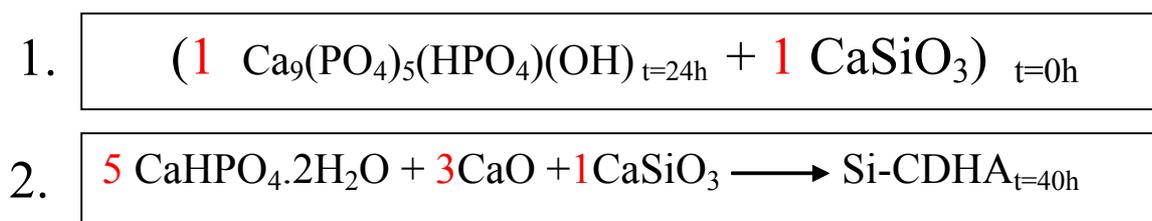
Tabla 5: Datos para el cálculo del porcentaje de agua contenido en el CSH.

Podemos calcular el porcentaje de agua contenido en este CaSiO₃ comercial haciendo la media de los valores de la tercera columna: obtenemos un 24,75% de agua.

Al igual que para las reacciones anteriores, se molió una masa total de reactivos de 40g.

Se tomaron 800mg de muestra para los tiempos: 2h, 6h, 10h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h.

Finalmente, hemos calentado 2 formulaciones diferentes de hidroxiapatita hasta 950°C durante 2 horas con el objetivo de analizar la pérdida de masa:



La formulación 2. viene de la 1ª reacción y hemos puesto en el horno la muestra de t = 40h.

El CaSiO₃ utilizado en estas dos experiencias fue el silicato de calcio hidratado amorfo (CSHA).

Los porcentajes de pérdida de masa obtenidos son:

$$\left\{ \begin{array}{l} W_{t_{\text{Si-CDHA}}} = 6,45\% \\ W_{t_{\text{CDHA+CSH}}} = 13,36\% \end{array} \right.$$

Esta diferencia en la pérdida de masa corresponde a los resultados que esperamos, hay 2 explicaciones:

- Primero, puede ser debido al hecho que para un elemento que tiene una fase solamente, el aumento de temperatura cambia la estructura cristalina de una fase. Esto quiere decir que el CSHA esta bien incorporado en la Si-CDHA.

- Segundo, en la formulación (CDHA+CSHA), la CDHA se transforma en β -TCP con la temperatura (entonces pierde su grupo HPO_4) y el CSHA se convierte en CaSiO_3 y por lo tanto pierde su grupo H_2O . Esto significa también que el CSHA esta mejor incorporado en la Si-CDHA.

3.1.2.3 Hidroxiapatita substituida por silicio (Si-HA)

La segunda formulación estudiada es la hidroxiapatita substituida por silicio hecha a partir de la última muestra ($t = 40\text{h}$) de la reacción anterior y el añadido de un mol de CaO para obtener un producto de relación $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$ igual a 1,67:



Entonces, hemos cogido 20g de la última muestra de Si-CDHA y el cálculo para saber la cantidad de CaO a introducir es:

$$m_{\text{CaO}} = (M_{\text{CaO}} * m_{\text{Si-CDHA}}) / M_{\text{Si-CDHA}}$$

El objetivo de esta reacción es de obtener una hidroxiapatita estequiométrica, entonces hemos hecho la prueba con fenolftaleína para ver el tiempo que toma el CaO a incorporarse.

Al tiempo $t = 11\text{h}30$, la mezcla ha cambiado hasta un color rosa pálido y he pagado la reacción para hacer las análisis.

Al final, hemos calentado el producto de la reacción hasta 1300° durante 2 horas para ver si era posible la obtención de una hidroxiapatita substituida por silicio estable a alta temperatura.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

El principio de funcionamiento de las técnicas utilizadas para caracterizar los productos está descrito en anexos. Esta parte contiene la descripción de los instrumentos utilizados y la metodología empleada, así como las muestras analizadas en cada caso.

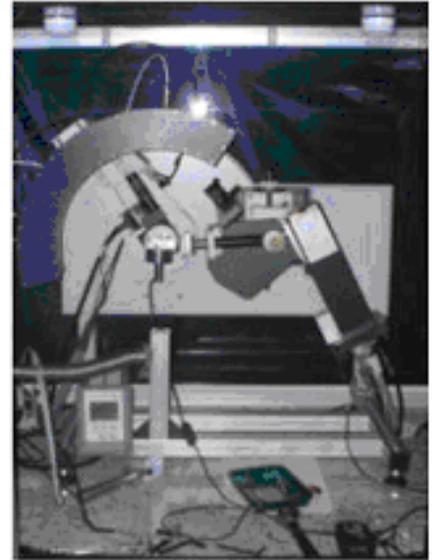
3.3.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Para identificar las fases presentes en nuestras formulaciones de hidroxiapatita, se hace un estudio de difracción de rayos X con



Fotografía 7: Difractómetro de polvo Siemens D-500 (S1) con cargador automático de muestras.

un Difractómetro INEL CPS-120 con detector de posición curva, se utilizó un portamuestras rotatorio. Todas las muestras fueron analizadas con esta máquina del ETSEIB excepto la última muestra de Si-CDHA que fue analizada en el laboratorio de los



Fotografía 6: Difractómetro de polvo INEL CPS-120 con detector de posición curva.

Servicios Científico Técnicos de la UB con un Difractómetro de polvo Siemens D-500 (S1) con cargador automático de muestras.

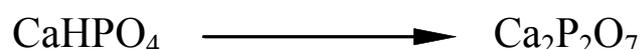
Las muestras siguientes fueron analizadas por esta técnica:

- **CDHA** para los tiempos de molido 0h, 2h, 6h, 10h, 20h y 24h.
- **Si-CDHA con CSH sintetizada a T=25°C** para los tiempos de molido 0h, 2h, 6h, 10h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h.
- **Si-CDHA con CSH sintetizada a T=950°C** para los tiempos de molido 0h, 2h, 6h, 10h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h.
- **Si-CDHA con CaSiO₃ comercial** para los tiempos de molido 0h, 2h, 6h, 10h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h.
- **Si-HA** molida 1h30m y calentada a 1300°C.

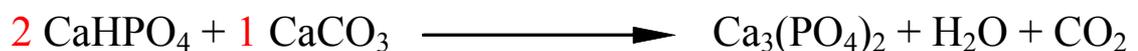
▪ Patrones experimentales

Necesitamos tener los patrones de difracción por rayos X del Pirofosfato (Ca₂P₂O₇) y del β-TCP obtenidos a partir de las reacciones siguientes:

1.



2.



El DCP, llamado fosfato dicálcico tiene la fórmula CaHPO_4 y el TCP, llamado fosfato tricálcico tiene la fórmula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Queremos 2g de cada elemento, entonces pondremos 2g de DCP para la reacción 1. Para la reacción 2, calculamos las masas de reactivos con una regla de tres:

$$m_{\text{CaHPO}_4} = (2 * 2M_{\text{CaHPO}_4}) / (M_{\text{TCP}})$$

Después de haber mezclado los 2 elementos en el mortero, hemos calentado el TCP hasta 950° durante 4 horas para obtener la fase β -TCP y a 1300°C seguido de un temple al aire para obtener la fase α -TCP.

La masa de pirofosfato pesado a la salida del horno era: $M_{\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7} = 1,827\text{g}$.

También se analizaron por rayos X los reactivos utilizados en cada reacción (CaO , DCPD, CaSiO_3). En todas las reacciones realizadas, el producto final obtenido se comparó con una hidroxiapatita estequiométrica comercializada por la casa Merck (1.02196.1000). A fin de obtener una mayor cristalinidad se sinterizó dicha HA a 1000°C durante 4h.

3.3.2 INFRARROJOS

El estudio de las muestras por Infrarrojos es un complemento al estudio de difracción de rayos X. Todas las muestras fueron analizadas en el laboratorio de los "Serveis científicotècnics". La máquina utilizada es un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier Bomem MB120 con un divisor de haz KBr, una fuente Glowber y un detector DTGS. Las medidas se tomaron en un rango espectral desde 4000 a 350 cm^{-1} y con una resolución de 4cm^{-1} .

El análisis se hace en 2 etapas:

- Primero, la preparación de la muestra en forma de pastilla. Hacemos una mezcla en el mortero con una pequeña cucharada de la muestra y otras 3 pequeñas cucharadas de Bromuro de Potasio (KBr) que es un elemento muy útil por que es transparente a los infrarrojos y por lo tanto no se observa sobre el diagrama. Después dejamos la mezcla en un cilindro y lo colocamos en una máquina de prensa para compactar la pastilla.
- Al final, ponemos la pastilla obtenida en la máquina de infrarrojos y lanzamos el análisis. La curva representa la absorbancia de la energía según la longitud de onda.

Las muestras siguientes fueron analizadas por esta técnica:

- **CDHA** para los tiempos de molido 0h, 15min, 30min, 45min, 1h, 1h30, 2h, 6h, 10h, 20h y 24h.
- **CDHA con una junta** a $t = 1h$ de molido para $T = 25^{\circ}C$ y $950^{\circ}C$.
- **CDHA con dos juntas** a $t = 1h$ de molido para $T = 25^{\circ}C$ y $950^{\circ}C$.
- **Si-CDHA con CSH sintetizada a $T=25^{\circ}C$** para los tiempos de molido 0h, 2h, 6h, 10h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h.
- **Si-CDHA con CSH sintetizada a $T=950^{\circ}C$** para los tiempos de molido 0h, 2h, 6h, 10h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h.

3.3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL

Las observaciones se realizan en un microscopio electrónico de barrido ambiental Electroscan 2020.

Las muestras siguientes fueron analizadas por esta técnica:

- **Si-CDHA con $CaSiO_3$ comercial** para el tiempo de molido de 24h.
- **Si-CDHA con $CaSiO_3$ comercial** para el tiempo de molido de 40h.
- **Si-CDHA con CSH sintetizada** a $t = 28h$ de molido.
- **CDHA** a $t = 24h$ de molido.

3.4 ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN

El laboratorio de química y la maquina de centrifugación necesarios al desarrollo de este estudio son disponible en los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Barcelona.

El objetivo de este estudio es encontrar el porcentaje de contaminación procedente de las bolas y del tarro (ambos en ágata) que ha contaminado la hidroxiapatita durante la reacción. Dado que esta contaminación será mayoritariamente SiO_2 , la formulación más adecuada para ver la aparición de silicio es la CDHA a la que no se le añadió silicio.

Para seguir el mismo método de las experiencias hechas en Francia (Montpellier)(tesis Hassane), pesamos un gramo de muestra en un tubo del que conocemos ya la masa y lo mezclamos con 4ml de HCl 10N. Mezclamos el ácido con el polvo con la ayuda de un aparato VORTEX y seguidamente tubo dentro la centrifugadora (ALC 4226 CENTRIFUGE).

A continuación se muestra una tabla recapitulativa de las muestras estudiadas así como los tiempos de centrifugación:

Tiempo de centrifugación	Número de pruebas					
	CDHA T = 0h	CDHA T = 2h	CDHA T = 6h	CDHA T = 10h	CDHA T = 20h	CDHA T = 24h
T = 20 min	2	2	2	2	2	2
T = 30 min	-	-	-	-	-	3
T = 40 min	-	-	-	-	-	3
T = 50 min	-	-	-	-	-	3
T = 60 min	-	-	-	-	-	3
T = 120 min	-	-	-	-	-	3
T = 180 min	-	-	-	-	-	3
Tiempo de centrifugación	Si-CDHA T = 0h	Si-CDHA T = 2h	Si-CDHA T = 6h	Si-CDHA T = 10h	Si-CDHA T = 20h	Si-CDHA T = 24h
T = 20 min	2	2	2	2	2	2
T = 30 min	-	-	-	-	-	2
T = 40 min	-	-	-	-	-	2
T = 50 min	-	-	-	-	-	2
T = 60 min	-	-	-	-	-	2
T = 120 min	-	-	-	-	-	2
T = 180 min	-	-	-	-	-	2

Tabla 4: Pruebas de contaminación con los diferentes tiempos de reacción por la CDHA y Si-CDHA.

Posteriormente, decantamos el soluto para dejar solamente el precipitado de silicio en el tubo y ponerlo en la estufa un tiempo igual para todos (en nuestro caso 2 días). Al final pesamos los tubos que contienen los precipitados y se puede calcular el porcentaje de contaminación que contiene nuestro producto:

$$\%c = (M_{\text{final}} / M_{\text{inicial}}) * 100$$

Los gráficos de la evolución de la contaminación son dados en la parte 5.2 de *Resultados y contaminación*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MOLIDO

Cada vez que hemos empezado una nueva reacción, los parámetros de molido no fueron exactamente igual a los de la reacción anterior.

Primero, por que las bolas sufren de una pérdida de masa y de tamaño durante la reacción, lo cual es importante a supervisar ya que puede influir sobre la reacción. Tal y como se muestra en el trabajo realizado por Mochales *et al.* (8) el producto de la masa y la superficie de las bolas influye en la cinética de la reacción según la siguiente expresión:

$$k / (M \cdot S_a \cdot \omega_d^2) = 7.86 \cdot 10^{-11} r_d^2 + 2.5 \cdot 10^{-11} \quad (r = 0.993)$$

M: Masa de las bolas

S_a: Superficie de las bolas

ω_d: velocidad de rotación del molino

r_d: excentricidad

Este producto se calculó para las cuatro reacciones estudiadas, las cuáles se indican a continuación:

- **CDHA:** $M \times S = 3718879,059 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}$
- **Si-CDHA con silicato amorfo:** $M \times S = 3728781,66607 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}$
- **Si-CDHA con silicato comercial:** $M \times S = 3699547,834 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}$
- **Si-HA:** $M \times S = 3707877,679 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}$

En el objetivo de comparar las reacciones, es importante de calcular antes de cada reacción la superficie total por la masa total de las bolas y que esta relación no cambia mucho.

Por otra parte, hemos hecho 2 reacciones para probar únicamente un nuevo tipo de junta, como lo que fui descrito en la parte Materiales y Métodos. La 1ª reacción de prueba fui lanzado con una junta en silicón de 2 mm de grosor y la 2ª reacción fui lanzado con la junta en silicón más una otra en teflón:

Hemos dejado las reacciones durante 1 hora cada una pues hemos cogido el polvo y la masa final pesada de cada muestra es:

$$\begin{cases} M_{1 \text{ junta}} = 37,5 \text{g} \\ M_{2 \text{ juntas}} = 38,88 \text{g} \end{cases}$$

Esto quiere decir que la reacción con los 2 juntas ha permitido de obtener mas muestras que la con una junta. Sin embargo, la 2ª reacción fui hecha justo después la primera y por lo tanto, el taro no ha quedado mucho tiempo en la estufa: la hipótesis es que hay tan diferencia en las masas cogidas a causa del agua que subsistía. Además, en la segunda reacción, la junta en teflón fue pegado con celo y un poco de polvo quedaba fijado.

A continuación, utilizaremos solo la junta de silicona por razones prácticas y por que nos da buenos resultados.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO POR DRX

En los gráficos siguientes, se puede ver como evolucionan los difractogramas de las tres formulaciones de hidroxiapatita estudiadas. En estos difractogramas, se puede seguir la evolución de las fases presentes para los diferentes tiempos de molido recogidos. A continuación se muestra para cada reacción dos gráficos, el primero representa la evolución de la reacción con el tiempo de molido y el segundo representa el tiempo final de reacción en comparación con el patrón de HA (HA, Merck 1.02196.1000 sinterizada a 1000°C).

4.2.1 Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)

Tal y como se observa en la Figura 9, el producto final obtenido en la reacción de la CDHA no contiene un 100% de fase apatítica. La fase adicional detectada es el β -TCP, el cual tiene una relación molar Ca/P igual a la de la CDHA que intentamos sintetizar. Normalmente el β -TCP se sintetiza a altas temperaturas (aproximadamente 900°C), por lo cual es de extrañar la transformación de CDHA a β -TCP en un proceso de síntesis a bajas temperaturas. Tal y como podemos observar en la Figura 8, la transformación de CDHA a β -TCP aumenta con el tiempo de molido (los cuadrados representan los picos significativos de HA). Hay dos posibles explicaciones a este hecho:

1. El proceso de molido a tiempos largos proporciona suficiente energía para dicha transformación.
2. La contaminación de silicio proveniente del ágata del molino facilita dicha transformación a bajas temperaturas.

4.2.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio amorfo (Si-CDHA)

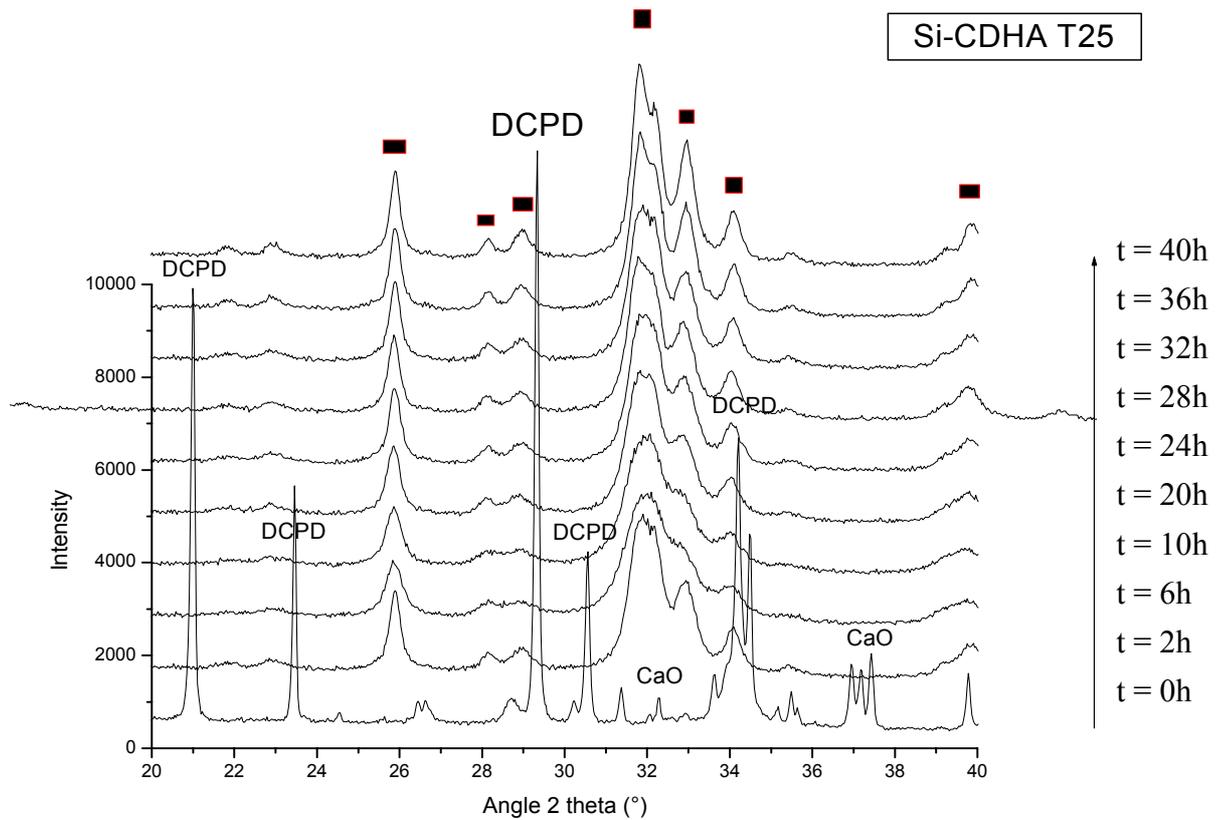


Figura 10: Curvas DRX de la Si-CDHA a $T = 25^\circ\text{C}$ para diferentes tiempos de molido.

Los picos de DCPD y CaO son marcados para el tiempo, $t = 0\text{h}$ y los picos de HA son marcados por un cuadrado.

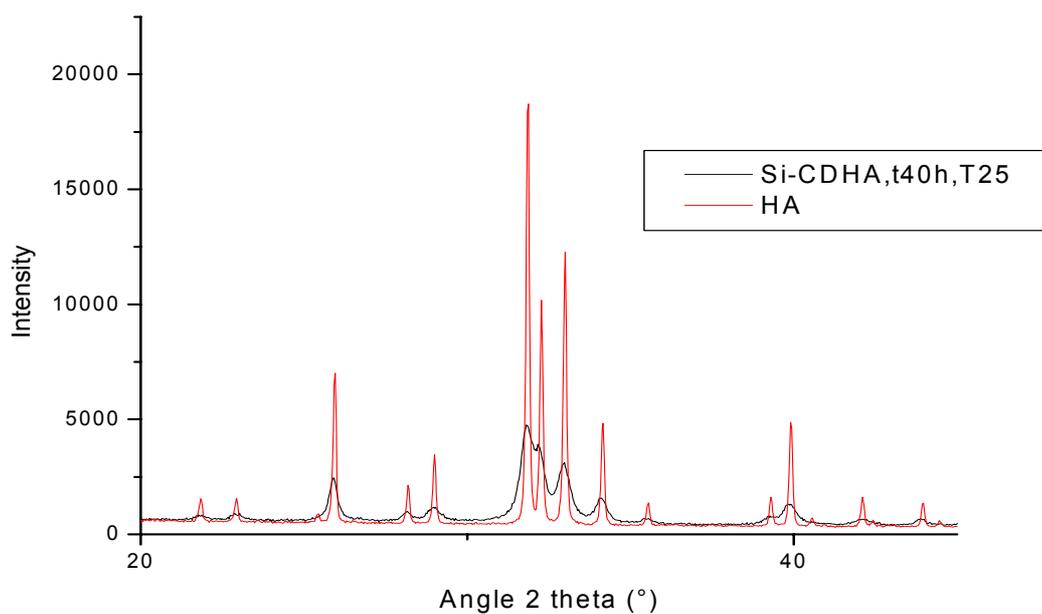


Figura 11: Curva DRX de la Si-CDHA a $t = 40\text{h}$, $T = 25^\circ\text{C}$ en comparación con el patrón de HA.

34 Preparación y caracterización de hidroxiapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecanosíntesis

Antes de moler, solamente DCPD y CaO fue detectado por DRX. No se detectó el silicato puesto que es amorfo a temperatura ambiente. Después de 2h de molido, los curvas DRX mostraron un perfil apatítico. El único cambio detectado con el aumento del tiempo de molido es un aumento progresivo de la cristalinidad de las muestras.

La fig. 11 muestra que la Si-CDHA obtenida después de un molido de 40h se ajusta perfectamente al patrón de HA.

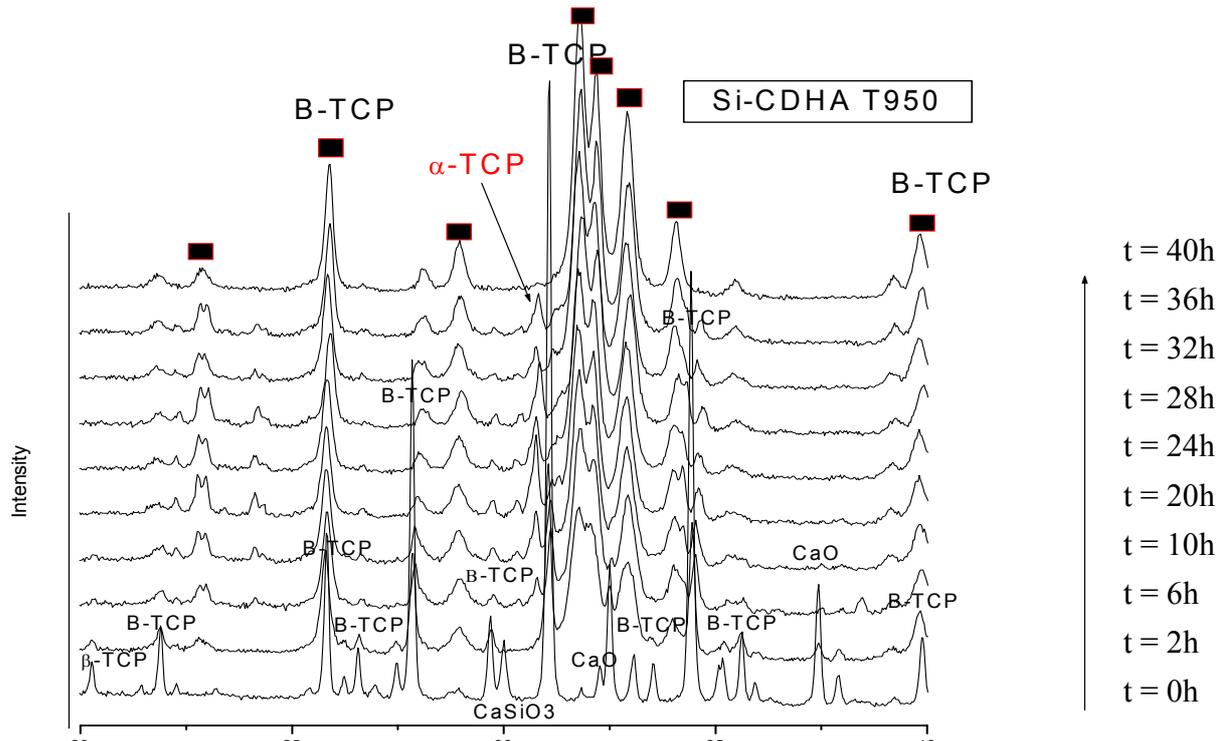


Figura 12: Curvas DRX de la Si-CDHA a $T = 950^{\circ}\text{C}$ para diferentes tiempos de molido.

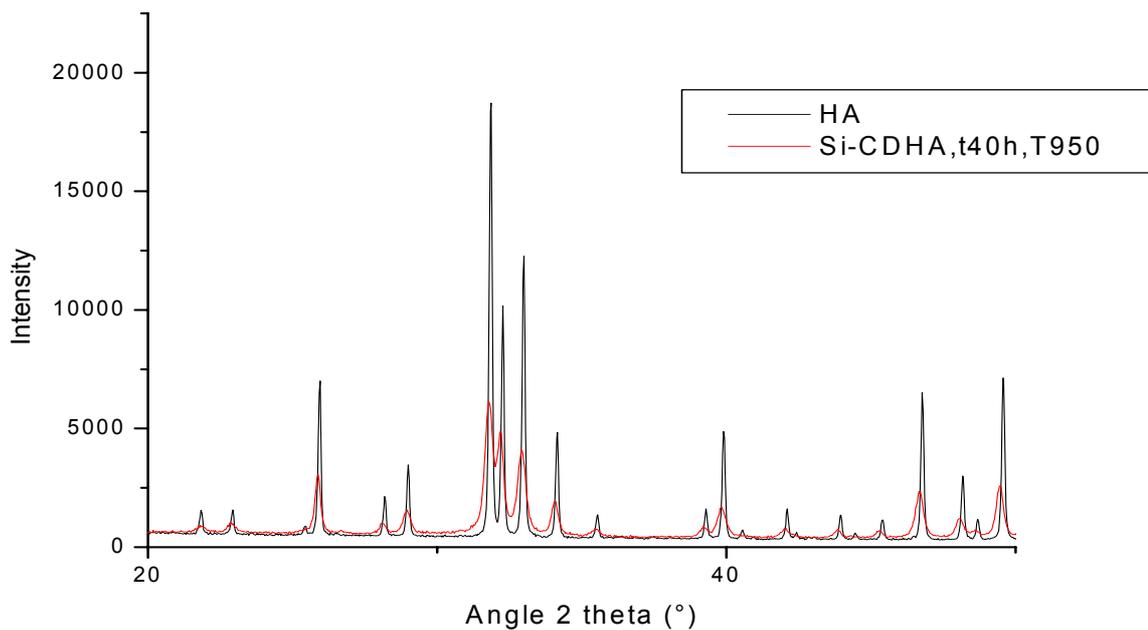


Figura 13: Curva DRX de la Si-CDHA a 950°C, t=40h en comparación con el patrón de HA.

Mirando la fig. 12, se observa que para bajos tiempos de molido, una mezcla de β -TCP, CaO y CaSiO_3 se ha formado. Sin embargo, para tiempos altos de molido, el CaSiO_3 no se detecta, la cantidad de TCP disminuye y la fase apatítica crece. A partir de las 6h de molido se detecta a-TCP. Esta fase a parece estar relacionada con la transformación de la fase b debido al efecto del silicio, que según diversos estudios estabiliza la fase a-TCP por debajo de la temperatura de transición b-a habitual (1180°C) (9;10).

Al final de la reacción, el TCP se detecta difícilmente y la fase principal es hidroxiapatita. Se sugiere que la introducción de silicato en la estructura de la CDHA estabiliza la fase apatítica a altas temperaturas.

Como para la muestra final de la Si-CDHA a $T = 25^\circ\text{C}$, la Si-CDHA obtenida después de un molido de 40h y sinterizada a 950°C se ajusta perfectamente al patrón de HA (fig. 13).

4.2.3 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida por silicio comercial (Si-CDHA)

36 Preparación y caracterización de hidroxiapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecosíntesis

Al igual que en la reacción con el silicato amorfo sintetizado en el laboratorio, para tiempos cortos se observa una mezcla de DCPD y CaO, sin ser posible la detección de CaSiO_3 debido a su baja cristalinidad. Al aumentar el tiempo de molido, los reactivos desaparecen a medida que aparece una fase apatítica.

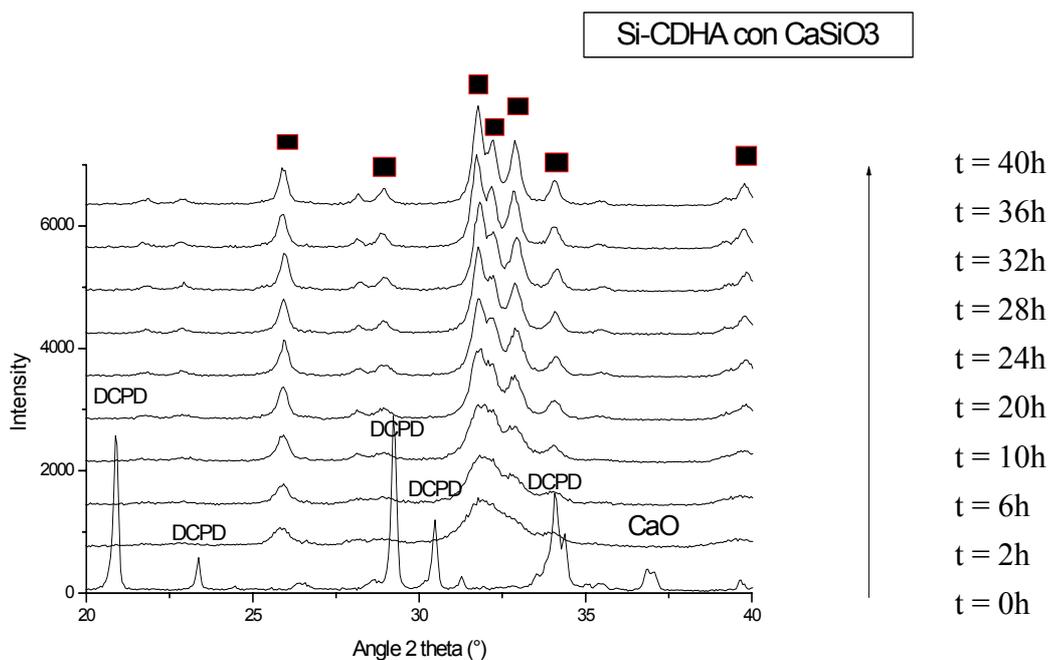


Figura 14: Curvas DRX de la Si-CDHA para diferentes tiempos de molido.

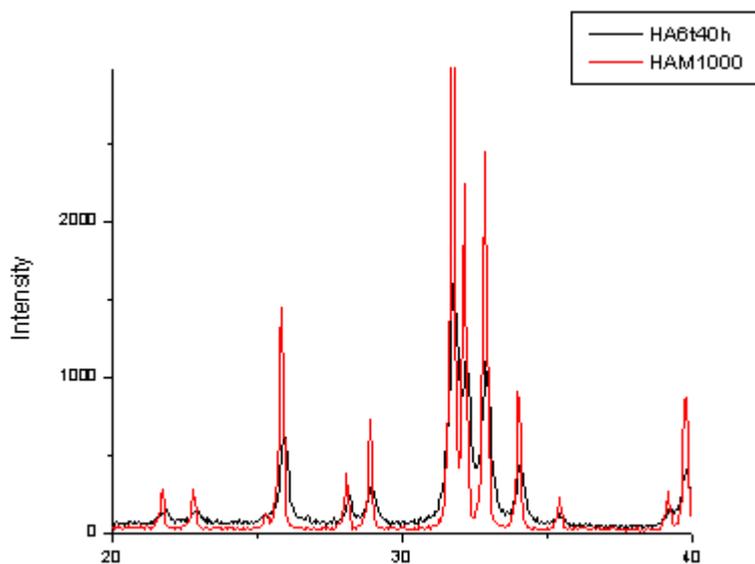


Figura 15: Curva DRX de la Si-CDHA a $t = 40\text{h}$ en comparación con el patrón de HA.

Como en el caso anterior, la Si-CDHA obtenida después de un molido de 40h se ajusta perfectamente al patrón de HA.

4.2.4 Hidroxiapatita substituida con silicio (Si-HA)

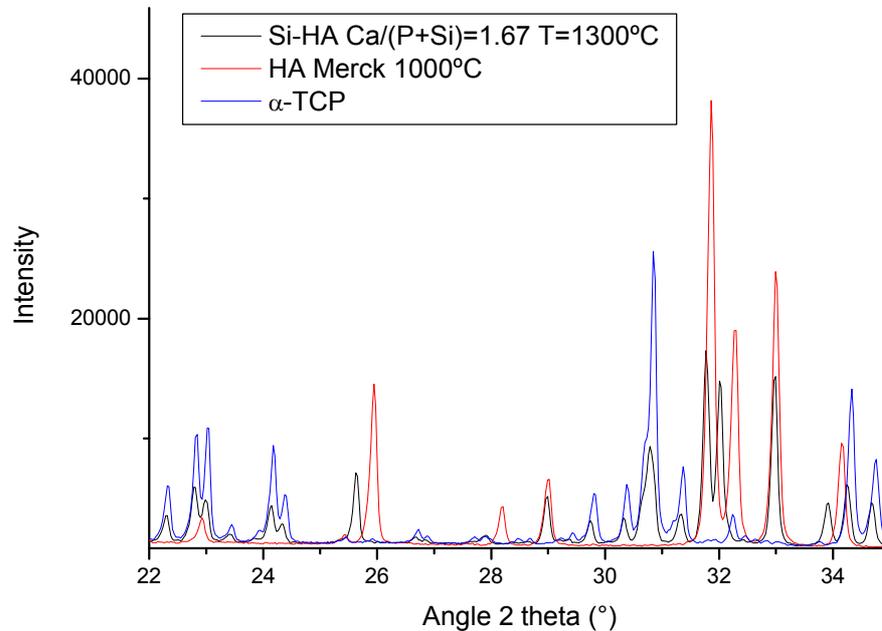


Figura 16: Curva DRX de la Si-HA a 1300°C en comparación con los patrones de HA y α-TCP.

Tal y como se observa en la Fig. 16, contrariamente a lo esperado se ha obtenido una mezcla de HA y α-TCP. Esto puede ser debido a una falta de precisión en la relación entre los reactivos a causa de su hidratación y/o carbonatación, las cuáles no se tuvieron en cuenta al pesar los mismos.

También podría deberse a la contaminación de ágata proveniente del molino, la cual provocaría un aumento de iones silicio en el producto siendo la relación Ca/(P+Si) menor a 1.67. Además se observa un importante desplazamiento de los picos de Si-HA respecto a la HA comercial, el cual puede atribuirse al efecto de la incorporación de iones silicio en la estructura apatítica.

4.2.5 Reactivos utilizados como fuentes de silicio

- CaSiO₃ sintetizado por mecano-síntesis

Según un estudio realizado anteriormente (11), en el cual se sintetizó el CaSiO_3 utilizado en la primera reacción de Si-CDHA desarrollada en este proyecto, se observa que dicho silicato es amorfo a temperatura ambiente pasando a transformarse en wolastonita al sinterizarlo a 950°C .

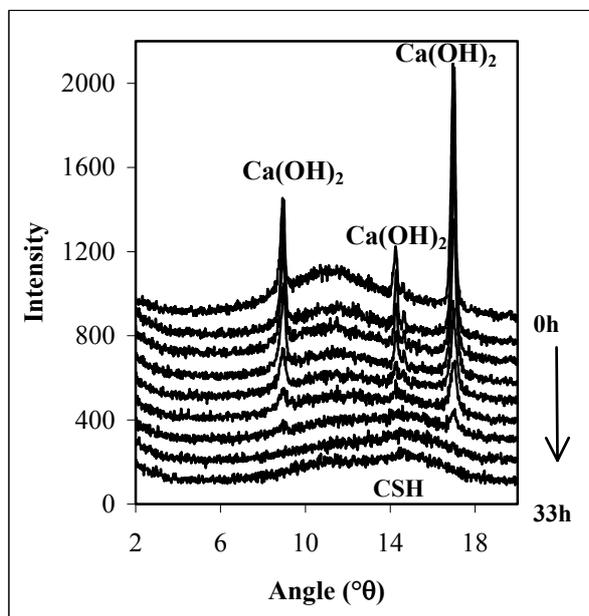


Figura 17: Curvas DRX de evolución del CaSiO_3 sintetizado según el tiempo de molido.

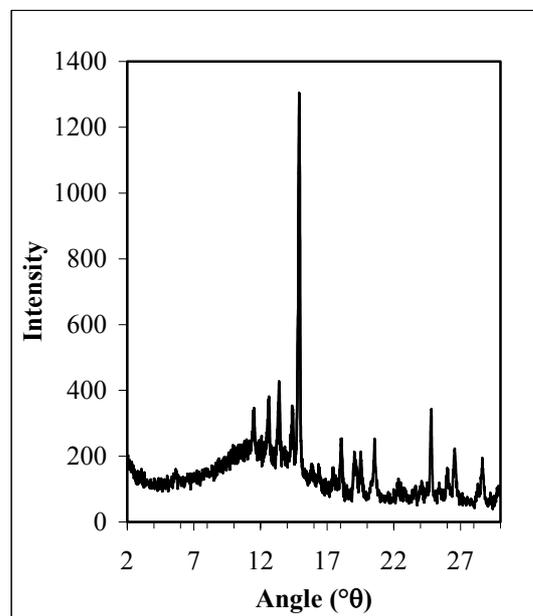


Figura 18: Curva DRX del CaSiO_3 sintetizado al último tiempo de molido.

➤ CaSiO_3 Aldrich (referencia 372668-250G)

Antes de sinterizar el reactivo se observa un wolastonita de baja cristalinidad. Después de sinterizarlo a 950°C durante 2h30 se observa el DRX correspondiente al CaSiO_3 (JCPDS).

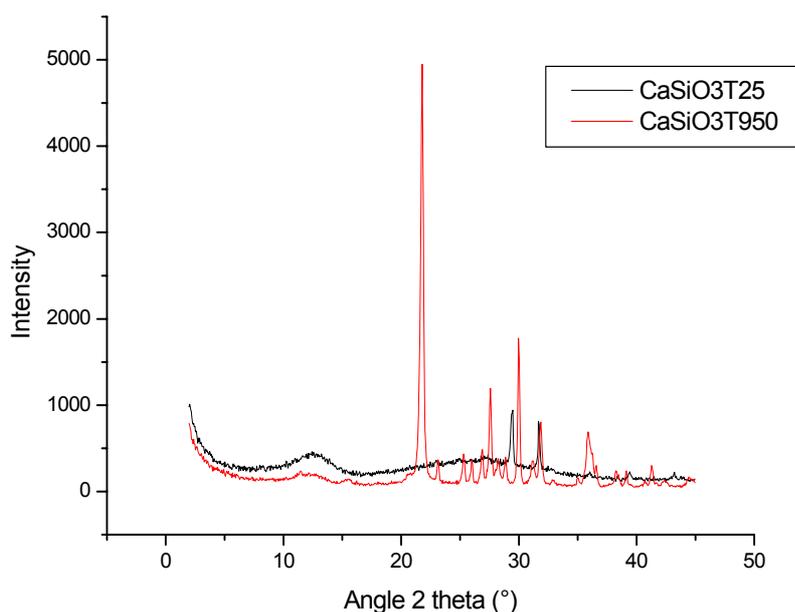


Figura 19: Curvas DRX de los CaSiO_3 a temperatura ambiental y calcinada a 950°C .

4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL PRODUCTO POR INFRARROJOS

Antes de comentar los elementos contenidos en las diferentes formulaciones de hidroxiapatita estudiadas por infrarrojos, es importante conocer los picos que corresponden a una estructura apatítica (12;13):

	(PO ₄) ³⁻	(OH) ⁻	H ₂ O	(HPO ₄) ²⁻	CO ₃ ²⁻ -Ap tipo A	CO ₃ ²⁻ -Ap tipo B
Frecuencia de los picos significativos (cm ⁻¹)	962, 470	3573, 3580	3700, 3000	1119, 1098	878, 1455, 1495	873, 1418, 1455
	1090, 1062, 1030	631, 630	1615	1114	879, 1457, 1548	1465, 1412, 873
	601, 571, 565			1080, 1030		

Tabla 4: recapitulación de los picos más significativos de una hidroxiapatita.

El grupo (HPO₄)²⁻ se observa en apatitas deficientes en calcio (Ca/P<1.67). A menor relación molar Ca/P mayor cantidad de grupos (HPO₄)²⁻. Las apatitas carbonatadas se pueden dividir en dos grupos según el CO₃²⁻ sustituya grupos (OH)⁻ (tipo A) o grupos (PO₄)³⁻ (tipo B).

4.3.1 Reactivos utilizados

Esta parte agrupa las curvas infrarrojos de los reactivos utilizados para obtener las hidroxiapatitas:

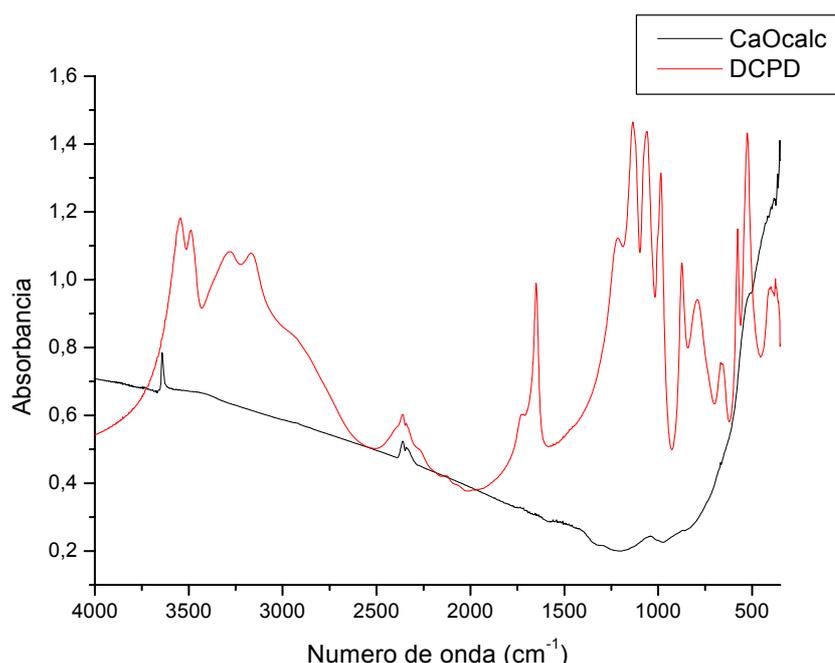


Figura 20: Curvas Infrarrojos de los 2 reactivos utilizados para todas las reacciones (DCPD y CaO calcinado).

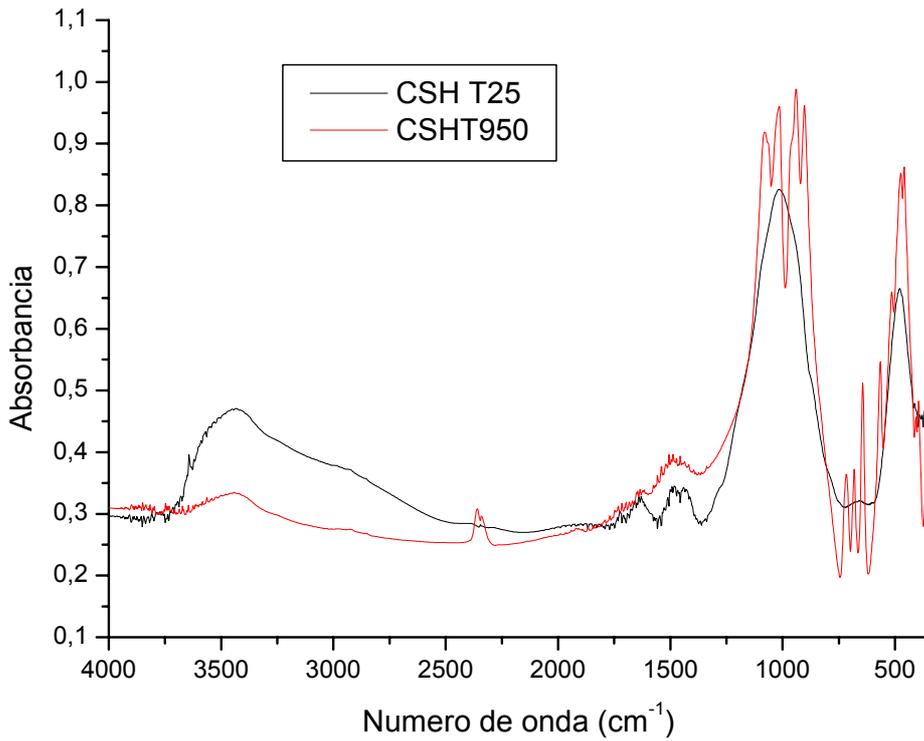


Figura 21: Curvas Infrarrojos de los CSH a temperatura ambiental y calcinada a 950°C.

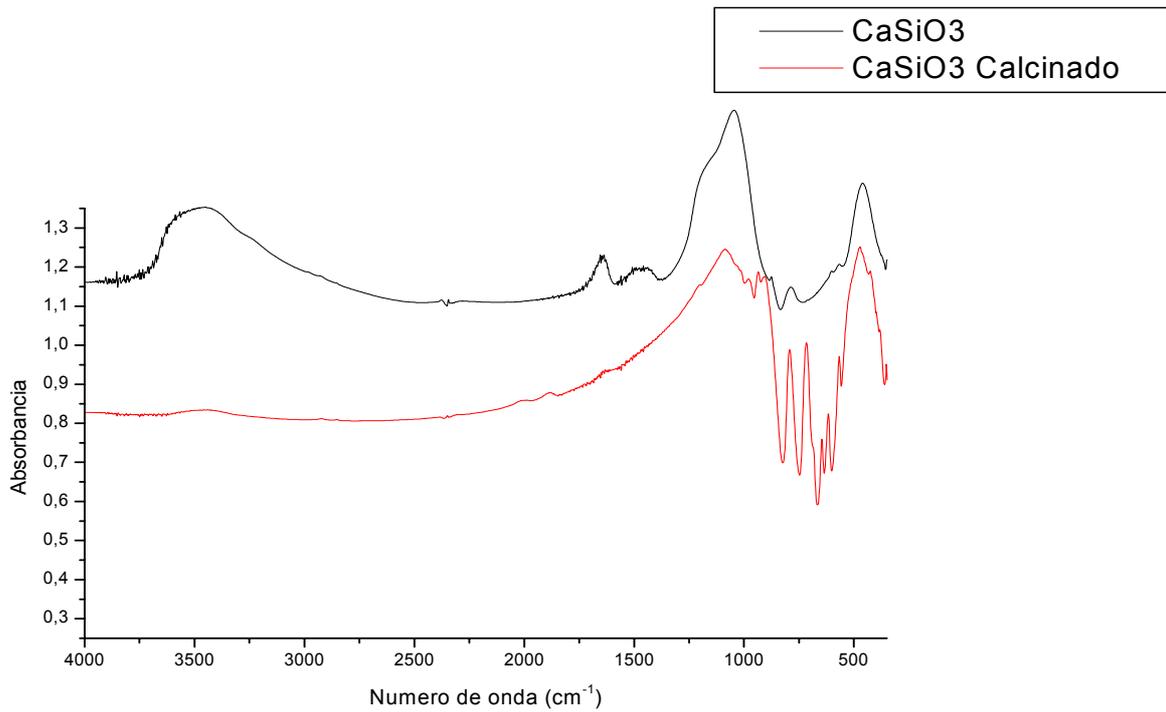


Figura 22: Curvas Infrarrojos de los CaSiO₃ a temperatura ambiental y calcinada a 950°C.

4.3.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)

Al igual que en los DRX, para $t = 0h$ observamos las bandas correspondientes al DCPD y al CaO. A partir de 30 minutos de molido se empieza a observar la formación de una estructura apatítica. Para tiempos largos de reacción se observan las siguientes bandas:

- Las frecuencias ν_3 y ν_1 del fosfato se identifican por tres picos (1089, 1039 y 958 cm^{-1}) tal como ν_4 y ν_2 por tres más picos (603, 565 y 472 cm^{-1}).

- Los picos de 1456 y 1417 cm^{-1} se podían asignar a un substitución de carbonato tipo B (14) aunque estos picos no se observan para los tiempos largos de molido.

- La frecuencia ν_5 que representa el enlace P-OH del elemento HPO_4 se observa a 873 cm^{-1} .

A su vez la banda observada a 873 cm^{-1} se puede atribuir también a un grupo $(\text{CO}_3)^{2-}$ correspondiente a una apatita carbonatada tipo B(12), aunque cabe la duda, ya que al final de la reacción no observamos los picos anteriores (flechas), de si se trata del modo de vibración P-OH ν_5 HPO_4 el cual se ha detectado en algunos estudios a 875 cm^{-1} (15).

- La presencia de CO_2 se detecta por los picos 2356 y 2341 cm^{-1} . Una banda débil del OH en 3568 cm^{-1} fue oscurecida parcialmente por la amplia banda entre $2500\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ que es característico de la humedad en la muestra. Por otra parte, una banda más fuerte del OH se detecta en 1647 cm^{-1} (16).

- Si comparamos el producto final ($t=24h$) con el patrón de HA (Fig.25) se observan algunas diferencias debido a la existencia de β -TCP (hombro a 544 cm^{-1} y pico muy débil a 444 cm^{-1}). Pero también aparecen picos adicionales en 800 , 779 y 735 cm^{-1} no atribuibles a ninguna banda de fosfato de calcio. Estos picos se podrían atribuir a la existencia de contaminación de ágata proveniente del molino, ahora bien para poder confirmar este hecho sería necesario el análisis por infrarrojos de dicha ágata.

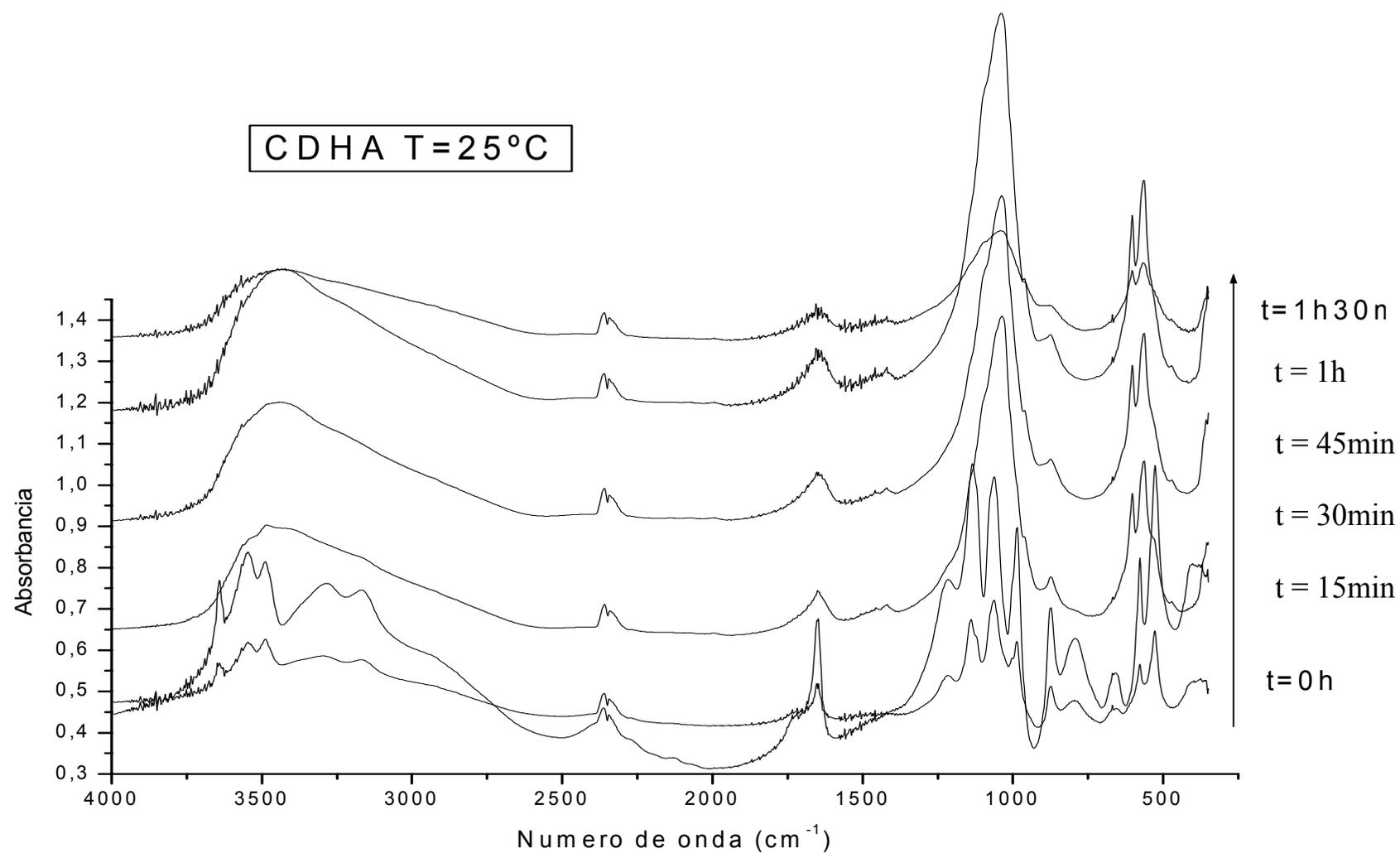


Figura 23: Curvas Infrarrojos de la CDHA para diferentes tiempos de molido entre 0h y 1h30m.

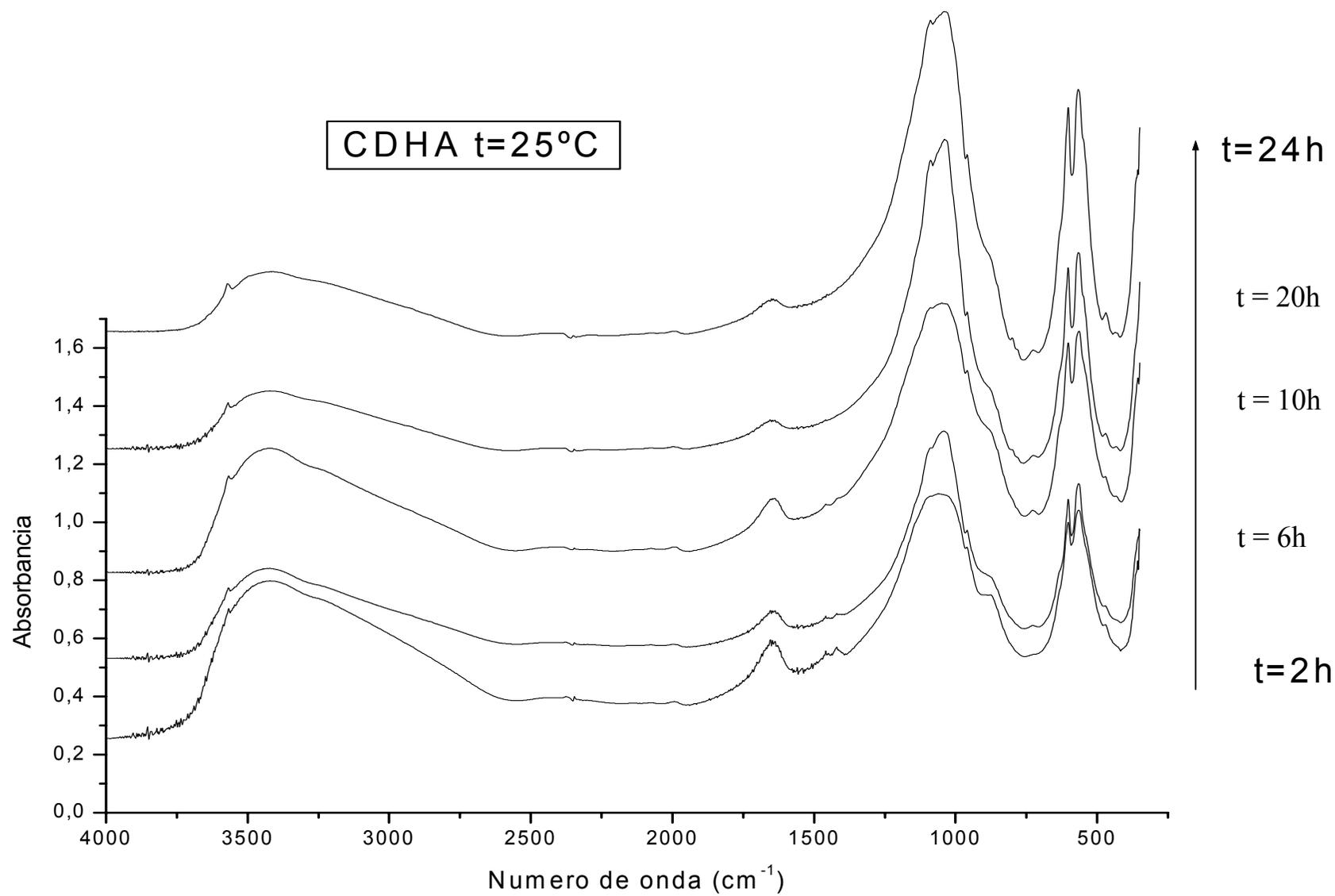


Figura 24: Curvas Infrarrojos de la CDHA para diferentes tiempos de molido entre 2h y 24h.

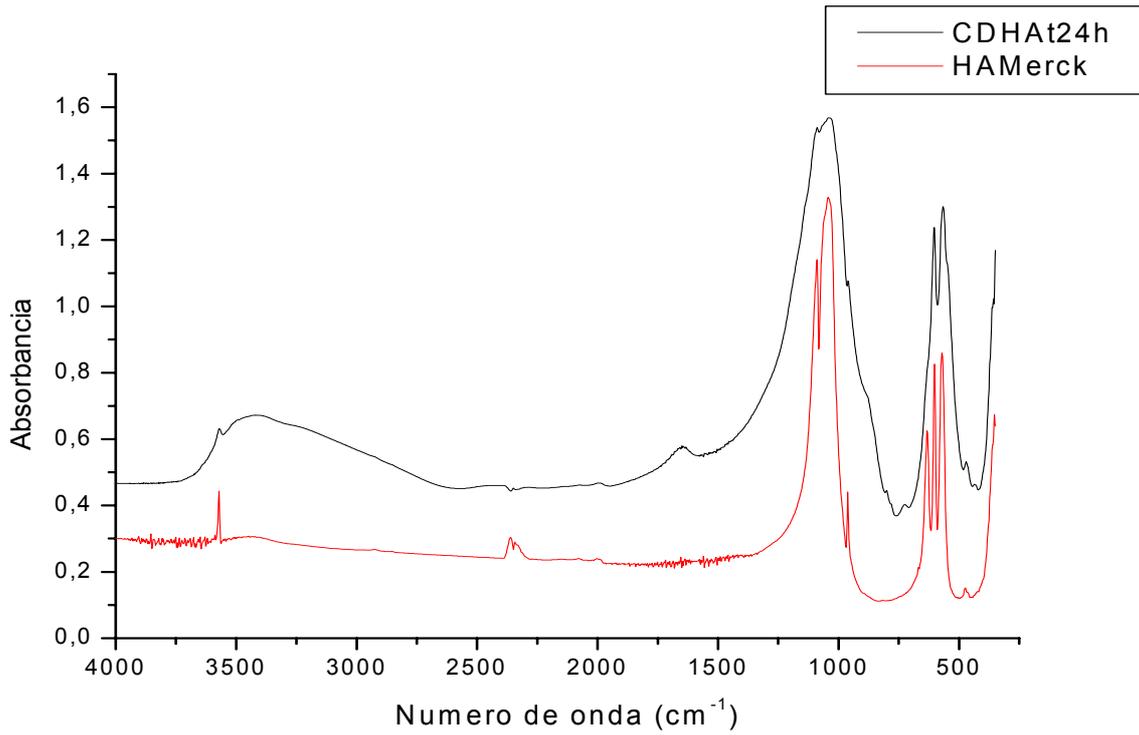


Figura 25: Curvas Infrarrojos de la CDHA, $t=24h$ en comparación con el patrón de HA.

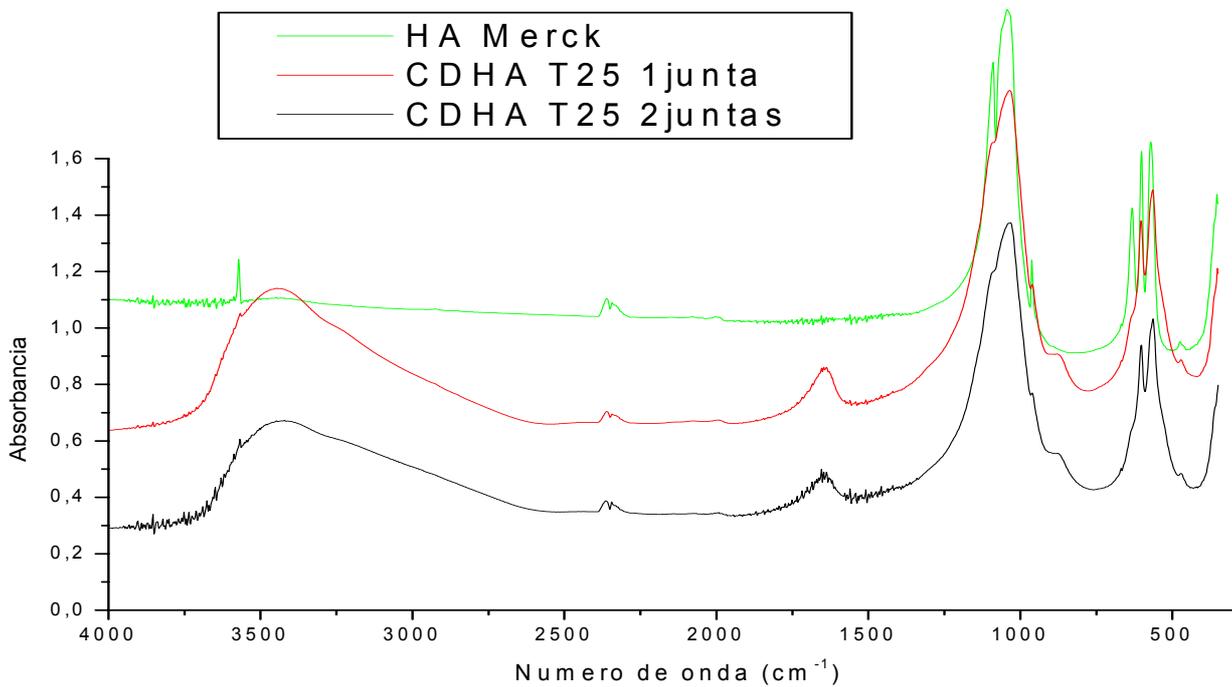


Figura 26: Curvas Infrarrojos de comparación de las juntas para la CDHA a 25°C con el patrón de HA

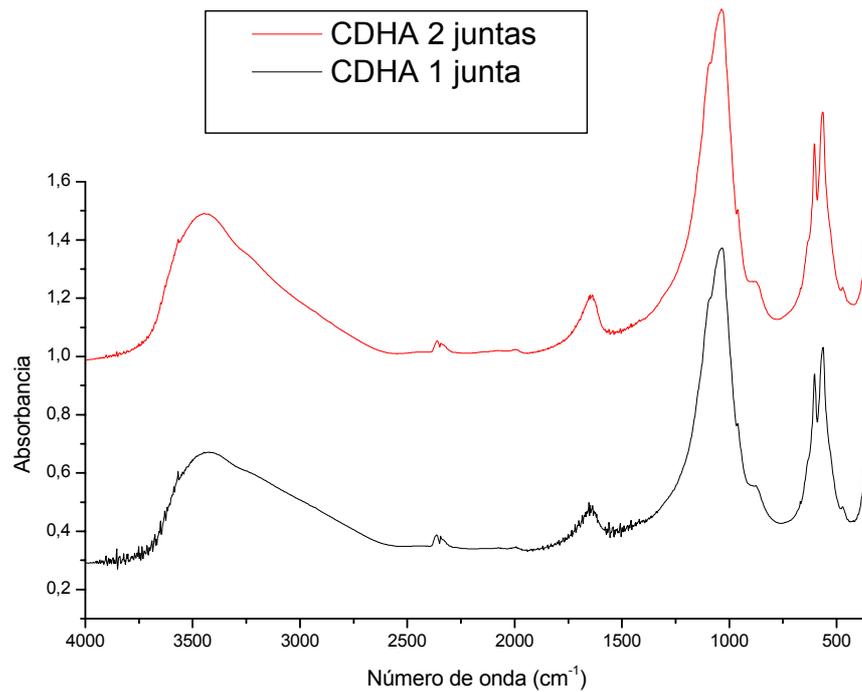


Figura 27: Curvas Infrarrojos de comparación de las juntas para la CDHA a 950°C con el patrón de HA

Tal y como se observa en la Fig.27, al calentar a 950°C los productos obtenidos con los distintos protocolos de cierre del tarro se observan las bandas correspondientes al β -TCP: el fosfato de la banda ν_3 fue identificada por cuatro bandas fuertes (en 1120, 1099, 1045 y 1024 cm^{-1}) con dos hombros débiles (en 1082 y 1066 cm^{-1}), la banda ν_1 por dos picos (en 970 y 943 cm^{-1}) y la banda ν_4 por dos bandas fuertes (en 606 y 554 cm^{-1}) con dos hombros débiles en la primera banda (en 592 y 579 cm^{-1}) y un hombro débil en segunda (en 544 cm^{-1}) (17;18).

4.3.3 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio amorfo (Si-CDHA)

Como en el caso de la CDHA, para $t = 0h$ observamos las bandas correspondientes al DCPD y al CaO, sin apreciarse las bandas de CSH. A partir de 2 horas se observa una estructura apatítica.

De la comparación entre los espectros de FTIR de este Si-CDHA y el polvo obtenido después de 40h de moler, se observa las diferencias en los picos de absorción. El espectro de FTIR del polvo obtenido después de 40h de moler demuestra varios picos adicionales significativos, algunos de los cuales se han divulgado como resultado de la substitución del silicio en el enrejado de la apatita (Figs.28, 29). Por ejemplo, los picos detectados en 894 y 503 cm^{-1} han sido divulgados ya por Leventouri *et al.* (19) y Botelho *et al.* (20) respectivamente.

Sin embargo otros picos adicionales fueron encontrados:

- Los picos en 1456 y 1417 cm^{-1} se podían asignar a un substitución de carbonato tipo B (21), que no fue observado en la CDHA.
- Los picos detectados en la gama $2000-2200\text{ cm}^{-1}$ han sido divulgados por Gibson *et al.* (22), aunque detectaron estos picos en la Si-HA calentada.
- El pico en 3566 cm^{-1} que corresponde al grupo OH^- ha aumentado perceptiblemente en comparación con el espectro de CDHA, contrariamente a los resultados divulgados en la literatura (19;20;22;23). Esto indicaría que el grupo OH^- experimentó un aumento significativo en intensidad con la introducción del silicio en la red de la hidroxiapatita.

En el caso de las muestras sinterizadas a 950°C para $t = 0h$, observamos las bandas típicas del β -TCP ya comentadas en el apartado anterior. A mayores tiempos de molido aparecen las bandas correspondientes a la HA, a las cuales se ven añadidas algunas bandas atribuibles al efecto de los iones silicio. Por ejemplo, los picos detectados en 854 y 498 cm^{-1} podían corresponder al enlace Si-O. Mientras que tres picos detectados en 785 , 715 y 696 cm^{-1} podrían corresponder al enlace Si-O-Si.

Además se observa una substitución de carbonato tipo A, ya que se detectan bandas a 1458 y a 877 cm^{-1} (12). A su vez se detecta una banda a 1545 , que podría ser debida también a éste tipo de carbonatación.

La tabla siguiente agrupa los datos de de la pérdida de masa de las muestras después de haberlas calentado a 950°C durante 4h.

Tiempos (horas)	0	2	6	10	20	24	28	32	36	40
Perdida de masa (%)	25,4	20,72	11,17	12,3	13,6	13,1	11,6	10,66	9,2	9,28

Tabla 4: Pérdida de masa de las muestras de Si-CDHA durante el tratamiento térmico.

De los resultados obtenidos se extrae que la pérdida de masa disminuye con el tiempo de molido. Esto puede ser debido a la menor pérdida de $(OH)^-$ y por tanto una menor pérdida de grupos $(HPO_4)^{2-}$, lo cual explicaría la estabilización de la fase apatítica con un mayor tiempo de molido.

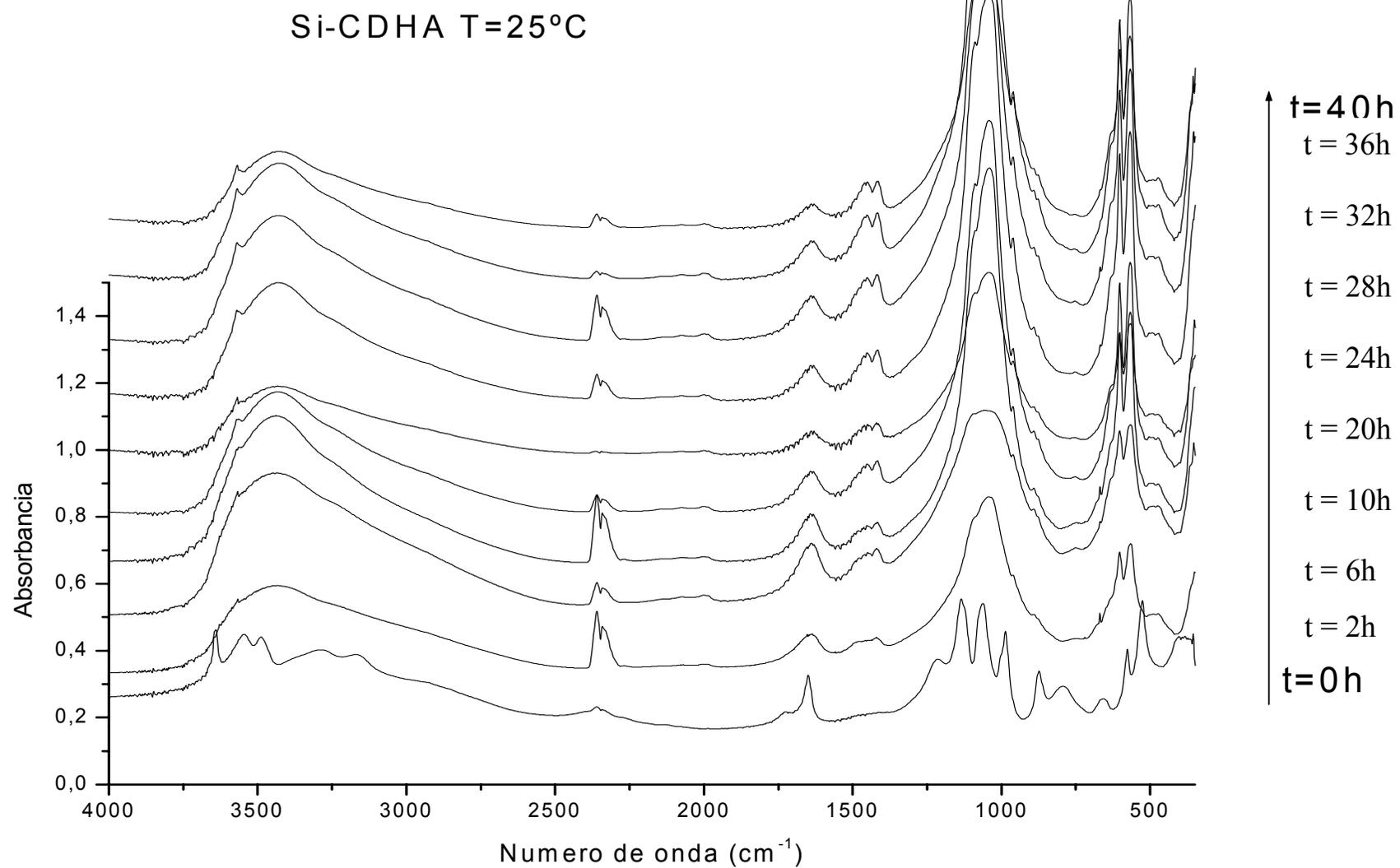


Figura 28: Curvas Infrarrojos de la Si-CDHA a 25°C para diferentes tiempos de molido.

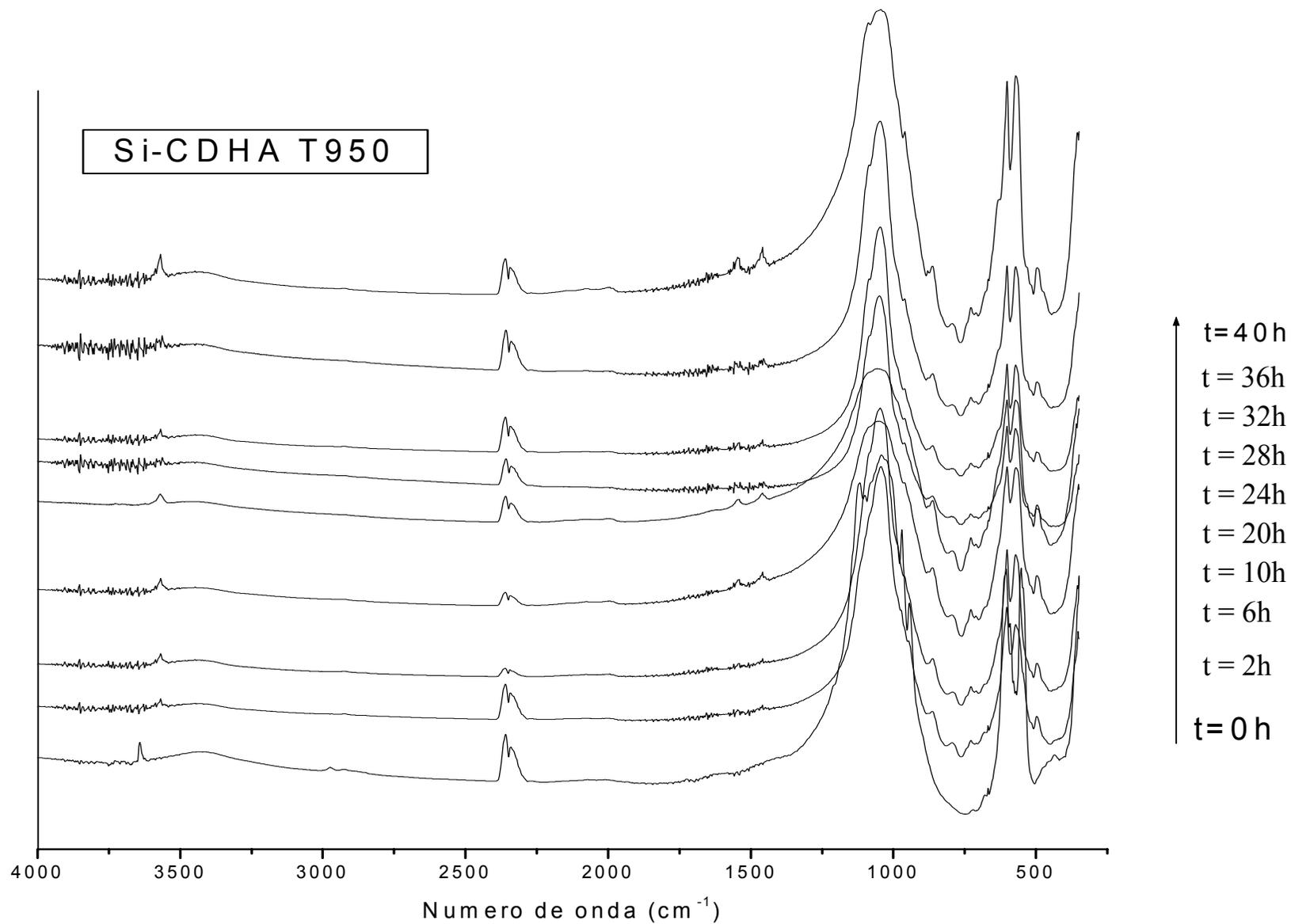


Figura 29: Curvas Infrarrojos de la Si-CDHA a 950°C para diferentes tiempos de molido.

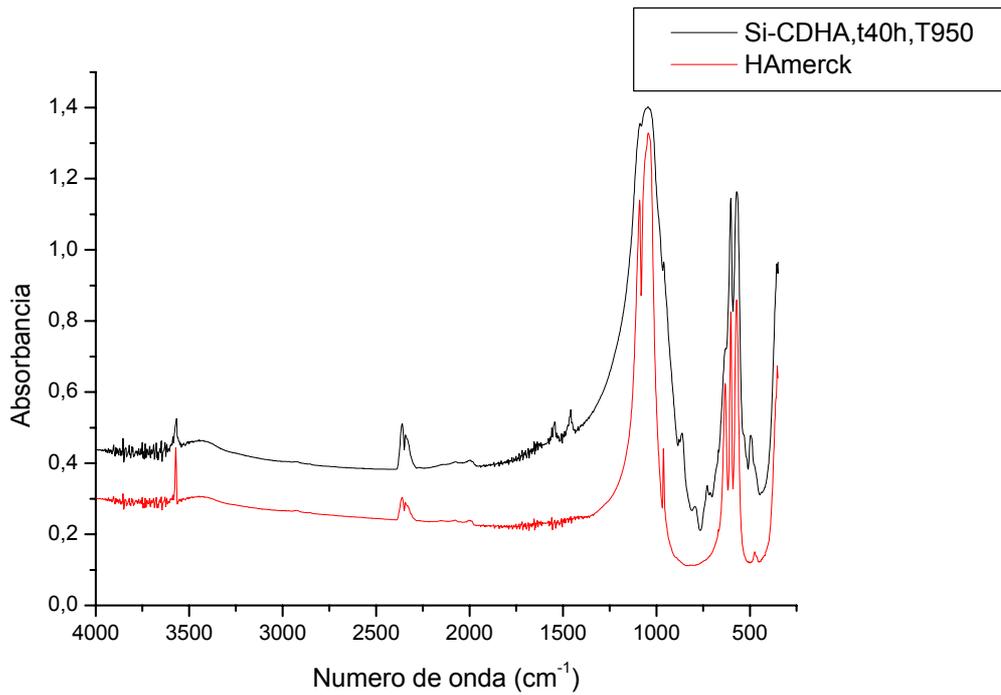


Figura 30: Curva Infrarrojo de la Si-CDHA a 950°C, t=40h en comparación con el patrón de HA.

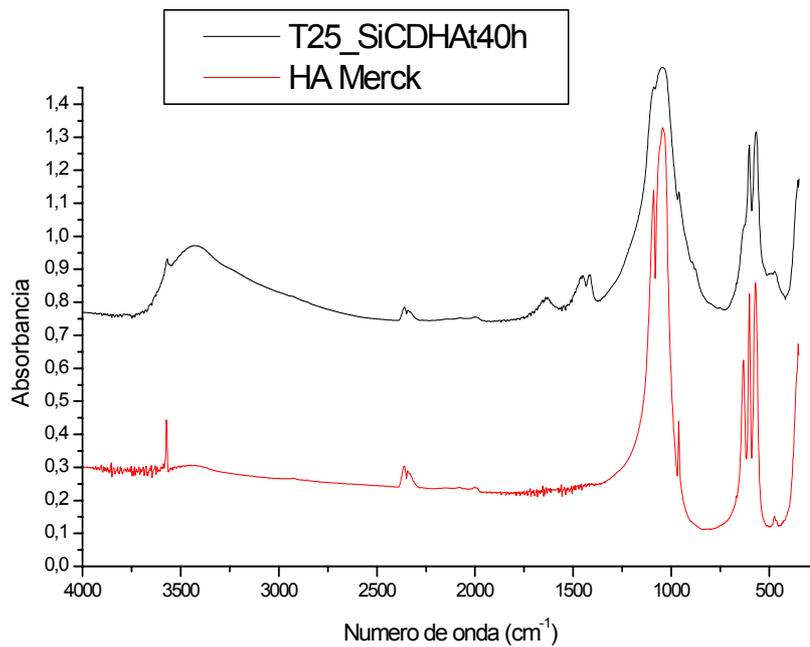


Figura 31: Curva Infrarrojo de la Si-CDHA a 25°C, t=40h en comparación con el patrón de HA.

4.3.4 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio comercial (Si-CDHA)

Para esta reacción se ha obviado el resultado correspondiente al tiempo de molido de 36h. Los infrarrojos muestran las típicas bandas de fosfatos correspondientes a la hidroxiapatita, ya mencionadas en los apartados anteriores.

Para esta reacción se ha obviado el resultado correspondiente al tiempo de molido de 36h. Los infrarrojos muestran las típicas bandas de fosfatos correspondientes a la hidroxiapatita, ya mencionadas en los apartados anteriores. Ha que destacar que los picos debidos a sustitución de grupos carbonatos en este caso se observan a 1458 , 1419 y 877 cm^{-1} , lo cual indica una sustitución tipo AB. En cuanto a las bandas representativas de grupos con silicio sólo observamos una banda adicional a 800 cm^{-1} (no detectada en la reacción anterior con el CSH amorfo) y varias bandas entre 2000 y 2200 cm^{-1} (detectadas anteriormente).

También cabe destacar el aumento de grupos $(\text{OH})^-$ con el tiempo de molido, tal y como podemos observar en la Fig.33 con el aumento de las bandas a 630 y 3569 entre los tiempos de molido de 2 y 40h. También parece haber habido un aumento del pico a 474 cm^{-1} . Aunque, tal y como ya se ha comentado para las reacciones anteriores, estas observaciones no pueden tomarse como una conclusión definitiva ya que los análisis realizados han sido cualitativos.

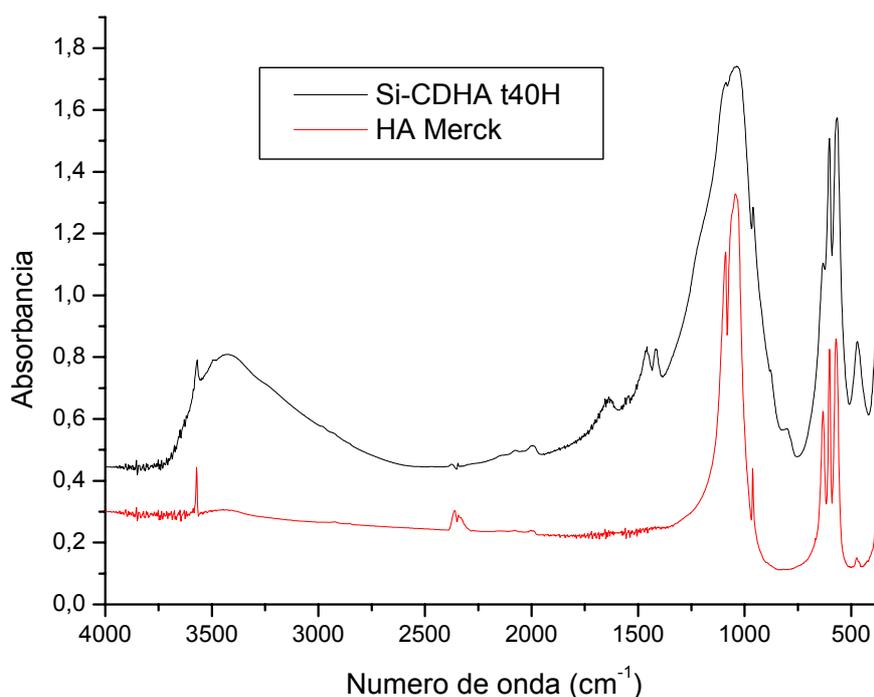


Figura 32: Curva Infrarrojo de la Si-CDHA con CaSiO_3 , $t = 40\text{h}$ en comparación con el patrón de HA.

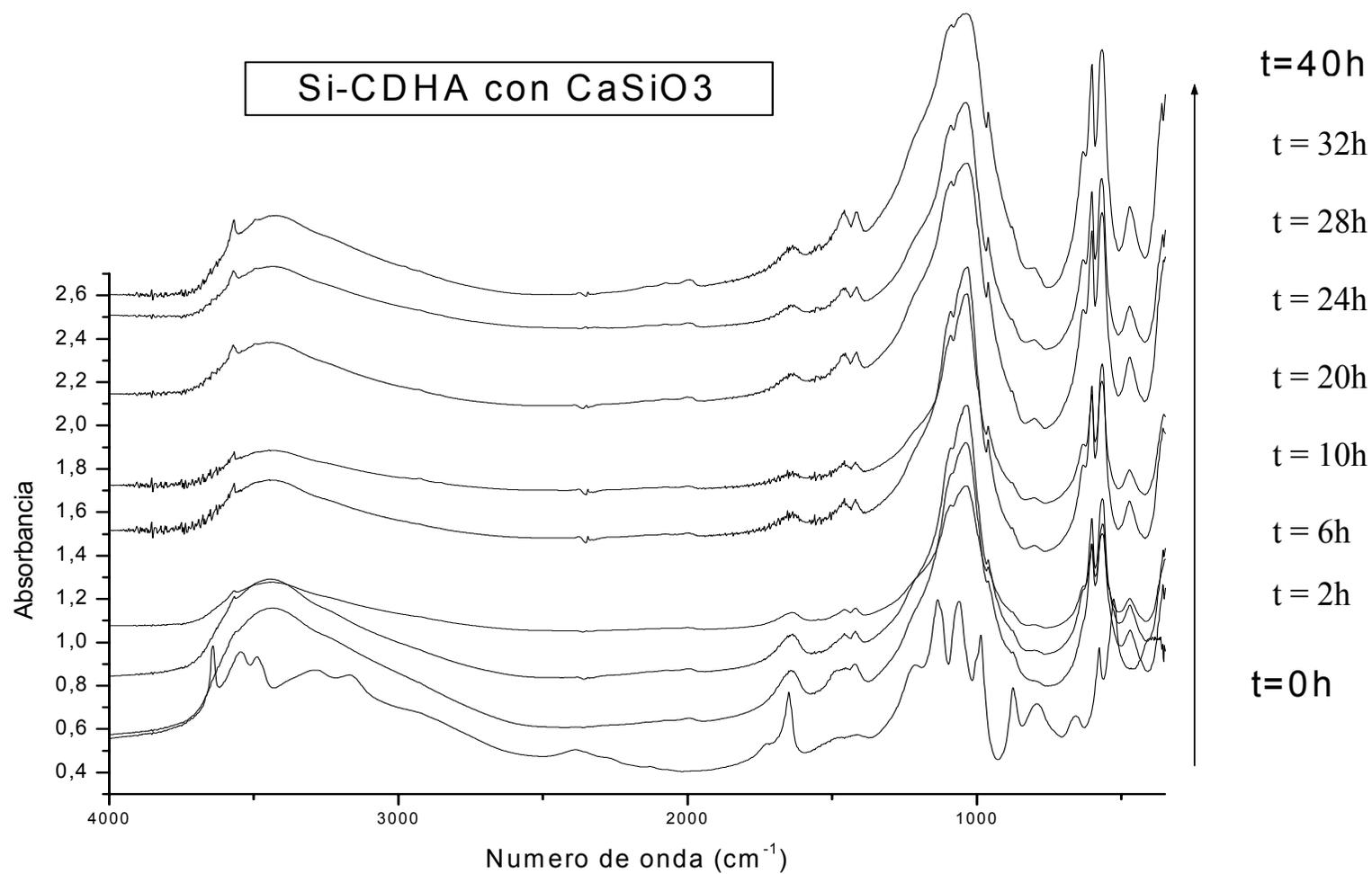


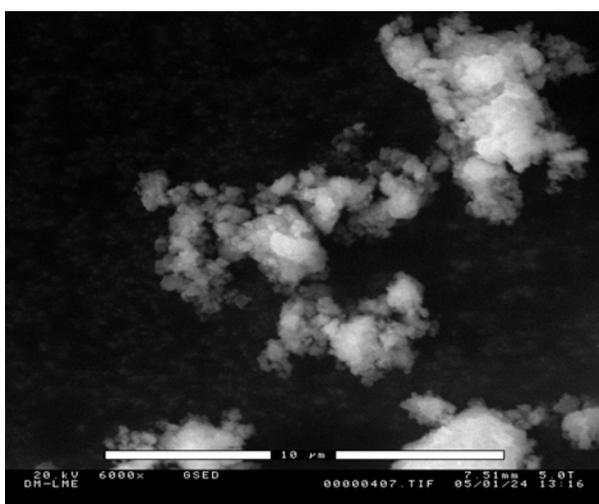
Figura 33: Curvas Infrarrojos de la Si-CDHA con CaSiO₃ para diferentes tiempos de molido.

Figura 32: Curvas

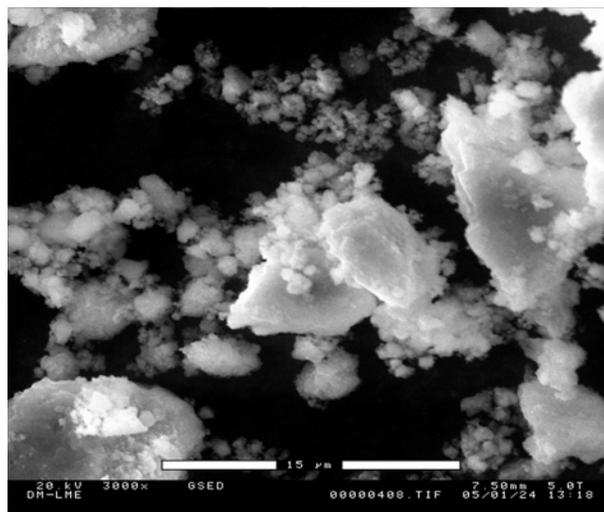
4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL PRODUCTO POR SEM

Con las micrografías obtenidas mediante el SEM, se ve que las hidroxiapatitas son siempre muy aglomeradas. Sin embargo, esta técnica ha permitido de obtener una idea del tamaño de los aglomerados pero no del tamaño de las partículas. Para cada formulación de hidroxiapatita estudiada por SEM, se tomo 2 aumentos diferentes: 6000 y 3000.

4.4.1 Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)



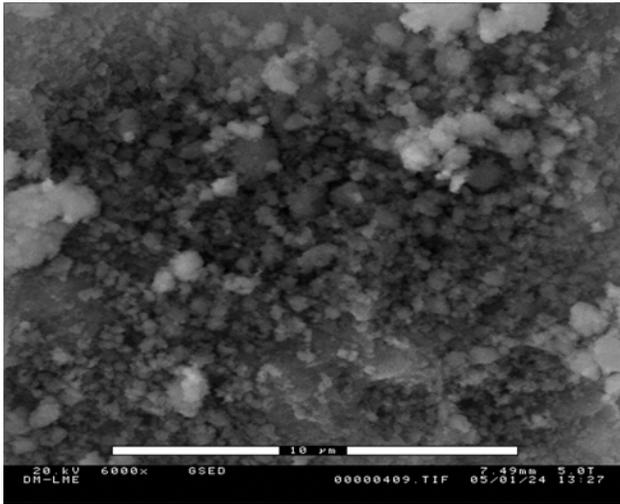
Micrografía 1: CDHA, t=24h (6000x).



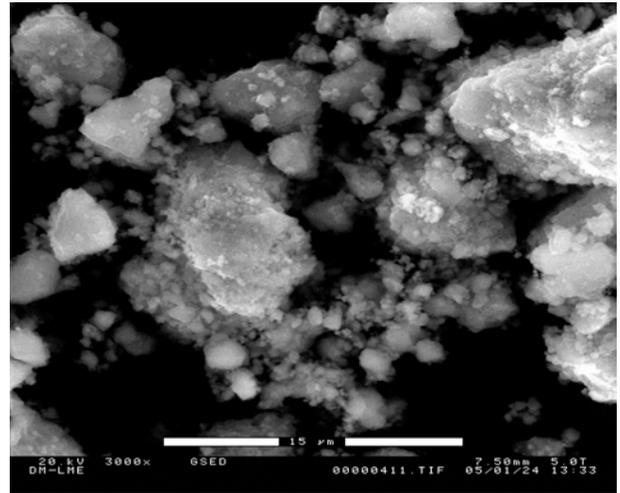
Micrografía 2: CDHA, t=24h (3000x).

Con estas micrografías, se observa que la hidroxiapatita deficiente en calcio (Ca/P)=1,5 después 24 horas de molido se encuentra en forma aglomerados de hasta 30 μ m. Pero la mayoría de estos aglomerados están comprendidos entre 10 y 15 μ m. En ampliaciones de las micrografías ha sido posible detectar los cristales de tamaño nanométrico que forman estos aglomerados.

4.4.2 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio amorfo (Si-CDHA)



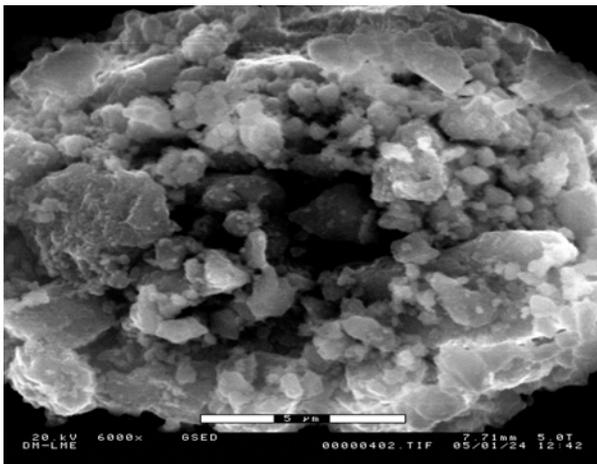
Micrografía 3: Si-CDHA con CSH amorfo, $t=28h$ (6000x).



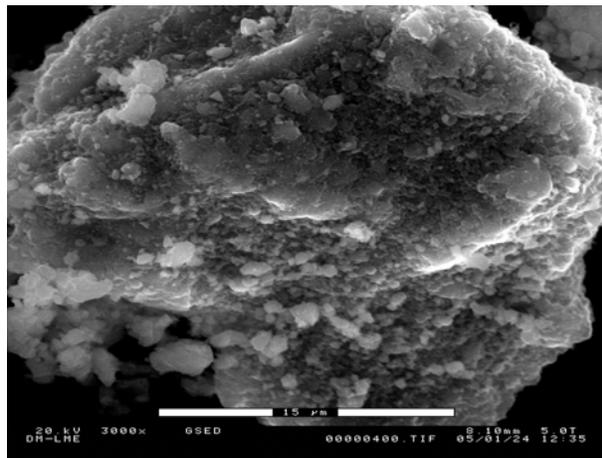
Micrografía 4: Si-CDHA con CSH amorfo, $t=28h$ (3000x).

Estas micrografías muestran aglomerados de Si-CDHAs comprendidos entre 5 y 30 μ m de tamaño. No hay mucha diferencia con las micrografías de la CDHA, lo que quiere decir que la introducción de CSH amorfo en la hidroxiapatita deficiente en calcio no cambia mucho su morfología. Al igual que en el caso anterior, fue posible comprobar la existencia cristales nanométricos formando los aglomerados.

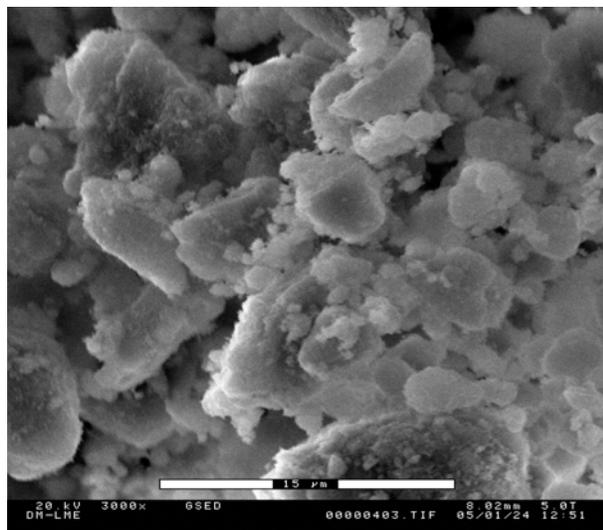
4.4.3 Hidroxiapatita deficiente en calcio substituida con silicio comercial (Si-CDHA)



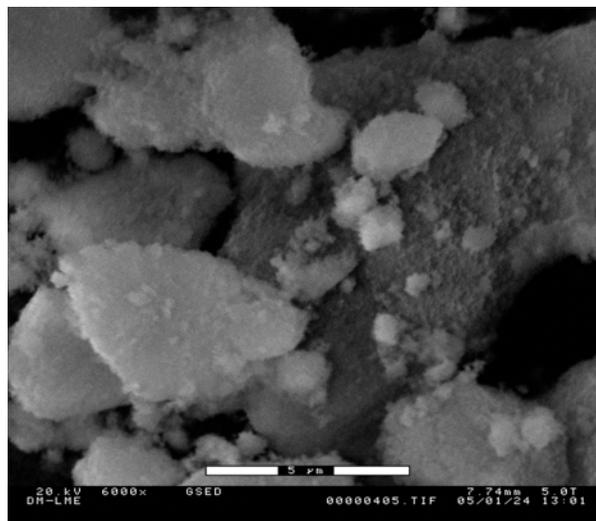
Micrografía 3: Si-CDHA con $CaSiO_3$ comercial, $t=24h$ (6000x).



Micrografía 4: Si-CDHA con $CaSiO_3$ comercial, $t=24h$ (3000x).



Micrografía 5: Si-CDHA con CaSiO₃ comercial, t=40h (3000x).



Micrografía 6: Si-CDHA con CaSiO₃ comercial, t=40h (6000x).

Las 4 micrografías anteriores presentan la misma formulación de hidroxiapatita (Si-CDHA con CaSiO₃ comercial) para 2 tiempos de molido: t = 24h y el tiempo final, t = 40h. A primera vista, parece que el tiempo de molido no influye sobre el tamaño de los aglomerados. Lo que cambia con la CDHA es que los aglomerados son de mayor tamaño, pueden medir hasta 150µm. Esto quiere decir que el silicio esta bien incorporado en la hidroxiapatita. También en este caso fue posible comprobar la existencia de cristales nanométricos. Para poder medir dichos cristales con mayor precisión se haría necesario el estudio de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión.

4.5 GRANULOMETRIA

Los gráficos siguientes muestran la distribución de tamaño medio de las partículas de Silicato de calcio introducidas en las HAs substituidas con silicio:

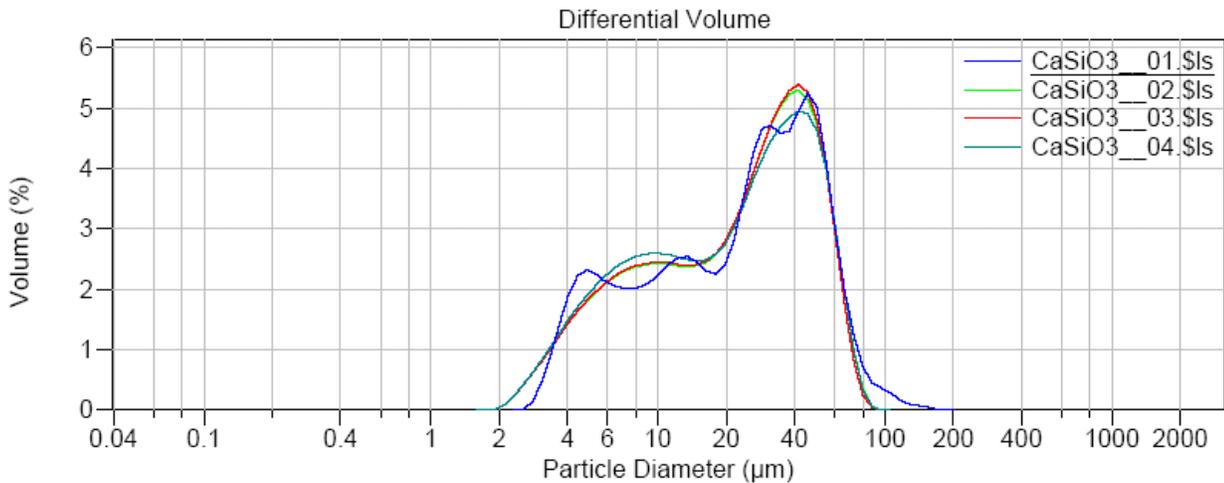


Figura 33: Distribución del tamaño de partículas de CaSiO_3 .

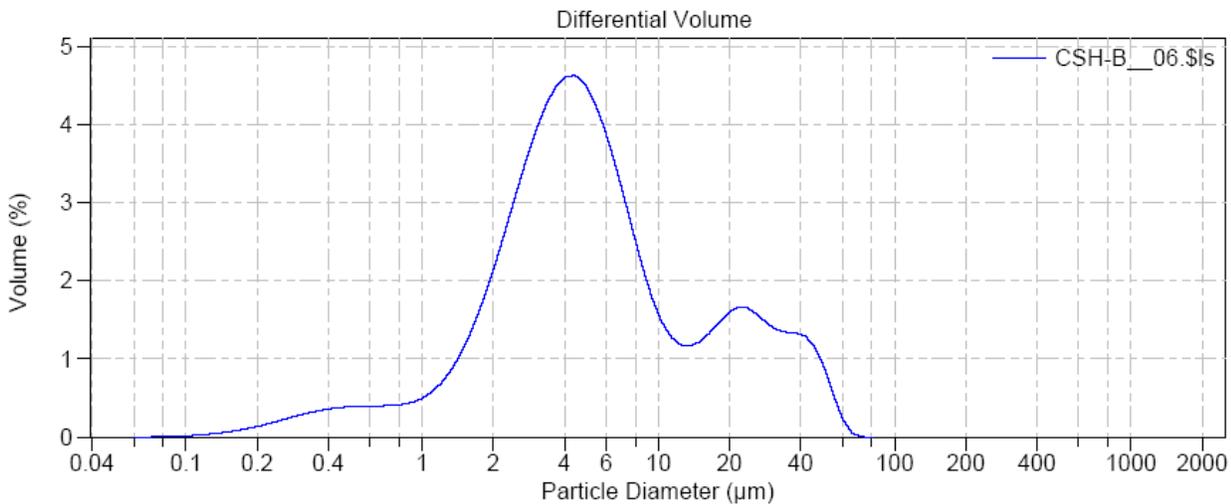


Figura 34: Distribución del tamaño de partícula del CSH amorfo.

Se puede notificar que las distribuciones del tamaño de partícula de las muestras siguen una evolución diferente: la proporción de grandes partículas es mayor que la de pequeñas partículas para el CaSiO_3 comercial al inverso del CSH amorfo. El gráfico (fig. 33) muestra que las partículas de CaSiO_3 tienen un tamaño comprendido entre 2 y 200µm, la mayoría de estas tienen

un tamaño medio de $40\mu\text{m}$. En lo que se refiere a las partículas de CSH amorfo, sus tamaño esta comprendido entre 0 y $80\mu\text{m}$ y la mayoría tienen un diámetro de $4\mu\text{m}$. Entonces las partículas de CaSiO_3 comercial están en medio 10 veces más grandes que las de CSH amorfo, lo que influye sobre la incorporación del silicio en la hidroxiapatita. En efecto, la introducción de CSH amorfo en la CDHA da una dispersión más grande de aglomerados que con la introducción de CaSiO_3 comercial.

4.6 ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN

Este estudio concierne 2 formulaciones de Hidroxiapatita: la CDHA y la Si-CDHA. Para la primera, el porcentaje en masa de precipitado traduce directamente el añadido de Silicio provocado por las bolas durante la reacción:

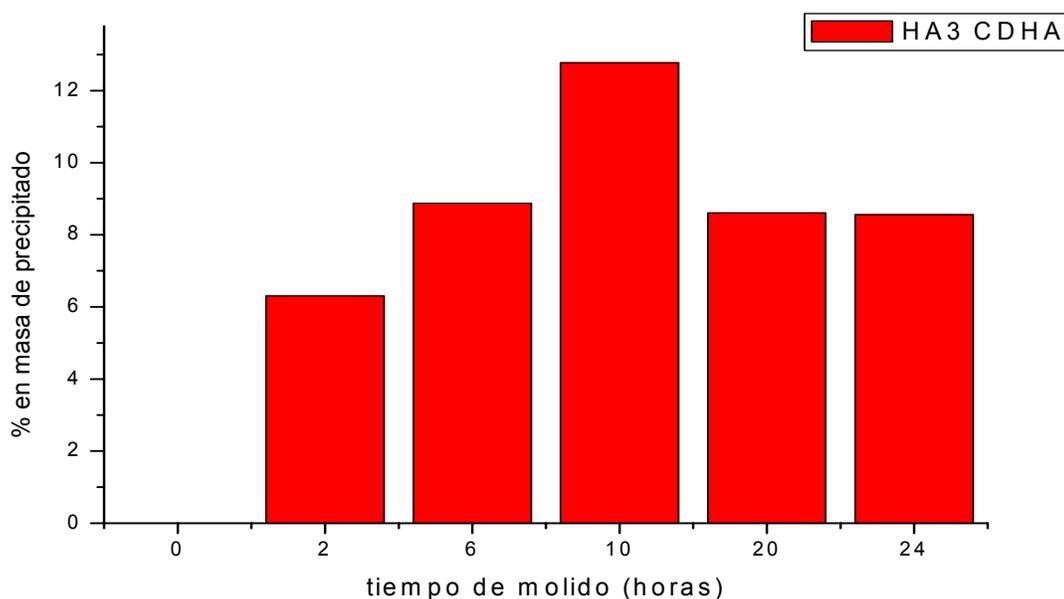


Figura 4: Evolución de la contaminación según el tiempo de molido.

Sabiendo que la muestra de 24 horas ha quedado 2 días en la estufa en vez de 2, se puede decir que la contaminación tiene un máximo al tiempo de molido de 10 horas, pues parece que un parte del silicio se incorpora en la hidroxiapatita.

Al tiempo, $t = 0h$, como lo que esperamos, no hay silicio en el producto pues su contenido aumenta hasta 10h de reaccion y decrece después con el tiempo de molido.

En lo que se refiere a la Si-CDHA, hay que sustraer el porcentaje de silicio contenido al tiempo $t=0h$ para ver la evolución de la contaminación según el tiempo de molido:

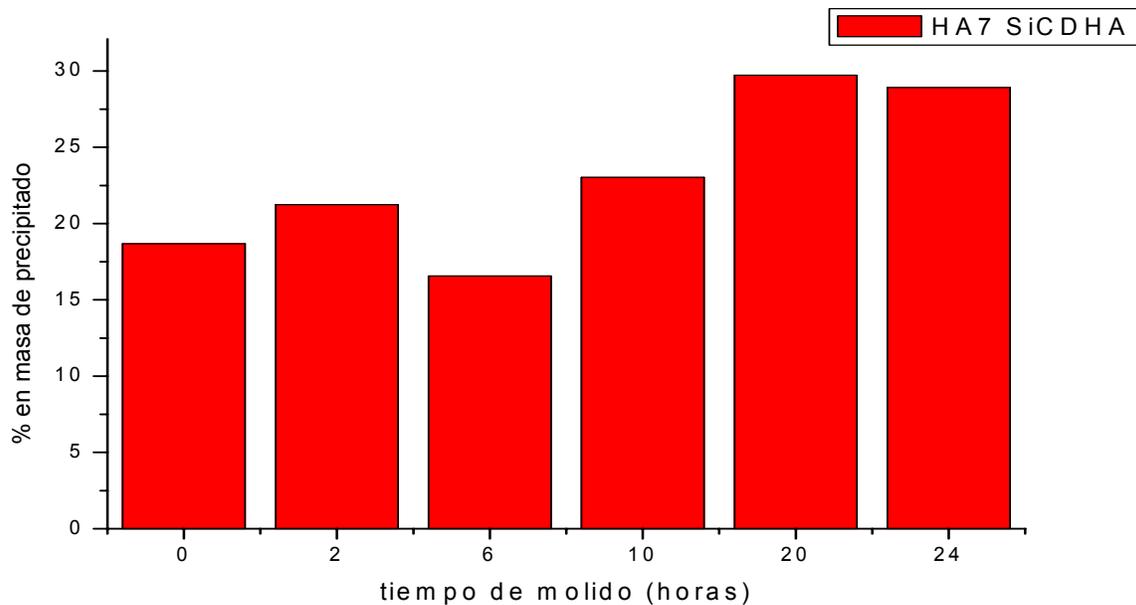


Figura 5: Evolución de la contaminación para la Si-CDHA según el tiempo de molido.

Al tiempo, $t = 0h$, el silicio representa 18,7% de la masa total de los reactivos introducidos. La fig. 5 muestra que el contenido de silicio aumenta hasta 2 horas de molido pues se incorpora en la hidroxiapatita y a partir de 10 horas de reacción, la contaminación del tarro y de las bolas aumenta para alcanzar 10,25% de la muestra final.

Pues hemos pensado hacer este estudio de contaminación tomando como parámetro variable el tiempo de centrifugación y guardando la misma muestra: la del ultimo tiempo.

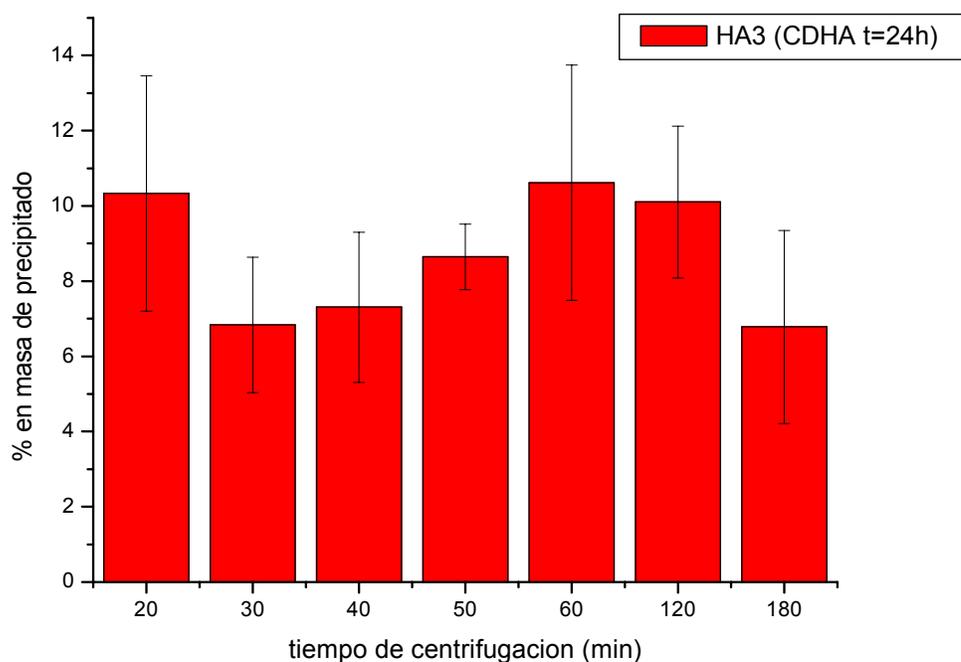


Figura 6: Evolución de la contaminación para la CDHA a $t=24h$ según el tiempo de centrifugación.

El porcentaje de precipitado en la masa total de la muestra varía con el tiempo de centrifugación: para 20 minutos, se encuentra 10,33% de silicio en la muestra final; para 30 minutos se podría sugerir que se ha incorporado 2,5% de silicio pero sale después de la muestra aumentando el tiempo de centrifugación (alcanza su máximo a 60 minutos de centrifugación, 10,61%) y se incorpora de nuevo en la hidroxiapatita después de 180 minutos.

La fig. 7 representa el mismo estudio para la hidroxiapatita substituida con silicio:

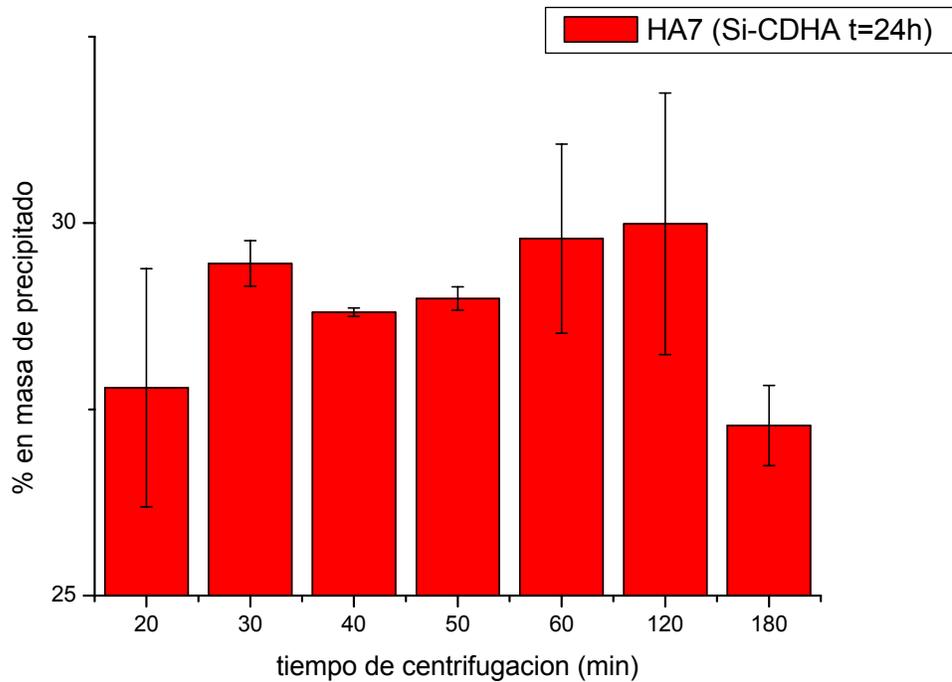


Figura 7: Evolución de la contaminación para la Si-CDHA a $t = 24h$ según el tiempo de centrifugación.

El porcentaje de precipitado en la masa total para el ultimo tiempo de molido de la Si-CDHA sigue casi la misma evolución que la CDHA. Sin embargo, a 20 minutos de centrifugación, la masa de precipitado contenida en la muestra es mas grande que para los tiempos siguientes.

Los estudios de la contaminación realizados nos muestran unas ciertas tendencias que nos permiten hacer algunas hipótesis, pero no pueden tomarse como definitivos ya que sería necesario un estudio estadístico de los mismos. Además, la comparación entre el ágata del molino y el precipitado obtenido se hace necesaria.

CONCLUSIÓN

Durante este proyecto, se ha sintetizado 3 formulaciones diferentes de Hidroxiapatita por mecanosíntesis. Los análisis por difracción de rayos X y por infrarrojos de los productos sintetizados después de 24h de molido para la hidroxiapatita deficiente en calcio y 40h de molido para las hidroxiapatitas con sustituciones de silicio permiten de llegar a estas conclusiones:

- La Hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) con una relación molar Ca/P=1,5, tiene una fase HA y otra β -TCP;
- La Hidroxiapatita deficiente en calcio y sustituida con silicio (Si-CDHA) con una relación molar Ca/P=1,5, muestra únicamente una fase apatítica para los 2 fuentes de silicio introducidos (CSH amorfo y CaSiO₃ comercial) a temperatura ambiente y a 950°C.
- La Hidroxiapatita sustituida con silicio (Si-HA) con una relación molar Ca/P=1,67, muestra además de la fase apatítica un porcentaje de fosfato tricálcico α a una temperatura de 1300°C .

Además, se puede decir que el silicio parece introducirse bien en la estructura apatítica tanto en el caso de la Si-CDHA con CSH amorfo como en el caso de la Si-CDHA con CaSiO₃ comercial y se encuentran también para estas formulaciones iones carbonato (CO₃²⁻) que resultan de la sustitución de iones fosfatos (PO₄³⁻) o (OH)⁻. Por estos factores, se puede esperar una mejora de las propiedades biológicas de la Hidroxiapatita sintetizada.

El estudio de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido ambiental muestra unos aglomerados de cristales nanométrico para todos las formulaciones sintetizadas. El tamaño nanométrico de dichos cristales constituirá una mejora en la bioactividad de estos materiales.

La distribución del tamaño de las partículas de los silicatos de calcio (CSH amorfo y CaSiO₃ comercial) estudiada por granulometría permite de justificar que el diámetro medio de una partícula de CaSiO₃ es 10 veces más grande que la de un CSH amorfo, lo cual probablemente provoca diferencias en el tipo de sustitución de iones silicio y carbonato que se ven reflejadas por las distintas bandas encontradas en los espectros de infrarrojos para el caso de las hidroxiapatitas sintetizadas con cada uno de estos silicatos.

Por fin, el estudio de la contaminación indica que el nivel de silicio contenido en la muestra alcanza su máximo para 20 horas de molido (en los 2 casos: CDHA y Si-CDHA) y que el tiempo de centrifugación hace variar la incorporación del silicio.

En el futuro, se podría seguir este estudio para establecer una estadística sobre la evolución de la contaminación según el tiempo de centrifugación.

Para poder confirmar la mejora de las propiedades biológicas de las hidroxiapatitas sintetizadas se hará necesario en estudios posteriores la realización de ensayos *in vitro* con proteínas y células, así como ensayos *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Maria Pau Ginebra por su amabilidad, confianza y ayuda que me ha prestado durante este proyecto.

Doy las gracias de forma muy especial a Carolina Mochales que siempre estuvo disponible para dirigirme y ayudarme a superar las dificultades, te deseo mucha suerte en tu doctorado.

También agradezco a todos los doctorantes y la gente con la que he compartido el laboratorio del departamento de Biomateriales: Montse, Marta, Melba, Pablo, Alex y Sergio.

Expreso mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a mejorar mi formación y avanzar en el conocimiento.

Por último, un grand merci à mes parents.

BIBLIOGRAFÍA

1. Serraj, S., Boudeville, P., Pauvert, B., and Terol, A. (2001) *Journal of Biomedical Materials Research* **55**, 566-575
2. Suchanek, W. L., Shuk, P., Byrappa, K., Riman, R. E., TenHuisen, K. S., and Janas, V. F. (2002) *Biomaterials* **23**, 699-710
3. Yeong, K. C. B., Wang, J., and Ng, S. C. (2001) *Biomaterials* **22**, 2705-2712
4. Le Brun, P., Froyen, L., and Delaey, L. (1993) *Materials Science and Engineering A* **161**, 75-82
5. Gibson, I. R., Hing, K. A., Revell, P. A., Santos, J. D., Best, S. M., and Bonfield, W. (2002) *Bioceramics* **14**, 203-206
6. Mochales, C., Briak-BenAbdeslam, H., Ginebra, M. P., Terol, A., Planell, J. A., and Boudeville, P. (2004) *Biomaterials* **25**, 1151-1158
7. Mochales, C., Briak-BenAbdeslam, H., Ginebra, M. P., Boudeville, P., and Planell, J. A. (2004) *Bioceramics* **16**, 107-110
8. Mochales, C., Briak-BenAbdeslam, H., Ginebra, M. P., Terol, A., Planell, J. A., and Boudeville, P. (2004) *Biomaterials* **25**, 1151-1158
9. Nurse, R. W., Welch, J. H., and Gutt, W. (1959) *Journal of the Chemical Society* 1077-1083
10. Fix, W., Heymann, H., and Heinke, R. (1969) *Journal of the American Ceramic Society* **52**, 346-&
11. Mochales, C., Briak-BenAbdeslam, H., Ginebra, M. P., Boudeville, P., and Planell, J. A. (2004) *Bioceramics* **16**, 107-110
12. Lafon, J. P., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Gibert, R., and Danna, A. M. (2003) *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **72**, 1127-1134
13. Elliott, J. C. (1994) *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam The Netherlands
14. Boudeville, P., MP Ginebra, Terol, A., Pauvert, B., and Planell, J. A. (2002) *Proceedings of the 17th European Conference on Biomaterials*
15. Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., and Thomas, P. (2002) *Biomaterials* **23**, 1065-1072
16. LeGeros, R. Z. (1991) *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Basel ; London : Karger,
17. Jillavenkatesa, A. and Condrate, R. A. (1998) *Spectroscopy Letters* **31**, 1619-1634

18. Peña, J. and Vallet-Regi, M. (2003) *Journal of the European Ceramic Society* **23**, 1687-1696

19. Leventouri, T., Bunaciu, C. E., and Perdikatsis, V. (2003) *Biomaterials* **24**, 4205-4211

20. Botelho, C. M., Lopes, M. A., Gibson, I. R., Best, S. M., and Santos, J. D. (2002) *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **13**, 1123-1127

21. Boudeville, P., MP Ginebra, Terol, A., Pauvert, B., and Planell, J. A. (2002) *Proceedings of the 17th European Conference on Biomaterials*

22. Gibson, I. R., Best, S. M., and Bonfield, W. (1999) *Journal of Biomedical Materials Research* **44**, 422-428

23. Kim, S. R., Riu, D. H., Lee, Y. J., and Kim, Y. H. (2002) *Bioceramics* **14**, 85-88

ANEXOS

PRESUPUESTO

➤ Coste del material necesario a la obtención de hidroxiapatitas

	PRECIO/UNIDAD	PRECIO TOTAL (euros)
CaO 98% (500g) Aldrich	30,72	30,72
DCPD (1kg) Fluka	66,26	66,26
Molino a bolas FRITSCH (Pulverisette)	4500,00	4500,00
COSTE (euros)		7857,71

➤ Coste de la caracterización de las hidroxiapatitas obtenidas

CONCEPTE	Nº MUESTRAS	Nº HORES	PRECIO POR MUESTRA (euros/muestra)	PRECIO HORA (euros/h)	COSTE (euros)
DRX	46	92		45,23	4161,16
INFRARROJOS	36	12		64,14	769,68
MEB Ambiental	13		90,36		1174,68
CENTRIFUGADORA		10		27,33	273,3
DIFRACCION LASER	2	2		15,37	30,74
COSTE (euros)					6409,56

En el coste de este proyecto, no se tiene en cuenta el precio del material que dispone ya el laboratorio de biomateriales, ni el coste de los productos básicos de un laboratorio (acetona, etanol, agua destilada, etc...)

CONCEPTE	COST (euros)
MATERIAL UTILIZADO	7857,71
EQUIPO UTILIZADO	6409,56
COSTE TOTAL (euros)_{sin IVA}	14267,27

TÉCNICAS DE CARACTERIZACION EMPLEADAS

Difracción de rayos X

La identificación de las fases presentes en la fase sólida del cemento se lleva a cabo mediante estudios de difracción de rayos X en un difractor Siemens modelo D-500. Las condiciones de trabajo son de una diferencia de potencial de 40 kV y una corriente de 30 mA, con un rastreo del tipo θ - 2θ , entre 4 y 60 grados de 2θ .

En el espectro electromagnético, los rayos X se encuentran entre los rayos gamma de longitud de onda menor y la región del ultravioleta de longitud de onda mayor, es decir, entre los 0.1 Å y 100 Å. La difracción de rayos tiene lugar cuando las ondas se dispersan desde un objeto e interfiere destructivamente con otros.

A partir de la representación del átomo de Bohr se puede entender la obtención de los rayos X. Cuando un electrón interno, generalmente del nivel K o L, es expulsado del átomo por otro electrón de energía elevada (rayo X primario), un tercer electrón que se encuentra en un nivel electrónico más externo puede caer en el orbital vacío emitiendo simultáneamente un fotón de rayos X. La energía del rayo X emitido corresponde exactamente a la diferencia de energías entre los dos niveles que intervienen. Por ejemplo, si se expulsa un electrón del nivel K y un electrón del nivel L ocupa su lugar, se obtiene el rayo X K_{α} que tendrá la energía expresada en la siguiente fórmula, donde E_L y E_K , representan las energías de los niveles L y K respectivamente.

Las líneas de la serie K se obtienen cuando se expulsa un electrón del nivel más interno K, las líneas de la serie L se obtienen cuando se expulsa un electrón del nivel L, etc. Los subíndices α , β , γ , etc. se usan para identificar el nivel electrónico original del electrón que ocupa el lugar vacío. Así, una transición desde el nivel energético más cercano se indica con la letra α , la de los siguientes con la letra β , y así sucesivamente.

En la práctica, el espectro de rayos X emitido por un elemento dado puede consistir en una serie de líneas agudas y características tal como se deduce de la discusión precedente o bien puede ser un espectro mucho más complicado formado por un espectro continuo de rayos X que presenta unas líneas espectrales muy agudas superpuestas. El que se obtenga uno u otro depende de si se ha utilizado rayos X primarios o electrones de elevada potencia para bombardear el elemento y expulsar el electrón de un nivel interno.

El espectro continuo se debe sencillamente a la rápida desaceleración de los electrones que bombardean la muestra, debido a las múltiples interacciones que tienen lugar con los electrones de la misma medida que los primero pasan a través del material. La energía perdida se transforma en una radiación continua de rayos X que presenta un mínimo de longitud de onda λ_{\min} (frecuencia máxima) que corresponde a la energía máxima de los electrones. Este límite de longitud de onda límite es inversamente proporcional al voltaje aplicado tal como se ve en la siguiente ecuación:

$$\lambda_{\min} = \frac{hc}{Ve}$$

Donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, e la carga del electrón y V el voltaje de aceleración de aplicado al tubo de rayos X.

En los años 1910 W.L. Bragg fue el primero en demostrar que los procesos de dispersión propios de la difracción pueden ser visualizados como si los rayos X fueron reflexiones de los planos imaginarios definidos por los índices de Millar. Existen dos espectros geométricos a tener en cuenta, el primero es que el haz incidente, la normal al plano de reflexión y el haz difractado son siempre coplanares. El segundo es que el ángulo entre el haz difractado y el haz transmitido es siempre 2θ . Este ángulo se denomina ángulo de difracción y es el que se mide experimentalmente.

La difracción en general tiene lugar sólo cuando la longitud de onda del haz es del mismo orden de magnitud que la distancia interplanar. Este requerimiento se expresa en la ley de Bragg, de forma que el $\sin\theta$ no puede ser mayor que 1.

$$\frac{n\lambda}{2d} = \sin\theta \leq 1$$

Esto significa que $n\lambda$ a de ser menor que $2d$. Para la difracción el valor más pequeño es $n = 1$, ya que $n = 0$ corresponde al haz difractado en la misma dirección que el haz transmitido. Para lo que, la condición de difracción para cualquier ángulo observable cumple $\lambda \leq 2d$.

Infrarrojos

El espectro infrarrojo de absorción, reflexión o de emisión de un mineral es una característica única del mismo. Por eso el espectro puede dar la fórmula estructural sin tener los datos del análisis químico.

Los análisis cualitativas de una sustancia desconocida (por ejemplo, mineral) pueden hacerse

en general sin conocer los detalles de la interacción entre la energía infrarroja y una muestra. Utilizando este método realizan también el análisis semicuantitativo de los minerales y sus mezclas.

La característica de cada espectro es determinada por las vibraciones de los grupos atómicos de la estructura cristalina de los minerales. Existen las relaciones complicadas, por una parte, entre las distancias interatómicas y el ángulo y la fuerza de las masas relativas de los átomos por otra parte. Todas las características de los espectros infrarrojos de los minerales están relacionadas con la constitución (composición química y estructura cristalina) de una sustancia.

En este trabajo damos solo muy breve la discusión teórica sobre el origen y la naturaleza de la radiación infrarroja. En primer lugar y sobre todo quisieramos llamar la atención al uso práctico de la espectrometría infrarroja que es un método muy importante para los mineralogistas y gemologistas.

La espectrometría infrarroja de reflexión completa muy bien la espectrometría de Raman sobre todo para determinar más facilmente la presencia de ciertos cationos y grupos atómicos, que están presentados en muchos minerales y los cuales no siempre pueden destacarse en los espectros de Raman. Este método también es no destructivo y puede utilizarse para determinar la naturaleza de los minerales.

Microscopia electrónica de barrido ambiental

La microscopia electrónica de barrido ambiental es una técnica muy útil para la observación y caracterización de los materiales que no necesita de hacer el vacío; nos da informaciones sobre la microestructura y tiene la posibilidad de realizar análisis químico puntual mediante el espectrómetro de rayos X. Las imágenes tienen una apariencia tridimensional debido a la gran profundidad del foco y a la gran sensibilidad de los electrones secundarios con la topografía del material.

El microscopio electrónico de barrido utiliza como sonda un haz de electrones procedente de un cañón de electrones. Dicho cañón está formado por un filamento de tungsteno que actúa como cátodo montado en un cilindro (Wehnelt) que contiene una pequeña apertura. El ánodo

es una placa plana, conectada a tierra, con una apertura axial a través de la cual pasan los electrones.

Los electrones procedentes del filamento son emitidos termoiónicamente con energías bajas (< 1 eV) antes de ser acelerados por el campo eléctrico del cañón adquiriendo una gran energía cinética. Posteriormente, este haz de electrones es focalizado a través de la columna mediante lentes electromagnéticas hasta llegar a la muestra.

Cuando interacciona un haz de electrones sobre un material se producen una serie de señales que pueden ser de gran utilidad a la hora de caracterizar los materiales. Con la técnica del microscopio electrónico de barrido se estudian los electrones dispersados hacia atrás o reflejados y los electrones secundarios o emitidos. La resolución espacial viene dada por el área de muestra reflectante, y depende del volumen de interacción de la radiación con la muestra.

Los electrones secundarios son los que se reflejan con baja energía (< 50 eV) procediendo de una penetración del orden de sólo varios nm. Estos electrones son reflejados a ángulos grandes y atraídos por el detector para dar las imágenes conocidas como SEI. Las imágenes SEI son topográficas y de alta resolución ya que corresponden a volúmenes de interacción muy pequeños.

Los electrones elásticos o retrodifundidos son electrones de alta energía que pueden proceder de penetraciones superiores a $1 \mu\text{m}$. Dentro de la cámara del microscopio su trayectoria es rectilínea. La cantidad de electrones retrodifundidos que se refleja depende de la composición química de la muestra. Las imágenes producidas por estos electrones se conocen como BEI y son imágenes de baja resolución.

El microscopio electrónico de barrido ambiental forma la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de barrido.

Centrifugación diferencial

Esta técnica se utiliza para el estudio de la contaminación, es un método de separación de los componentes celulares (orgánulos). Se basa en someter a la muestra a giros a alta velocidad, lo que provoca la precipitación de los componentes según su densidad.