

Resumen

La hidroxiapatita es un material que tiene gran importancia en el campo de los biomateriales por su similitud con la fase mineral del hueso. Su uso como sustituto óseo está muy establecido. A pesar del éxito de estos materiales hay propiedades que todavía hoy se desconocen. Este es el caso por ejemplo de la carga superficial de estos materiales. Aunque hay numerosos estudios que miden la carga en coloides, no existen estudios donde se mida la carga sobre superficies macroscópicas de hidroxiapatita. El objetivo pues del proyecto es medir la carga superficial de una serie de sustratos de HA con diferentes microestructuras y porosidades para determinar el efecto de estas características. Para ello se hará uso de una ecuación recientemente desarrollada que permite distinguir la carga externa del material (potencial zeta externo) de la carga en el interior de los poros (potencial zeta interno).

El material de partida son diferentes cementos de hidroxiapatita. Estos cementos se diferencian por su proporción de fase líquida, con respecto a su fase sólida por la granulometría del polvo de la fase sólida y las condiciones de fraguado del material.

Se analizó la composición de los cementos por difracción de rayos X, su microestructura se observó con el microscopio electrónico de barrido y la porosidad se determinó por porosimetría de mercurio con la finalidad de relacionar estas características con los valores de potencial zeta interno y externo de las muestras.

Los resultados mostraron diferentes comportamientos en los potenciales zeta interno y externo según el tipo de muestra.

Se ha visto que tanto la microestructura como la porosidad de los materiales tienen un efecto muy importante en la carga superficial del material. Las morfologías nanométricas presentan potencial zeta externo negativo y potencial zeta interno positivo. Al contrario, las microestructuras con cristales sub-micrométricos tienen potenciales zeta interno y externo negativos. La carga interna de estos últimos cementos tiene tendencia a ser menos negativo con la aumentación del tamaño de sus poros.

Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	3
1 INTRODUCCIÓN	5
Objetivos del proyecto	5
2 ESTADO DEL ARTE	7
2.1 Hueso humano.....	7
2.1.1 Funciones del hueso en el organismo	7
2.1.2 Composición del hueso	8
2.1.3 Estructura del hueso.....	8
2.1.4 Regeneración ósea.....	11
2.2 Biomateriales.....	13
2.2.1 Descripción de un biomaterial.....	13
2.2.2 Características de la hidroxiapatita	15
2.2.3 Cementos de hidroxiapatita	17
2.3 Potencial zeta.....	20
2.3.1 Modelo de la doble capa eléctrica	20
2.3.2 Determinación del potencial zeta en superficies macroscópicas.....	22
3 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	25
3.1 Preparación del cemento de hidroxiapatita	25
3.1.1 Fabricación de la fase sólida	25
3.1.2 Preparación de la fase líquida	26
3.1.3 Preparación del cemento.....	26
3.2 Caracterización de los materiales.....	28
3.2.1 Difracción de rayos X.....	28
3.2.2 Microscopía electrónica de barrido	29
3.2.3 Porosimetría de mercurio	30
3.3 Medida de potencial zeta	31
3.3.1 Preparación del electrolito	31
3.3.2 Preparación de las muestras para el análisis de potencial zeta	31
3.3.3 Desarrollo de una medida.....	32
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Caracterización del material.....	35
4.1.1 Análisis de la pureza de los reactivos	35
4.1.2 Análisis microestructural de los cementos.....	37

4.1.3	Porosidad de los cementos de hidroxiapatita	42
4.2	Preparación de muestra para potencial zeta	44
4.2.1	Efecto del tipo de molde	44
4.2.2	Efecto del prensado del cemento	45
4.2.3	Efecto del lavado del cemento con metanol	46
4.3	Medidas de potencial zeta	47
4.3.1	Efecto de la preparación de muestras en la medida del potencial zeta.....	48
4.3.2	Medidas de potencial zeta de cementos C en función de la relación líquido/polvo.....	50
4.3.3	Medidas de potencial zeta de cementos C autoclavados en función de la relación líquido/polvo	53
4.3.4	Medidas de potencial zeta de cemento con microestructuras diferentes y relación líquido/polvo fijo.....	56
5	CONCLUSIONES	61
6	COSTES Y EVALUACIÓN MEDIOAMBIENTAL	63
6.1	Costes.....	63
6.1.1	Coste total.....	63
6.1.2	Coste de los materiales	63
6.1.3	Coste del equipamiento	64
6.1.4	Coste del personal.....	64
6.2	Evaluación medioambiental y social	64
7	AGRADECIMIENTOS	66
8	REFERENCIAS	67

1 Introducción

La hidroxiapatita es uno de los principales constituyentes de los huesos. Este fosfato de calcio lleva estudiándose en forma de cemento hace más de treinta años como biomaterial por su biocompatibilidad, osteoconductividad y bioactividad.[1][2] Se puede obtener por hidrólisis del fosfato tricácico alfa. La mezcla entre este compuesto en forma de polvo y un acelerante líquido produce una pasta inyectable que endurece con el tiempo formando un cemento de hidroxiapatita deficiente de calcio, poroso y con baja resistencia mecánica. En función de la proporción de volumen de acelerante con respecto al peso de polvo y la granulometría de este polvo, la precipitación del cemento se caracteriza por el crecimiento de una red de cristales entremezclados de morfologías diferentes con más o menos porosidad.

Para que pueda tener aplicación médica, el cemento debe ser aceptado por el cuerpo sin provocar ninguna reacción adversa y debe facilitar una rápida recuperación. La superficie del material en contacto con tejido óseo, desempeña un papel central en la interacción entre estas dos fases. Es pues muy importante entender y controlar esta interacción lo que implica el análisis detallado de esta superficie. La rugosidad, porosidad, la química, la arquitectura y la carga superficial son algunos de los parámetros que hay que conocer para controlar la reacción del material con el organismo.

De entre estas características la carga superficial es una medida crítica ya que está involucrada en uno de los primeros eventos que ocurre al implantar un material: la adsorción de proteínas. La carga superficial controla la atracción o repulsión electrostática dictando qué proteínas se adsorberán. El análisis de la carga superficial se conoce por el análisis del potencial zeta. Esta magnitud es una propiedad de superficie que aparece en la interfaz al sumergir un sólido en un fluido. Aunque el potencial zeta es una medida rutinaria en coloides, hace relativamente pocos años que se comercializaron aparatos para la medida en muestras macroscópica. Además hace solo cuatro años que se desarrollaron la metodología y las ecuaciones para poder medir las superficies de materiales porosos.

Objetivos del proyecto

El principal objetivo de este proyecto, es poner a punto la preparación de muestras y medir la carga superficial de sustratos de hidroxiapatita con diferentes microestructuras y porosidades para determinar la influencia de estas características en la medida.

Para ello se prepararan cementos con diferentes relaciones líquido polvo para generar diferentes porosidades y también se usaran diferentes granulometrías de polvo así como

diferentes tipos de fraguado para alterar la microestructura del material. Este proyecto también incluye la caracterización de los cementos de hidroxiapatita con otras técnicas para determinar la microestructura de la superficie y su porosidad mediante observaciones al microscopio electrónico de barrido y porosimetría de mercurio, y también el análisis de su composición por difracción de rayos X.

2 Estado del arte

2.1 Hueso humano

2.1.1 Funciones del hueso en el organismo

Los huesos desarrollan varios papeles en el organismo: soporte, protección, locomoción, metabolismo mineral, producción de células sanguíneas y reserva de grasas.

- El más evidente de ellos es su papel de soporte. Forman un cuadro rígido sobre el cual se fijan los músculos, ligamentos y tendones del cuerpo.
- Protegen órganos de traumas externos físicos a los que está sometido el organismo a diario. En particular, el cráneo protege el cerebro, las costillas y esternón de la caja torácica a los pulmones y el corazón y las vértebras rodean a la médula espinal.
- El movimiento está creado por la contracción sincronizada de los músculos y tendones que se insertan en los huesos. Sin los huesos que actúan de forma pasiva haciendo de estructura, no es posible el desplazamiento del cuerpo.
- Los tejidos óseos son responsables de la homeostasis mineral del organismo. Almacenan minerales, especialmente calcio y fósforo, necesarios para varias funciones como la contracción muscular. Controlan las concentraciones de estos minerales liberándolos cuando es necesario en la sangre.
- Las células sanguíneas se producen en la médula ósea roja situada en el interior de ciertos huesos. Esta acción llamada hematopoyesis es responsable de la formación de varias células esenciales de la sangre: los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas sanguíneas.
- Como última función, los huesos sirven también de reserva de energía. Es en la médula ósea amarilla que consiste principalmente en adipocitos (células especializadas en almacenar grasas) donde se almacena la energía en forma de grasa. [3]

2.1.2 Composición del hueso

La composición en volumen de los huesos se caracteriza por 43% de material inorgánica, 32% de material orgánica y el 25% restante de agua.

Relativo a su parte inorgánica, los huesos del cuerpo contienen la mayor parte del calcio, del fósforo, del sodio y del magnesio del organismo. Estos iones están asociados formando cristales con estructura idéntica a la hidroxiapatita y se disponen de manera muy específica entre la fase orgánica que está formada mayoritariamente por fibras de colágeno. Esta asociación de la fase inorgánica con la fase orgánica confiere al hueso propiedades excepcionales: rigidez por parte del mineral y elasticidad por parte del colágeno.

El hueso además contiene cuatro tipos de células que son indispensables en el proceso de remodelación ósea: las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos.

Las células osteoprogenitoras son células no especializadas derivadas del mesénquima, el tejido del que derivan todos los tejidos conectivos. A partir de ellas se generan los osteoblastos y osteocitos.

Los osteoblastos son células que forman el tejido óseo pero que han perdido la capacidad de dividirse por mitosis. Segregan colágeno y otros materiales utilizados para la construcción del hueso. Están presentes en zonas donde se requiere nueva formación de hueso, por ejemplo en casos de fracturas. Se convierten en osteocitos cuando quedan embebidos en la matriz ósea.

Los osteocitos constituyen la mayor parte del tejido óseo y como los osteoblastos no pueden dividirse. Su función es mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho.

Por fin, los osteoclastos derivan de monocitos circulantes que se asientan sobre la superficie del hueso y proceden a la destrucción de la matriz ósea, fenómeno de resorción ósea.

2.1.3 Estructura del hueso

2.1.3.1 Diferentes formas de hueso del cuerpo humano

Según sea la forma y función, se distingue cinco tipos de huesos con estructura diferente en el cuerpo humano.

- Los huesos largos se encuentran en los miembros superiores e inferiores (brazo, antebrazo, muslo y piernas). Se distinguen varias partes en estos huesos. La diáfisis es la parte alargada del hueso mientras que las epífisis son sus extremos. Entre las dos se encuentra la metáfisis. En el hueso adulto esta parte es ósea, siendo cartilaginosa en la fase del desarrollo del mismo. Estas partes están rodeadas por una membrana llamada el periostio o el cartílago articular en el caso de las epífisis. El cartílago articular es una fina capa de cartílago hialino que recubre la epífisis donde el hueso se articula con otro hueso. El cartílago reduce la fricción, absorbe choques y vibraciones.

El periostio está compuesto de dos capas. Una capa exterior formada por un tejido conjuntivo denso e irregular que contiene los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios que pasan al hueso. Y una capa llamada osteogénica que contiene células óseas de varios tipos, fibras elásticas y vasos sanguíneos. El periostio es el punto de inserción de ligamentos y tendones además de ser esencial en el crecimiento óseo, su reparación y su nutrición. La cavidad medular es el espacio cilíndrico en la diáfisis que contiene la médula ósea. Está tapizada por el endostio, una membrana que contiene las células osteoprogenitoras.

- Los huesos alargados tienen conformación similar a los huesos largos pero sin cavidad medular (costillas).
- Los huesos cortos tienen forma de cubo. El tejido óseo se dispone de manera similar al de la epífisis de los huesos largos. Su principal función es amortiguar los choques (huesos de las muñecas).
- Los huesos planos son de forma larga y ancha. La función es proteger a los órganos que cubren (omóplato de la espalda, huesos del cráneo, huesos de la pelvis).
- Los huesos irregulares son de forma variada. Poseen distintas funciones según sea la parte del esqueleto en que se sitúan (huesos de la cara, las vértebras y los huesos del oído).

2.1.3.2 Hueso compacto y esponjoso

El hueso es un material poroso que se clasifican en función del tamaño de sus espacios internos en hueso compacto y esponjoso. Como se puede ver en la Figura 1, el tejido compacto constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo. El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos. [4]

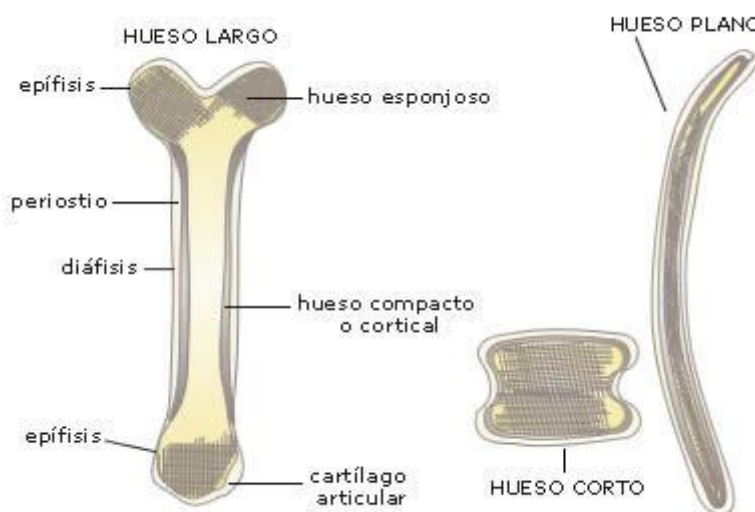


Figura 1: Repartición del hueso esponjoso y compacto en diferentes tipos de hueso del cuerpo humano. [5]

El hueso compacto constituye una protección y un soporte. Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente (Figura 2). Estas unidades estructurales se llaman osteonas. Los canales de Havers están conectados con otros canales llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios o lacunae donde se encuentran los osteocitos. Para que estas células puedan intercambiar nutrientes con el líquido intersticial, cada lacuna dispone de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones de los osteocitos. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. [3]

A diferencia del hueso compacto, el hueso esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas (Figura 2). Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lacunae con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. [3]

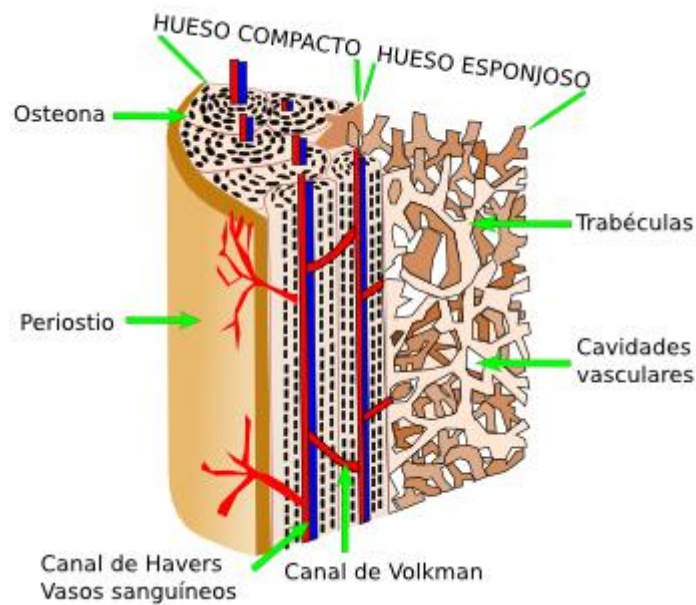


Figura 2: Estructura del hueso.[6]

A una escala más pequeña, las sales minerales tienen su propia organización dentro del hueso. Así, la hidroxiapatita se encuentra en forma de pequeños cristales en forma de placas de 40x25x3 nm ordenados sobre fibras de colágeno. [7]

2.1.4 Regeneración ósea

La reparación de lesiones óseas resulta en tejido óseo idéntico que no se puede distinguir del tejido original, lo que se conoce como regeneración ósea.

La reparación de fracturas óseas ocurre mediante el mecanismo de osificación endocondral. En la osificación endocondral, la formación del hueso ocurre en dos pasos: la diferenciación de células mesenquimales primitivas en condroblastos que depositan una matriz colágena que se osifica mediante la actividad de los osteoblastos. Los condroblastos son precursores del cartílago que se originan directamente de las células mesenquimatosas. Tienen capacidad de dividirse y de sintetizar sustancia fundamental (amorfa y fibrosa) del cartílago. Las cinco etapas de la regeneración ósea son:

- La lesión del tejido blando local y el periostio resulta en la formación de hematoma. Lo que supone una alteración del suministro sanguíneo.
- Este desorden en el suministro sanguíneo impide que lleguen a los osteocitos los nutrientes provocando su muerte. Esta muerte celular resulta en necrosis local del hueso alrededor de la fractura.

- Esta necrosis local inicia un reclutamiento de los macrófagos y fibroblastos para limpiar la zona del tejido muerto y la formación de una matriz extracelular, respectivamente. Además, se reclutan células troncales mesenquimales de la médula ósea y el periostio que a su vez proliferan y diferencian en células osteogénicas. Esta etapa es la fase de inflamación, representada en la Figura 3.

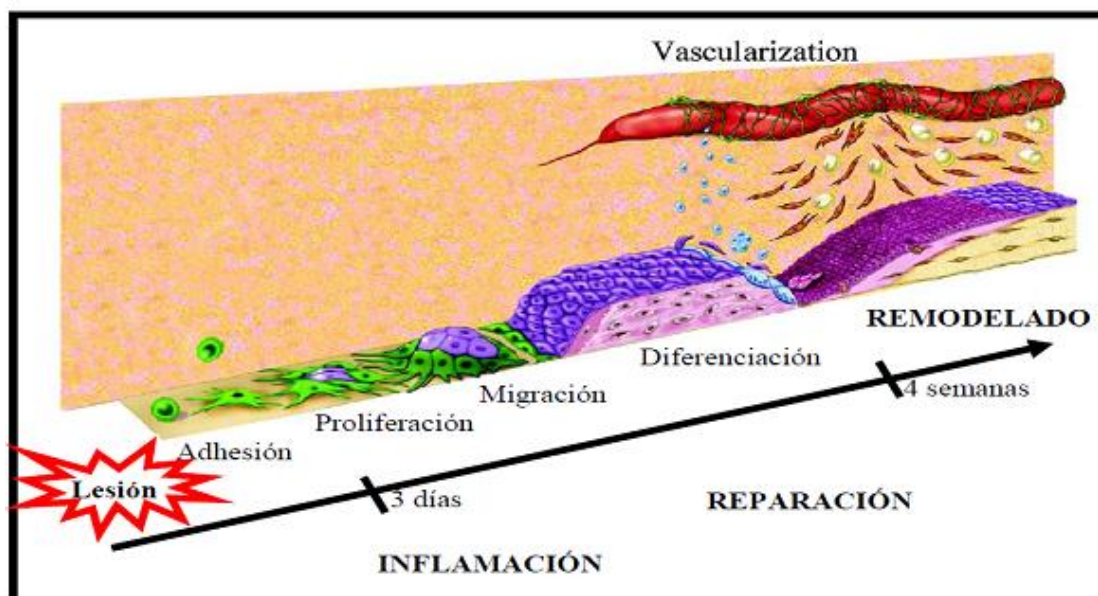


Figura 3: Fases de la regeneración ósea. [8]

- Esto provoca el aumento en espesor del periostio y la producción de los collares externos del callo de fractura. Las células osteoprogenitoras cerca del hueso no dañado tienen un suministro alto de oxígeno y se diferencian en osteoblastos que inducen la formación de hueso. Los osteoprogenitoras que no tienen un suministro de oxígeno adecuado, se diferencian en condroblastos formando cartílago. Simultáneamente, se induce la angiogénesis. Una vez formado el cartílago y estabilizada la fractura, los osteoclastos y células osteoprogenitoras invaden el callo cartilagenoso después de la formación capilar. Así, el cartílago se reemplaza por tejido óseo trabecular neoformado mediante osificación endocondral.
- El hueso trabecular neoformado se remodela en hueso lamelar y el proceso se completa con la formación de médula ósea normal relleno los espacios del hueso esponjoso. La reparación de hueso compacto ocurre mediante el relleno de los espacios entre las trabéculas con capas sucesivas de hueso desarrollando nuevos canales haversianos. [9]

2.2 Biomateriales

2.2.1 Descripción de un biomaterial

2.2.1.1 Definición de un biomaterial

Un biomaterial, es un material no vivo, de naturaleza metálica, cerámica, polimérica o un compuesto, creado para ser usado en contacto con sistemas biológicos con la intención de evaluar, tratar, restablecer, mejorar o reemplazar tejidos, órganos o funciones del cuerpo. [10]

Una propiedad fundamental de los biomateriales es la biocompatibilidad. Un material biocompatible, debe ser capaz de cumplir su función sin inducir efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune.

Una teoría general de los biomateriales expresada en 1982, los caracteriza con tres leyes: deben actuar como el tejido natural, deben presentar un interfaz equivalente al tejido natural y deben responder a estímulos físicos de la misma manera que el tejido reemplazado. [11] En torno a estas leyes, se distinguen tres generaciones de biomateriales caracterizados por objetivos diferentes.

La primera generación de biomateriales, desarrollada desde 1950 buscaba utilizar materiales lo más inertes posibles para provocar una respuesta mínima del organismo. La meta de estos materiales era de presentar propiedades funcionales similares a las del tejido de origen sin provocar respuesta nociva del cuerpo. La mayoría de los materiales que surgieron no fueron desarrollados al principio para un uso médico aun así resultaron de ser biocompatible y bioinerte. Esta generación abarca elastómeros como la silicona, cerámicos como la circonita y alúmina y el carbón pirolítico.

Los materiales de la segunda generación fueron desarrollados para provocar una reacción controlada con los tejidos circundantes con el objetivo de mejorar la fijación del biomaterial con el tejido óseo. Forman parte de este grupo materiales bioactivos como ciertas formulaciones de vidrios y cerámicas como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico.

Esta generación incluye también biomateriales biodegradables/bioreabsorbibles. Estos materiales son capaces de desaparecer de manera natural en el cuerpo sin que esta degradación produzca elementos nocivos.

Finalmente, surgen los biomateriales de tercera generación donde el objetivo es estimular la regeneración de tejido. Son biomateriales combinados con células heredadas de los últimos progresos en ingeniería de los tejidos y medicina regenerativa. Un biomaterial de

tercera generación típico sería un implante poroso y biodegradable con células desarrolladas in vitro en su superficie que una vez en el organismo va evolucionar en un órgano funcional. [12] [13]

2.2.1.2 Características de la superficie de un biomaterial

La superficie de un biomaterial es un aspecto extremadamente esencial ya que representa la interfaz entre el material y el organismo. Esta primera capa del material tiene su propia reactividad, diferente de la del interior del material. Aunque la superficie representa una muy pequeña proporción del material entero, conocer y estudiar sus propiedades es esencial para poder predecir su reactividad con el entorno biológico. Su estudio necesita equipamientos adaptados para poder prever la interacción que va desarrollar con el organismo.

El gran efecto que tiene una “superficie” se pone de manifiesto a los pocos segundos de implantar un biomaterial. Se sabe bien que en cuestión de segundos la superficie del biomaterial queda adsorbida por un sinnúmero de proteínas que se encuentran en la sangre y que solo a continuación tiene lugar la adhesión de células al material. La adhesión celular está estrechamente vinculada al tipo de proteínas que se hayan adsorbido previamente. Así, sobre una superficie polar se adsorben preferencialmente proteínas polares, sobre superficies hidrofóbicas proteínas de la misma naturaleza y sobre una superficie cargada se adsorben proteínas con carga opuesta. La topografía de la superficie influye en el tamaño del área superficial para la absorción: más está rugosa más gran es el área. La composición química de la superficie del sustrato dicta pues el tipo de uniones que van formarse entre el material y las proteínas.

De la misma manera que la composición del material favorece la adsorción de ciertas proteínas también es responsable de la repulsión de otras. Esto se ve muy claro cuando se intentan adsorber proteínas con carga similar a la del material. Las fuerzas eléctricas de repulsión que se crean impiden su fijación. [14]

Además de esta afinidad estrictamente química, la topografía de la superficie también tiene una gran influencia en la adsorción de proteínas. Cuanto más rugosa es una superficie, más elevada es su área superficial lo que resulta en una mayor densidad de proteínas adsorbidas. Se ha visto también que la topografía del material tiene un efecto directo sobre las células siendo posible alinearlas con solo modificando la rugosidad.

2.2.2 Características de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA) es un mineral, formado por átomos de calcio, grupos fosfato e hidroxilos que se combinan de acuerdo con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La HA cristaliza en el sistema hexagonal con valores de red $a=b=9,432 \text{ \AA}$ y $c=6,88 \text{ \AA}$. Se puede describir su red como una columna hexagonal de grupos PO_4^{3-} formando dos túneles paralelos al eje c de 3 \AA de diámetro. Estos túneles desempeñan un papel muy importante en las propiedades de intercambio de iones de la hidroxiapatita y pueden también albergar pequeñas moléculas. [16]

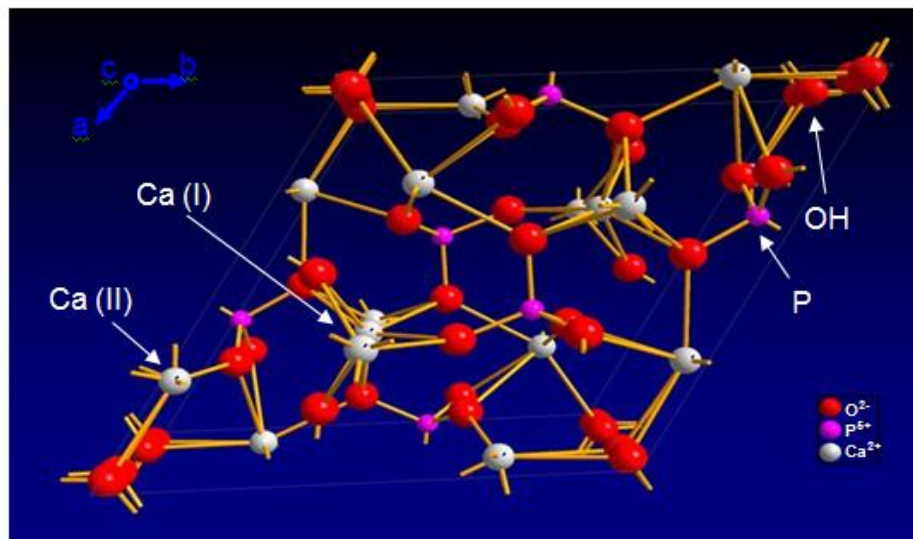


Figura 4: Estructura de la hidroxiapatita. [16]

La estructura de la hidroxiapatita permite la sustitución de Ca , PO_4 y OH por otros iones, tales como fluoruro (F^-), cloruro (Cl^-) y carbonatos (CO_3^{2-}), dando como resultado cambios en sus propiedades, morfología, solubilidad, pero sin tener cambios significativos en su simetría hexagonal. Las apatitas biológicas difieren de la hidroxiapatita pura en estequiometría, composición, cristalinidad, y algunas propiedades físicas y mecánicas. Generalmente, las apatitas biológicas son deficientes en calcio, presentando la sustitución de grupos fosfato por grupos carbonatos.

En la naturaleza las apatitas se pueden encontrar formando parte de las rocas sedimentarias y metamórficas. La apatita biológica en cambio está presente en dientes y huesos confiriéndoles su dureza y rigidez característica. [17]

La hidroxiapatita, presenta varias características entre las cuales destaca su biocompatibilidad, estabilidad química, bioactividad y osteoconducción además de no ser tóxica. Biocompatibilidad y falta de toxicidad son propiedades estrechamente ligadas al

hecho que la HA es un material presente ya en el cuerpo por lo que no genera ningún tipo de rechazo.

El término osteoconducción se se utiliza para describir aquellos materiales que permiten la colonización celular sobre su superficie facilitando la formación de hueso. En el caso de estructuras macroporosas la osteoconducción da lugar a que tejidos capilares y perivasculares junto con las células osteoprogenitoras, se desplacen en los espacios porosos e incorporan a la estructura porosa el nuevo hueso formado. El substrato osteoconductor no es viable, sino que se trata de un andamio pasivo que quía el crecimiento activo del hueso y de tejido fibrovascular. [18]

La porosidad de la hidroxiapatita desempeña un importante papel en su bioactividad. Se distinguen dos tipos de porosidad dentro de la HA relacionados con su capacidad a interactuar con el organismo: la microporosidad y la macroporosidad.

La microporosidad corresponde a los espacios que existen entre los cristales de los cerámicos, los cuales corresponden a un tamaño entre 1-10 μm de diámetro. Estos espacios no pueden ser colonizados por células, únicamente se distribuyen dentro de ellos los fluidos biológicos.

La macroporosidad se traduce en la presencia de poros calibrados en el material, los cuales resultan por la adición de un agente generador de poros durante el proceso. Contrario a los microporos, presentan un diámetro que se extiende entre 100-600 μm , lo cual permite la colonización por las células de los intersticios del material. [15]

La solubilidad, tendencia a la reabsorción y las propiedades mecánicas de la hidroxiapatita dependen por parte de su microestructura, es decir, de la porosidad del material. Una porosidad alta aumenta la solubilidad del material y con ello la actividad biológica. Sin embargo, una porosidad alta deteriora las propiedades mecánicas. Tanto la resistencia a tensión como a compresión y a la fatiga dependen del volumen total de porosidad del material.

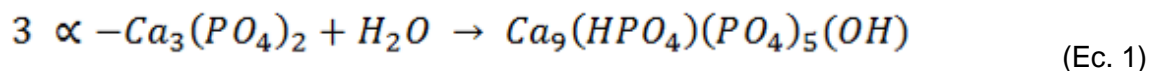
Las propiedades precedentemente evocadas hacen de la hidroxiapatita un biomaterial muy práctico para usos médicos. Tiene la capacidad de desarrollar una fuerte unión con el tejido óseo, razón por la que despiertan un gran interés con fines de utilización clínica en implantes para la sustitución y reparación de este tejido. El mecanismo de unión deriva de una secuencia de reacciones entre el material y el fisiológico, con formación de una capa de material nuevo. Los estudios in vitro e in vivo han puesto de manifiesto que el material bioactivo forma una capa de hidroxiapatita carbonatada en su superficie, al entrar en contacto con suero fisiológico artificial, saliva humana parótida o al ser implantado, uniéndose directamente a través de dicha capa al tejido óseo. Se puede usar como

reemplazo de partes pequeñas de hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos, entre otros. Como la hidroxiapatita sintética tiene baja resistencia mecánica, no se puede usarla sola para reemplazar huesos que soporten cargas. Para una aplicación determinada se requieren diferentes características de la hidroxiapatita, como pueden ser su capacidad de biodegradabilidad o bioactividad. [19] [20] [21]

Existe varios métodos para sintetizar hidroxiapatita: la precipitación a baja temperatura, la sinterización en estado sólido, la mecanosíntesis. Cada de ellos forma un producto con características (pureza, bioactividad, estabilidad térmica,...) un pocas diferentes. [22] Se usa una técnica de baja temperatura porque son las que forman estructuras más similares a la apatita biológica no solo en términos de composición sino también de estructura (cristales nanométricos).

2.2.3 Cementos de hidroxiapatita

Los cementos en general son materiales compuestos por una fase sólida (polvo) y otra líquida que al ser mezcladas resultan en una masa plástica y moldeable que gradualmente endurece y se hace más resistente. Cuando se utiliza fostato tricálcico alfa como fase sólida y agua como fase líquida se obtienen cementos de hidroxiapatita (Ec. 1). Este material añade a las ventajas de los fosfatos cálcicos el hecho que es inyectable lo que permite inyectar el material, por cirugía mínimamente invasiva, rellenando por completo el defecto óseo.



Los cementos de hidroxiapatita se adaptan íntimamente al defecto óseo permitiendo la fabricación de formas y dimensiones difíciles de rellenar con cerámicas convencionales y pueden incluso utilizarse como portadores de sustancias fisiológicamente y farmacéuticamente activas. Además, el fraguado del cemento ofrece una fuerza mecánica suficiente para permitir la recuperación funcional del tejido. Otras ventajas son que permiten la activación de las funciones de los osteoblastos y osteoclastos favoreciendo la sustitución del material por tejido óseo nuevo. La excelente biocompatibilidad de estos cementos permite su uso en un amplio rango de aplicaciones quirúrgicas (aunque siempre para aplicaciones de baja sollicitación mecánica).

Las propiedades de los cementos óseos de hidroxiapatita como son los tiempos de fraguado, la resistencia a la compresión, la porosidad y la velocidad de reabsorción *in vivo*

se ven afectadas por varios factores entre los que destacan la relación líquido/polvo, el tamaño del polvo y el uso de acelerantes en la fase líquida. [23]

2.2.3.1 Evolución microestructural y mecánica durante el fraguado

La microestructura del cemento se desarrolla de la manera siguiente durante el fraguado. El cemento es una solución conteniendo numerosas partículas de α -TCP que actúan como núcleo de cristales. La superficie de los aglomerados de α -TCP en contacto con la fase líquida lleva una reacción de hidrólisis que implica su disolución. Instantáneamente, la α -TCP reprecipita a la superficie de la partícula formando cristales de hidroxiapatita (Figura 5).

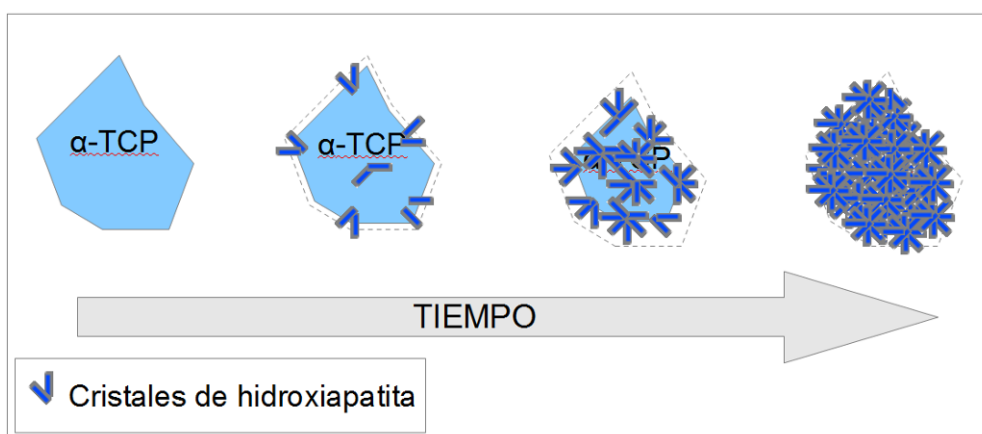


Figura 5: Mecanismo de fraguado de cemento de hidroxiapatita

Es esta disolución progresiva de la α -TCP y la formación simultánea de la red de cristales de hidroxiapatita entremezclados que inicia y determina el endurecimiento del cemento. [24] Este mecanismo de fraguado provoca la formación de un material intrínsecamente muy poroso lo que conlleva propiedades mecánicas pobres.

Los cementos de hidroxiapatita son materiales frágiles. Desde el punto de vista biomecánico, su resistencia mecánica a la compresión es de alrededor de 40 MPa [23] y se considera que la fuerza de tensión es 5-20 veces menor que la fuerza de compresión [25]. Así, estos cementos solo se pueden aplicar en zonas de carga mecánica baja o nula y en combinación con implantes metálicos. En la mayoría de las aplicaciones clínicas, se usan en contacto directo con el hueso esponjoso por lo que la fuerza del cemento debe ser igual a la máxima fuerza del hueso esponjoso que es 10 MPa. Por lo tanto, el requerimiento principal de las propiedades mecánicas de estos cementos es una fuerza de compresión superior o igual a 10 MPa.[9]

Es posible mejorar estas propiedades mecánicas aumentando su densidad o añadiendo fibras reforzantes. Las propiedades mecánicas se mejoran con el crecimiento de tejido óseo y gracias a la formación de colágeno y apatita biológica.

2.2.3.2 El tiempo de fraguado

La gran ventaja de trabajar con cementos es que pueden ser inyectados en la cavidad ósea sin necesidad de llevar a cabo una cirugía invasiva. Para ello es crítico determinar los tiempos de fraguado/endurecimiento del material ya que establecen el tiempo en qué el material debe ser inyectado. Así, sus tiempos de cohesión y endurecimiento debe ser bastante cortos para limitar el tiempo de exposición de la herida al aire y de esta manera disminuir el riesgo de infecciones.

Desde el punto de vista clínico los tiempos de fraguado significan que la pasta de cemento debe ser implantada antes del tiempo de fraguado inicial y que la incisión se puede suturar después del tiempo de fraguado final. Entre estos dos tiempos, la manipulación de la pasta del cemento puede producir grietas en el cemento. Además, el contacto prematuro con un medio acuoso puede provocar la desintegración del cemento. Para ello, se ha introducido el tiempo de cohesión que se define como el tiempo mínimo necesario para obtener una pasta de cemento estable en una solución. Clínicamente, esto significa que la pasta del cemento se implanta después del tiempo de cohesión pero antes del tiempo de fraguado inicial como se puede ver en la Figura 6. [9]



Figura 6: Condiciones para el implantación de un cemento en el organismo. (Adaptado de [1])

Es posible disminuir el tiempo de fraguado de un cemento cambiando varios parámetros:

- Reduciendo el tamaño de las partículas del precursor
- Reduciendo la relación líquido-polvo
- Aumentando la temperatura
- Añadiendo de un nucleante de cristalización o de iones de calcio y/o fosfato

Al contrario, existe inhibidores del crecimiento de los cristales que pueden aumentar el tiempo de fraguado.

2.3 Potencial zeta

El potencial Z es la medida de la carga superficial de un material. Cuando un material se sumerge en una solución, por ejemplo acuosa, se establecen una serie de reacciones que acaban generando una carga neta en la superficie del material. La magnitud y signo de esta carga es muy importante en el estudio de fenómenos superficiales. Las principales reacciones que determinan la carga superficial de los materiales en la interfaz sólido-líquido son:

- Reacciones ácido-base entre los grupos funcionales de la superficie y la solución acuosa.
- La adsorción de protones o grupos hidroxilo provenientes del agua.

Para entender el concepto de potencial Z es necesario introducir el modelo de la doble capa eléctrica.

2.3.1 Modelo de la doble capa eléctrica

La teoría de la doble capa eléctrica se utiliza para visualizar la distribución de iones sobre la superficie de un material cargado. En el caso de una superficie cargada negativamente, la doble capa se genera por atracción de iones positivos, contra-iones, sobre su superficie (Figura 6). En contacto directo con la superficie se forma una primera capa rígida e inmóvil de contra-iones que se denomina la capa de Stern. A continuación, más contra-iones son atraídos por la superficie todavía negativa formando capa móvil y difusa de contra-iones y co-iones. La concentración de los contra-iones disminuye gradualmente al alejarse de la superficie del material hasta que se logra su equilibrio en el seno de la disolución. Al mismo tiempo, la concentración de los co-iones aumenta gradualmente al alejarse de la superficie hasta que se logra su equilibrio en el seno de la disolución. La superficie negativa y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este

tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. [26]

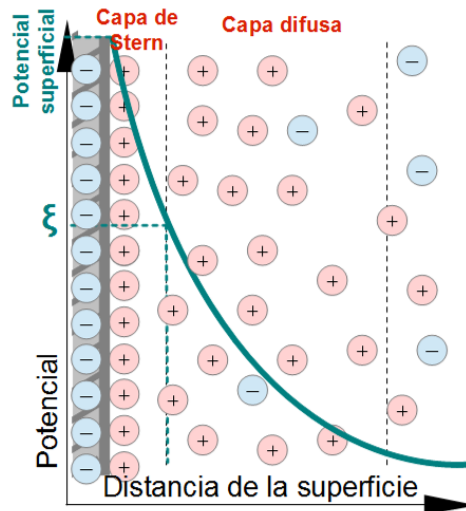


Figura 7: Modelo de la doble capa eléctrica

El potencial Z es el potencial eléctrico que se crea en el plano de cizalla entre la capa Stern y la capa difusa. Este potencial puede ser medido de manera relativamente simple, mientras que la carga real de la superficie y su potencial no pueden medirse.

El potencial zeta depende no solo de las características del sólido sino también de la fase líquida, en especial de su pH. Variando el pH de la solución, es posible encontrar un punto particular donde el potencial zeta es nulo. Este punto se llama punto isoeléctrico y es un parámetro importante tanto para aplicaciones biológicas como en numerosos procesos tecnológicos.

La medida del potencial zeta en coloides representa una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. En el caso de biomateriales el potencial Z permite predecir fenómenos de adsorción y estudiar la biocompatibilidad del material al sumergirlo en una solución acuosa con proteínas y macromoléculas.

Aunque la medida del potencial zeta en coloides está muy establecida y es una medida muy corriente en numerosos laboratorios, este no es el caso para superficies macroscópicas. Hace relativamente pocos años que existen los instrumentos para medir el potencial zeta de superficies macroscópicas. [9] [27]

El potencial zeta es tanto influido por características del sólido que de la fase líquida. Está afectando por la conductancia, porosidad del material y principalmente por el pH. Variando el pH de la solución, es posible encontrar un punto particular donde, por un pH preciso, el

potencial zeta es nulo. Este punto se llama punto isoelectrico y es un parámetro importante para aplicaciones biológicas y procesos técnicos. Así, el potencial zeta se revela útil para prever la biocompatibilidad de un material sumergiéndolo en una solución acuosa con proteínas y macromoléculas. [28]

2.3.2 Determinación del potencial zeta en superficies macroscópicas

La Figura 8 muestra cómo se mide el potencial zeta de superficies macroscópicas. Básicamente la medida consiste en hacer pasar un flujo sobre la superficie de dos muestras separadas una distancia H de manera que provoque el desplazamiento de los iones de la capa difusa respecto a los de la capa Stern. Esta separación induce una respuesta eléctrica que puede ser medida como voltaje o corriente.

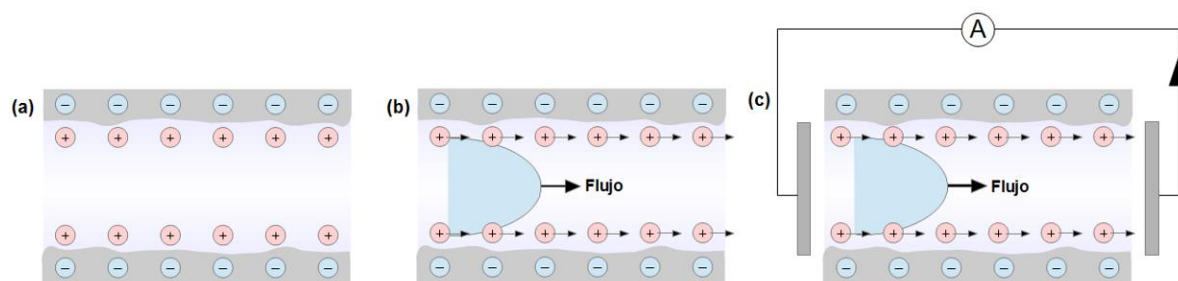


Figura 8: Esquema de la formación del potencial de flujo y del corriente de flujo: equilibrio de las cargas al interface sólido-líquido (a), el flujo provoca el movimiento de los contra-iones (b) y medida de potencial de flujo con un corriente débil (c). [28]

Hermann von Helmholtz y Marjam von Smoluchowski fueron quienes derivaron las ecuaciones que relacionan la medida de voltaje y corriente con el potencial zeta (Tabla 1). Las ecuaciones son ciertas siempre que las muestras sean densas (sin porosidad). Desafortunadamente en muchos casos las muestras tienen una porosidad abierta que debe contemplarse en la medida. El gran problema que plantea la medición del potencial zeta de muestras porosas es el hecho que parte del flujo que se fuerza entre las superficies de las dos muestras puede también viajar por dentro de la muestra a través de la porosidad generando una corriente parásita interna que se suma al corriente externo (superficie de la muestra) falseando el resultado (Figura 9).

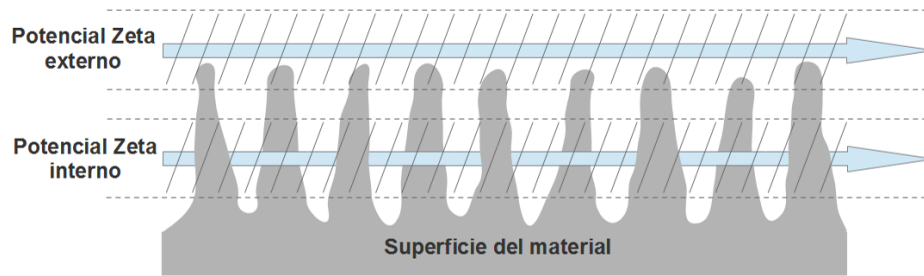


Figura 9: Representación del potencial zeta interno y externo a la superficie de un material poroso.

En 2010, Andriy Yaroshchuk y Thomas Luxbacher publicaron un trabajo [29] en el que demostraron que es posible separar la contribución de la corriente interna de la externa en la medida del potencial zeta de muestras porosas. Además, demostraron que para muestras porosas la contribución de la corriente interna da lugar a un potencial zeta interno que puede ser muy diferente al potencial zeta externo (superficie del material). En el trabajo publicado mostraron que para filtros de celulosa de diferente tamaño de poro se obtenían potenciales diferentes. Este estudio pone de manifiesto la relevancia de la porosidad en los materiales y demuestra que modificando el tamaño de poro permite controlar el potencial zeta del material. Este aspecto puede ser muy relevante en el caso de materiales porosos como lo son muchos biomateriales.

Para un material no poroso al contrario de las muestras porosas, existe únicamente el potencial zeta cerca de la superficie. Para materiales porosos, existe un flujo de fluido externo pasando en la superficie de la muestra y un flujo interno pasando por los poros abiertos del material, las ecuaciones tienen que estar modificadas en consecuencia. Se obtiene el potencial de flujo en función de dos potenciales zeta: el potencial interno, dentro de los poros, y el potencial externo, en el canal (Tabla 1).

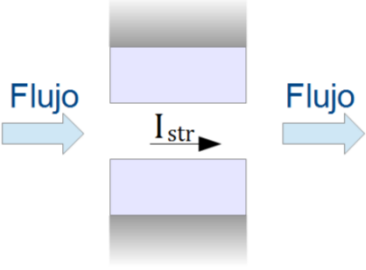
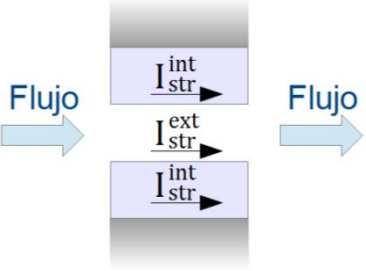
<p style="text-align: center;"><u>Muestras sin porosidad</u></p>  $\zeta(I_{str}) = \frac{dI_{str}}{d\Delta p} \frac{\eta}{\epsilon \cdot \epsilon_0} \frac{L}{A}$	<p><u>Leyenda:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ϵ_0 permitividad en el vacío ϵ constante dieléctrica η viscosidad ζ potencial zeta I_{str} corriente de flujo Δp diferencia de presión A área del capilar (W x H) W anchura del capilar L longitud del capilar H espesor del capilar H_p espesor de penetración del flujo en las muestras y porosidad
<p style="text-align: center;"><u>Muestras porosas</u></p>  $\frac{dI_{str}}{d\Delta p} = \frac{dI_{str,ext}}{d\Delta p} + \frac{dI_{str,int}}{d\Delta p}$ $\frac{dI_{str}}{d\Delta p} = \frac{\epsilon \cdot \epsilon_0 W}{\eta L} (H \cdot \zeta_{ext} + 2H_p \cdot \gamma \cdot \zeta_{int})$	

Tabla 1: Ecuaciones de Helmholtz-Smoluchowski para materiales no-porosos y porosos (Adaptado de [31])

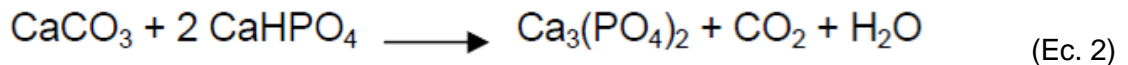
Para muestras porosas, medir el potencial de flujo para varias valores H, espesor del canal, permite conocer a través de una regresión lineal el potencial zeta externo con el pendiente de la recta y el potencial zeta interno, supone igual al potencial zeta para un canal con un espesor nulo, con la intersección.

3 Materiales y métodos experimentales

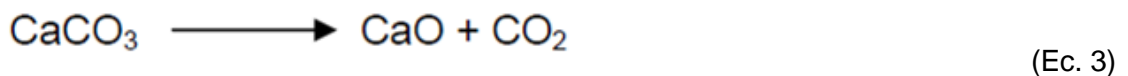
3.1 Preparación del cemento de hidroxiapatita

3.1.1 Fabricación de la fase sólida

El fosfato tricálcico alfa (α -TCP), que es la fase sólida del cemento, se obtiene a partir de 131,59g de CaHPO_4 (Sigma ref.n°C7263) y 48,40g de CaCO_3 (Sigma ref.n°C4830). Se mezclan con un agitador de hélice, WhipMix, en proporción estequiométrica, Ec. 2, y se someten al tratamiento térmico (horno Hobersal CNR-58) especificado en la Figura 10.



El tratamiento térmico se compone de varias fases tal y como se muestra en la Figura 10. El primer escalón térmico elimina la humedad de la mezcla. La segunda etapa corresponde a la descomposición del CaCO_3 , Ec. 3.



En la última etapa a 1400°C ocurre la transformación anisotrópica de la fase β a la fase α . Una vez terminado el tratamiento térmico, el α -TCP se temple al aire para evitar que transforme a fase β .

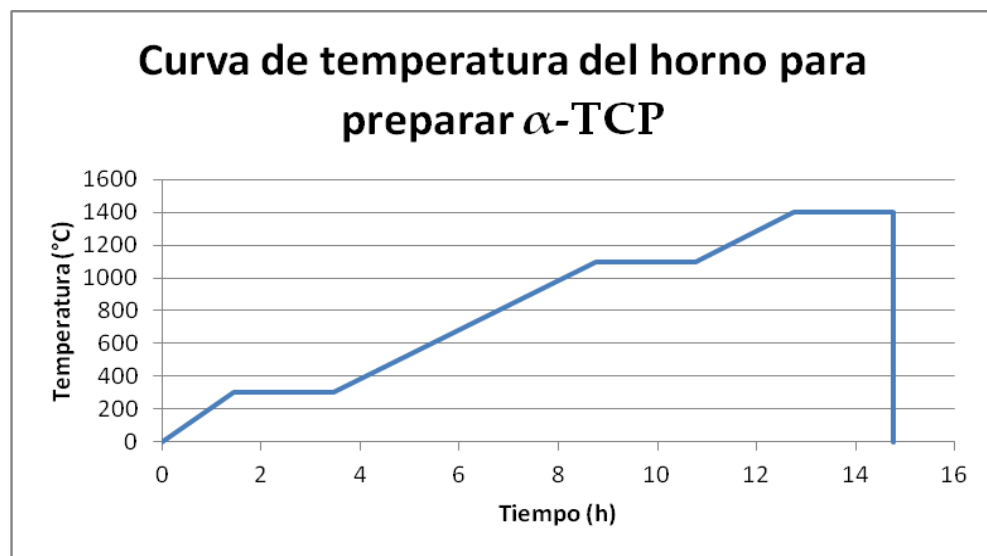


Figura 10: Tratamiento térmico usado en la preparación del α -TCP

Se procede a continuación a molienda del α -TCP en un molino en ágata y con bolas en el mismo mineral en el mezclador planetario (Fritsch Pulverisette 6). Se prepararon dos tipos de polvo (F-fine y C-coarse) de diferente tamaño aplicando diferentes protocolos de molienda. El polvo más fino (F), necesita varias etapas de molienda. La primera etapa consiste en moler el α -TCP con 10 bolas (diámetro 30mm) durante 60 minutos a una velocidad de 450 rpm seguido por una molienda de 40 minutos a una velocidad de 500 rpm. A continuación, se usaron 100 pequeñas bolas (diámetro 5mm) para moler el polvo a una velocidad de 500 rpm durante 60 minutos para al final obtener partículas con un diámetro alrededor de 2,8 μm .

En el caso de la preparación del polvo más grueso de 5,2 μm de diámetro (C), se necesita solamente una etapa de molienda: se muelen los trozos de α -TCP con las bolas grandes durante 15 minutos a una velocidad de 450 rpm.

Al α -TCP resultante se le añade un 2% en masa de hidroxiapatita precipitada (Panreac 1.02143.1000) que actúa como semilla facilitando la nucleación de los cristales del cemento. Ambos componentes se homogeneizan usando un agitador de hélice, WhipMix a 1425 rpm durante 15min.

3.1.2 Preparación de la fase líquida

La fase líquida es una solución acuosa al 2,5% en masa de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211). Su papel es acelerar el endurecimiento del cemento y reducir su tiempo de fraguado.

3.1.3 Preparación del cemento

El cemento se forma mezclando las fases sólida y líquida preparadas anteriormente. Ambas fases se mezclaron en diferentes proporciones para obtener cementos con las siguientes relaciones líquido/polvo: 0,35 mL.g^{-1} , 0,45 mL.g^{-1} , 0,55 mL.g^{-1} , y 0,65 mL.g^{-1} .

Una vez la dos fases entran contacto, se homogeneiza usando el mezclador planetario (SpeedMixer) durante 30 segundos a una velocidad de 2500 rpm e inmediatamente después la mezcla se moldea. Se utilizaron dos tipos de moldes diferentes (Figura 11):

- moldes de teflón
- moldes de látex

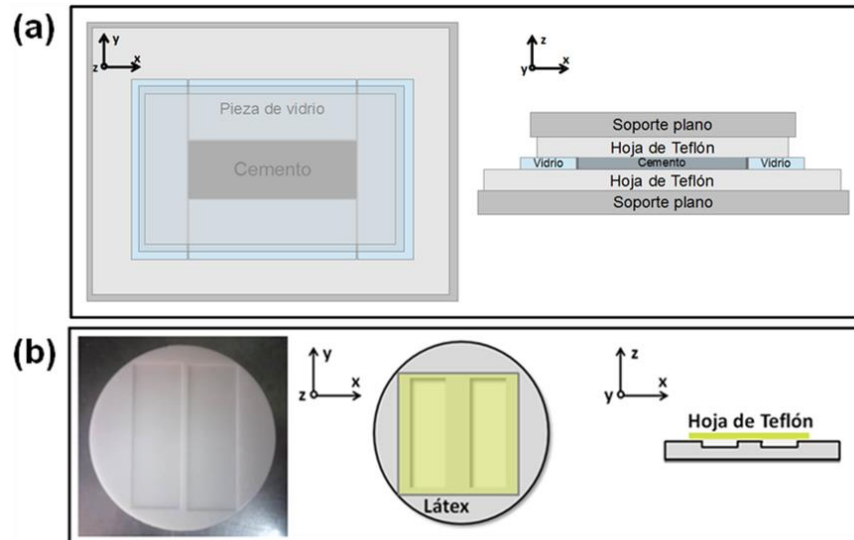


Figura 11: Esquema del molde de Teflón (a) y foto y esquema del molde de Látex (b)

Dado que para la medida del potencial zeta se requieren piezas plano paralelas, la pasta de cemento a moldear debe comprimirse entre piezas de teflón (o látex) para asegurar su planaridad. Para mantener el grosor de las muestras constante se usaron láminas de vidrio como tope. La Figura 11 muestra un esquema de las piezas que se usaron como moldes así como el proceso de moldeado de un cemento. La dimensión típica que resulta de moldear 2 ml de fase líquida con el polvo correspondiente resulta en piezas de alrededor de 40 x 80 x 1 mm³.

Una vez el cemento se ha moldeado, se deja fraguando a 37°C en una atmosfera húmeda el tiempo necesario hasta que la mezcla adquiere suficiente resistencia mecánica (entre 30 min y 2h en función de la relación L/P) y a continuación se sumerge en agua y se prosigue su fraguado en dos condiciones diferentes:

- a 37°C durante al menos 4 días (proceso convencional de fraguado).
- en el autoclave (Selecta presoclave-II o Selecta Sterimax) durante 30 min a 120°C y a 1bar de presión (proceso acelerado de fraguado)

El molde usual se compone de dos hojas de Teflón como límites superior e inferior separadas por al menos dos láminas de vidrio como paredes laterales. El todo forma un espacio libre de alrededor de 40 x 80 x 1 mm.

Una vez que esta mezcla tiene bastante resistencia mecánica para conservar la forma del molde, después de entre 30 min y 2h en función de la relación L/P en atmosfera saturada de humedad, está sumergida en agua pura durante al menos 4 días.

3.2 Caracterización de los materiales

3.2.1 Difracción de rayos X

3.2.1.1 Principios de la difracción de rayos X

El fenómeno de la difracción de Rayos X consiste básicamente en un proceso de interferencias constructivas de ondas de rayos X que se produce en determinadas direcciones de espacio. Significa que las ondas tienen que estar en fase, lo que ocurre cuando su diferencia de trayectoria es cero o un múltiplo entero de longitudes de onda (ley de Bragg).

Los rayos X son difractados por los electrones que rodean los átomos por ser su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico. El haz de rayos X emergente tras esta interacción contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Así, la difracción de rayos X nos da informaciones únicamente para sólido cristalinos y no amorfos.

El descubrimiento del fenómeno de la difracción en este tipo de muestras se convierte rápidamente en una técnica experimental de extendido uso, debido básicamente al amplio campo de aplicación que podemos encontrar para el estudio de sustancias cristalinas. Hoy día esta técnica constituye una herramienta habitual de trabajo con una extraordinaria utilidad en muy distintas disciplinas científicas y tecnológicas, por el carácter polifacético en lo que se refiere a la gran variedad de información que proporciona.

La identificación de fases cristalinas constituye uno de los campos de aplicación más importantes del método de polvo cristalino.

3.2.1.2 Preparación de muestras para análisis de DRX y parámetros

El análisis de difracción de rayos X se realiza con muestras pulverizadas en un mortero en ágata o directamente con el polvo de α -TCP, antes de añadirle la semilla.

Para el análisis, los parámetros del instrumento (Philips MRD difractometer) que se seleccionaron fueron: potencia de 40kV, intensidad de 40 mA, rango espectral entre 10 y 80° con un incremento de 0,02° y 150 s/etapa.

3.2.2 Microscopía electrónica de barrido

3.2.2.1 Principios de la observación con microscopio electrónico de barrido

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope) usa electrones para observar detalles demasiado pequeños para ser vistos con luz cuya longitud de onda es demasiado elevada. Para obtener una imagen, el haz de electrones se hace incidir sobre la muestra y los electrones (secundarios) se recogen por un detector. Esta técnica tiene una precisión entre 3 y 20 nm y necesita que las muestras sean sólidas y tengan una superficie conductora. Para observar muestras no conductoras, se las recubre con una capa delgada de oro o carbón.

Para funcionar, el SEM (JEOL JSM-6400) acelera los electrones en un campo eléctrico mediante una diferencia de potencial de 1000 a 30000 voltios. Más el voltaje es elevado, mejor será la precisión pero con el riesgo de dañar a las muestras sensibles, es por eso que se observa los materiales biológicos generalmente con un voltaje pequeño. Las imágenes obtenidas en blanco y negro permiten apreciar la textura de materiales inorgánicos y orgánicos. [32]

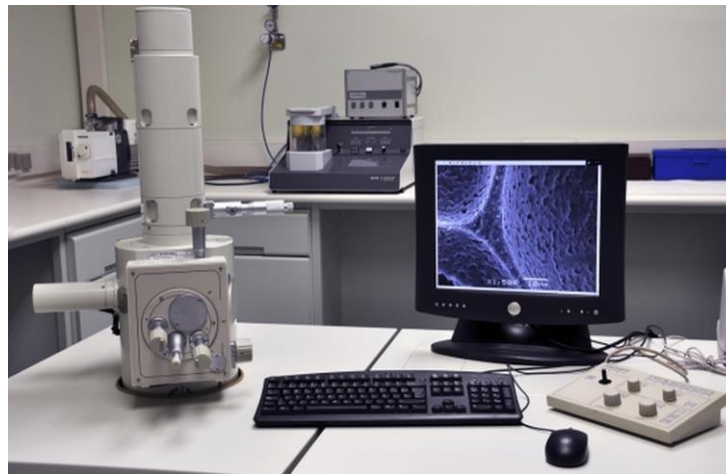


Ilustración 1: uno de los microscopios electrónicos de barrido del UPC [33]

3.2.2.2 Preparación de muestras para observación al SEM

Las muestras observadas al SEM son pequeños trozos de cementos antes o después de medirse su potencial zeta.

Para empezar, los trozos de cemento a examinar se pegan en porta-muestras metálicos apropiados utilizando adhesivo de carbono de doble cara. Para crear una conexión eléctrica entre la superficie de la muestras y el porta-muestras, se usa plata coloidal (TED PELLA,

INC 16031). Como los cementos de hidroxapatita no son conductores, se deposita en su superficie una fina capa de oro o de carbón.

3.2.3 Porosimetría de mercurio

3.2.3.1 Principios de la porosimetría de mercurio

La porosimetría por inyección de Hg es una técnica indirecta para la caracterización del sistema poroso de los materiales, obteniéndose fundamentalmente a partir de ella la distribución de la porosidad en función del tamaño de acceso a los poros.

Se basa en los fenómenos de capilaridad generados por los líquidos que no mojan los sólidos con los que están en contacto. Así, un líquido como el mercurio que no penetra espontáneamente en los conductos capilares, precisa una presión para su introducción que es inversamente proporcional al radio de los capilares.

El ensayo porosimétrico consiste en inyectar mercurio a presión y registrar el volumen de mercurio absorbido. Para cada intervalo de presión considerado, el volumen de mercurio absorbido nos indica el volumen de poros de la muestra que tienen un determinado intervalo de tamaño de acceso.

Es una técnica simple y rápida pero se debe tener en cuenta que mide solo el volumen de poros abiertos, accesibles al mercurio. Además, es un ensayo irreversible ya que una fracción del mercurio puede quedar atrapada en la muestra. [34]

3.2.3.2 Preparación de muestras para porosimetría

Las muestras para porosimetría se preparan en moldes cilíndricos de Teflón de 5 mm de diámetro y 10 mm de altura cerrados a las dos extremidades por hojas de Teflón. El cemento endurece dentro de estos moldes y una vez completada la reacción, se extraer para proceder a su análisis.

Para medir la porosidad de cementos autoclavados, se usa muestras preparadas sin molde, se deja el cemento endurecerse en una hoja de teflón sin moldearlo.

Después para secar las muestras se usa una estufa (Heraeus) a 120°C.

3.3 Medida de potencial zeta

3.3.1 Preparación del electrolito

El electrolito usado es una solución acuosa de cloro de potasio con una concentración de 1 mmol/L. Se prepara diluyendo una solución de KCl con una concentración 1M en 1L de agua milliQ. Esta primera solución de KCl se obtiene a partir de cloruro de potasio sólido (Sigma P5405). Para las medidas de potencial Z se utilizan 500 ml de electrolito.

El electrolito tiene un pH de alrededor de 6 y una conductividad de 160 μ S a temperatura ambiente.

Se prepara electrolito nuevo cada día. Éste se utiliza tanto para las medidas como para conservar los cementos ya pegados al porta-muestras del potencial zeta. No se dejan más de 24h. Para conservar las muestras sumergidas durante un tiempo más largo, se usa agua milliQ.

3.3.2 Preparación de las muestras para el análisis de potencial zeta

La primera etapa en la preparación de las muestras es pegar con superglue el cemento fraguado a los soportes de potencial zeta con dimensiones de 10 x 20 mm². Después, se cortan las partes de cemento que sobrepasan las dimensiones de las piezas con un cutter. Este proceso se realiza de dos maneras diferentes:

- El cemento antes de pegarlo se deja secar al aire
- El cemento se pega al soporte manteniendo la cara a medir en agua para evitar que se introduzcan burbujas de aire que puedan afectar la medida.

En el caso de haber secado los cementos, a la hora de pegarlos hay que asegurarse que todo el material quede bien mojado para realizar medidas correctas. Esto implica que es necesario que no haya aire dentro de los poros del material. Para ello, se sumergen las muestras en una secuencia de soluciones metanol/agua con diferentes concentraciones. Se usa metanol por su gran capacidad en disolver el aire. Se empieza sumergiendo dos veces las muestras durante 15 min en metanol puro. A continuación se sumergen durante 15 minutos en mezclas con contenido en metanol del 80 v/v%, 60 v/v%, 40 v/v% y 20 v/v% de metanol en agua milliQ donde se dejan al menos 30 min antes de sumergirlas en el electrolito (Figura 12).



Figura 12: Preparación de las muestras para análisis de potencial zeta

Las soluciones de metanol se preparan mezclando metanol puro (Panreac 481091-1611) y agua milliQ en diferentes proporciones. Las mezclas no se conservan más allá de 2 meses.

3.3.3 Desarrollo de una medida

Para medir el potencial de flujo y deducir el potencial zeta es necesario generar una doble capa eléctrica estable sobre la superficie del sólido. Aunque esta doble capa aparece instantáneamente una vez la muestra se sumerge, se necesita tiempo para lograr un equilibrio en la interfase sólido-líquido. Instrumentalmente, este potencial se mide entre dos electrodos situados en los extremos de las muestras estudiadas.

Por causa de la grande influencia del pH sobre el potencial zeta, es importante anotar su valor para cada medida. Asimismo es también importante controlar la fuerza iónica del medio y para ello se recomienda utilizar una solución de KCl de concentración 1 mmol.L⁻¹.

3.3.3.1 Manipulación

Para medir el potencial zeta de las muestras, se usa el instrumento SurPASS de la casa Anton Paar conectado con un ordenador. Esta máquina permite medir el potencial o la corriente que se genera al forzar un flujo sobre la superficie del material. Se compone de un sistema de bombas y jeringas que permite introducir de manera controlada el electrolito entre las muestras. Las muestras se colocan en una celda denominada "adjustable gap-cell" que permite ajustar la distancia entre la superficie de las dos piezas (Figura 13).

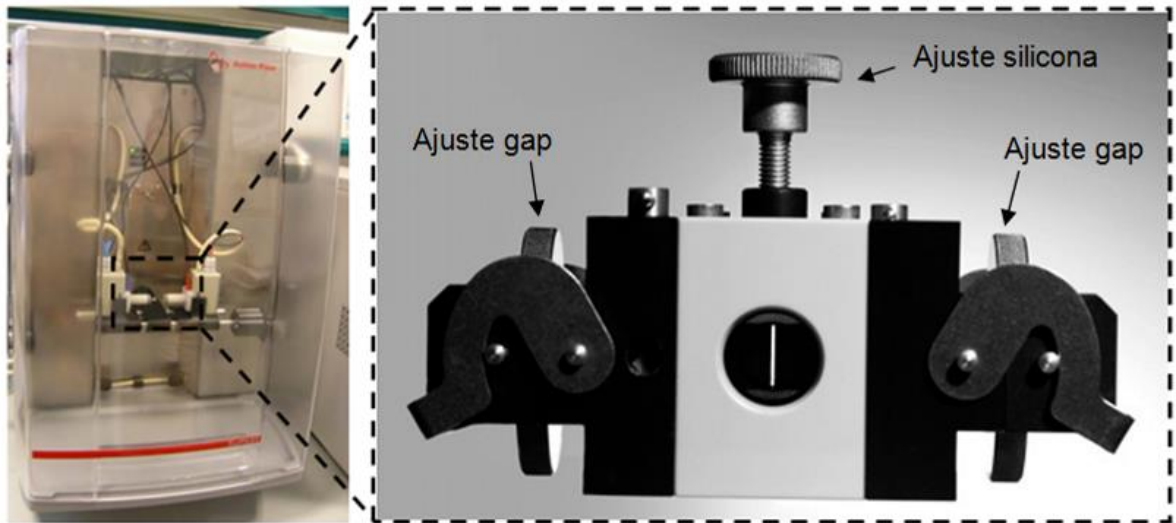


Figura 13: Foto del instrumento SurPASS y de la celda para muestras. [31]

El primer paso consiste en ajustar las muestras dentro de la celda hasta tener una distancia entre ellas cerca de la que nos interesa. Después, hay que asegurarse que la celda sea estanca y para ello, se regula la parte de silicona con el tornillo superior.

El segundo paso consiste en introducir la celda al aparato y terminar de ajustar el gap entre las muestras a $\sim 120 \mu\text{m}$. A continuación, antes de la medida, se deja pasar electrolito entre la muestra unos 15 min para equilibrar el sistema.

La medida se realiza forzando el flujo de electrolito entre las muestras alternando su dirección en el rango de presión de 0 a 300 mbar. En todos los experimentos el parámetro que se midió fue la corriente de flujo en función de la presión (dl/dP). Para cada muestra se realizaron medidas a diferentes gaps entre 80-120 μm con la finalidad de poder determinar el potencial zeta interno del externo. Las dimensiones de las muestras, importantes para los cálculos, son 20 mm x 10 mm.

Para controlar la máquina desde el ordenador, se usa el programa informático VisioLab. Además de dirigir el aparato, este software recoge toda la información relativa a la medida, como el pH y la conductividad aparte de la corriente de flujo. Estas características se compilan en un mismo documento para cada medida y el programa permite dibujar directamente algunas curvas y exportar los datos para analizarlos con Excel.

3.3.3.2 Análisis de los resultados

El programa VisioLab da valores de potencial zeta validos únicamente para las muestras no porosas. En caso de muestras porosas, es necesario aplicar las fórmulas indicadas en la Tabla 1 para poder determinar por separado la contribución del potencial zeta interno del

externo. Para ello, se usa el programa Excel, las ecuaciones de la Tabla 1 y los valores de la variación de la corriente de flujo con la presión (dl/dP) en función del gap (distancia entre la superficie de las muestras).

En la Figura 14, se muestra una curva típica de representar dl/dP en función de la abertura del canal (gap). Los puntos presentan una gran linealidad lo que permite ajustarlos a una recta y determinar su pendiente y su ordenada en el origen. Se sigue el mismo método para los valores de conductancia en función del gap, aunque esta vez únicamente la ordenada en el origen es de interés.

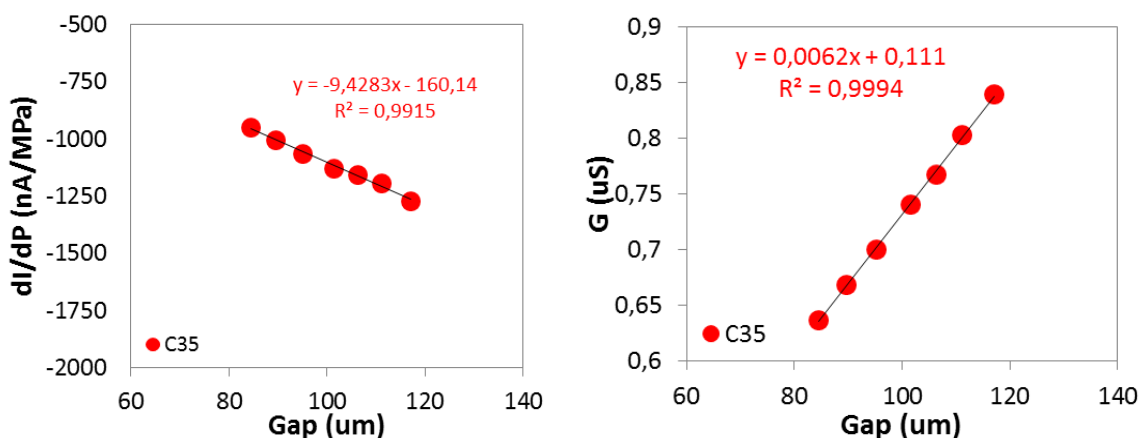


Figura 14: Ejemplo de gráfico Excel de potencial de flujo y conductancia en función de la distancia entre las muestras en el caso de un C35

Con estos tres valores y los relativos a las condiciones de la medida, se puede usar las ecuaciones para calcular el potencial zeta interno y externo de la muestra así como su conductancia.

4 Resultados y discusión

4.1 Caracterización del material

4.1.1 Análisis de la pureza de los reactivos

Puesto que para la preparación de los cementos de hidroxiapatita (HA), que es el material de partida de este trabajo, se necesita preparar polvo de α -TCP, es importante verificar la pureza del polvo. Para ello se realizaron análisis de difracción de rayos X. La Figura 15 muestra los resultados para los dos tipos de polvo de α -TCP: C y F. Ambos polvos se diferencian por el tiempo y tipo de molienda (para obtener más detalles ver sección 3.1.1) siendo el F un polvo mucho más fino que el C.

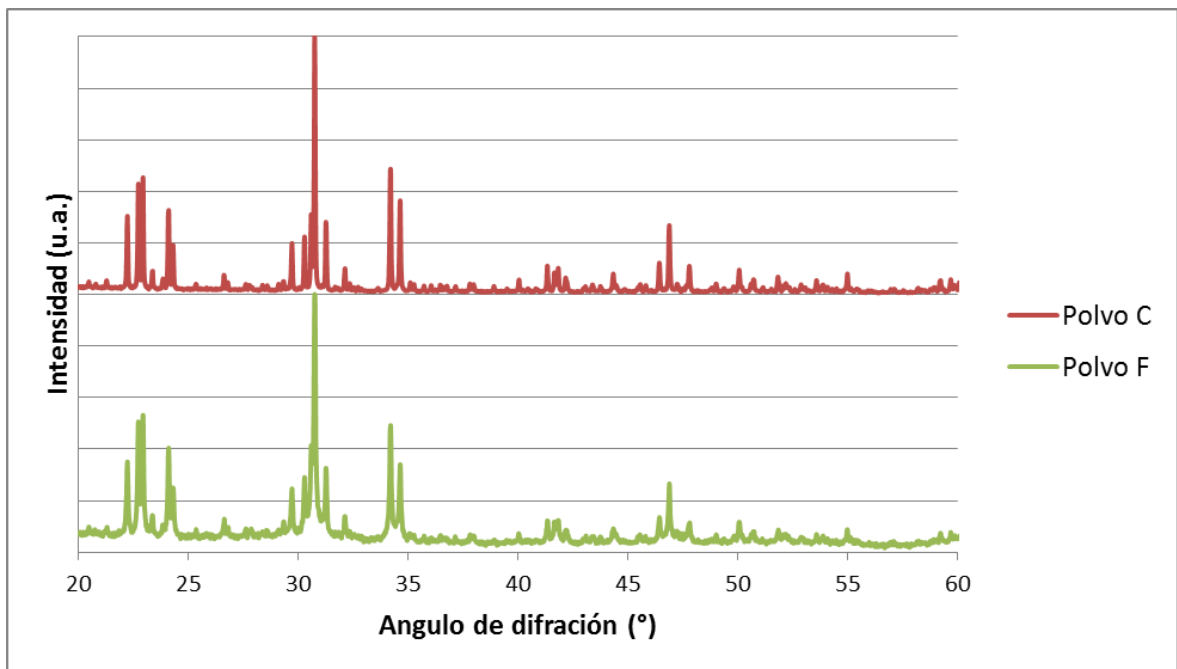


Figura 15: Diffractogramas de rayos X del polvo de α -TCP C (ref. H241) y del polvo F (ref. H243)

Cada sustancia en estado cristalino tiene un diagrama de rayos X que le es característico. Comparando los diagramas obtenidos con el de referencia para el α -TCP (ficha de difracción 09-0348) se observa que todos los picos presentes corresponden a la fase α -TCP y no hay presencia de ningún componente ajeno como pudiera ser el β -TCP. El polvo fabricado es pues puro.

La intensa molienda a la que se somete el polvo F reduce el tamaño del cristal que se traduce en un aumento del ancho de los picos perdiendo resolución (mayor solapamiento).

Además, parte de la fase cristalina transforma a fase amorfa como puede verse por la presencia de una banda ancha centrada alrededor de 31° para el caso del polvo F.

Se realizó un estudio similar con los cementos fraguados a 37°C o en autoclave y posteriormente molidos. Los difractogramas resultantes se muestran en la Figura 16.

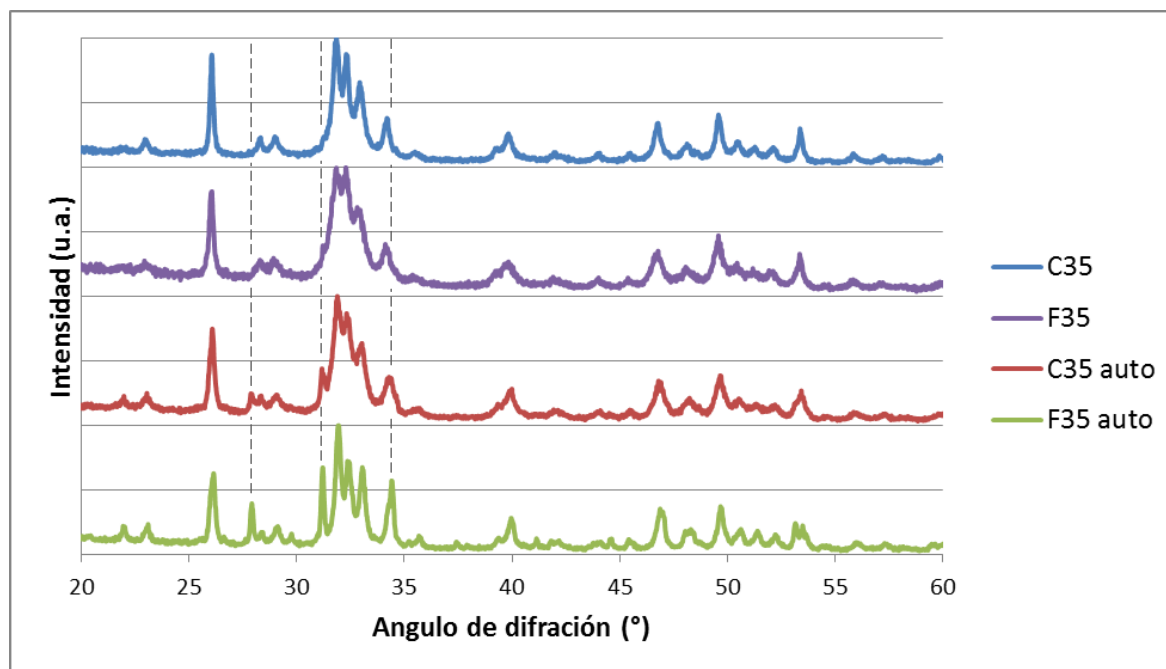


Figura 16: Difractogramas de rayos X de cementos C35 y F35 fraguados a 37°C y C35 y F35 autoclavado. (los ángulos marcados son los de los picos principales del β -TCP)

Comparando los difractogramas de los cementos fraguados a 37°C con la ficha de la hidroxiapatita (ficha de difracción 09-0432) se observa que todos los picos de la Figura 16 están presentes en el diagrama de referencia. Como no hay picos adicionales provenientes del α -TCP (en particular no se observa el pico de $30,7^\circ$, que corresponde al pico de máxima intensidad de la fase α -TCP) se puede concluir que en la reacción de fraguado del cemento todo el α -TCP se hidroliza a hidroxiapatita.

Si se compara el cemento F con el C (cementos preparados con polvo de α -TCP F o C respectivamente), se observa que la resolución de los picos es ligeramente superior para los cementos C que para los cementos F indicando que la cristalinidad de los cementos C es mejor que la de los cementos F.

Para los cementos autoclavados, sobre todo para los cementos F autoclavados, se observa picos adicionales provenientes de la presencia de β -TCP (picos de $27,8^\circ$, 31° y $34,4^\circ$). Fragar los cementos en el autoclave induce la formación de hidroxiapatita y de una fracción no despreciable de β -TCP.

4.1.2 Análisis microestructural de los cementos

La observación de la microestructura de los cementos nos permite revelar la forma y el tamaño de los cristales que componen el material.

Se pueden observar diferentes microestructuras según las condiciones de fabricación del cemento: tamaño de polvo del α -TCP, relación líquido/polvo y tipo de fraguado. A continuación se irá mostrando la influencia de cada uno de estos parámetros. Todas las imágenes corresponden a la superficie del material fraguado en moldes en contacto con Teflón.

4.1.2.1 Efecto del tipo de polvo en la microestructura

Usar polvo de α -TCP C o F en la preparación de los cementos de hidroxiapatita tiene un gran efecto en la microestructura final. Para cementos fraguados a 37°C se observa (Figura 17) que la superficie se organiza en dos escalas de microestructuras. A bajos aumentos, se observa que el cemento está formado por agregados de partículas y a mayores aumentos se ve que cada agregado está formado por multitud de cristales. Cada uno de los agregados corresponde a las partículas de polvo de α -TCP fraguadas. Puesto que el polvo de F tiene menor tamaño que el C los agregados en el cemento F son de menor tamaño que en el C. Cada agregado está compuesto por una segunda microestructura más fina cuya apariencia depende de la granulometría de polvo de α -TCP y de las condiciones de fraguado.

En la Figura 17 se ve la diferencia en la forma de los cristales entre las dos granulometrías de polvo de α -TCP. En el caso del polvo C, el más grueso, se forman cristales en forma de placas, los cristales se desarrollan en dos direcciones del espacio creando estructuras con un espesor muy inferior a las otras dos dimensiones. En el caso del polvo más fino, se observan multitud de cristales en forma de pequeñas agujas que crecen en la dirección del radio de la partícula de polvo.

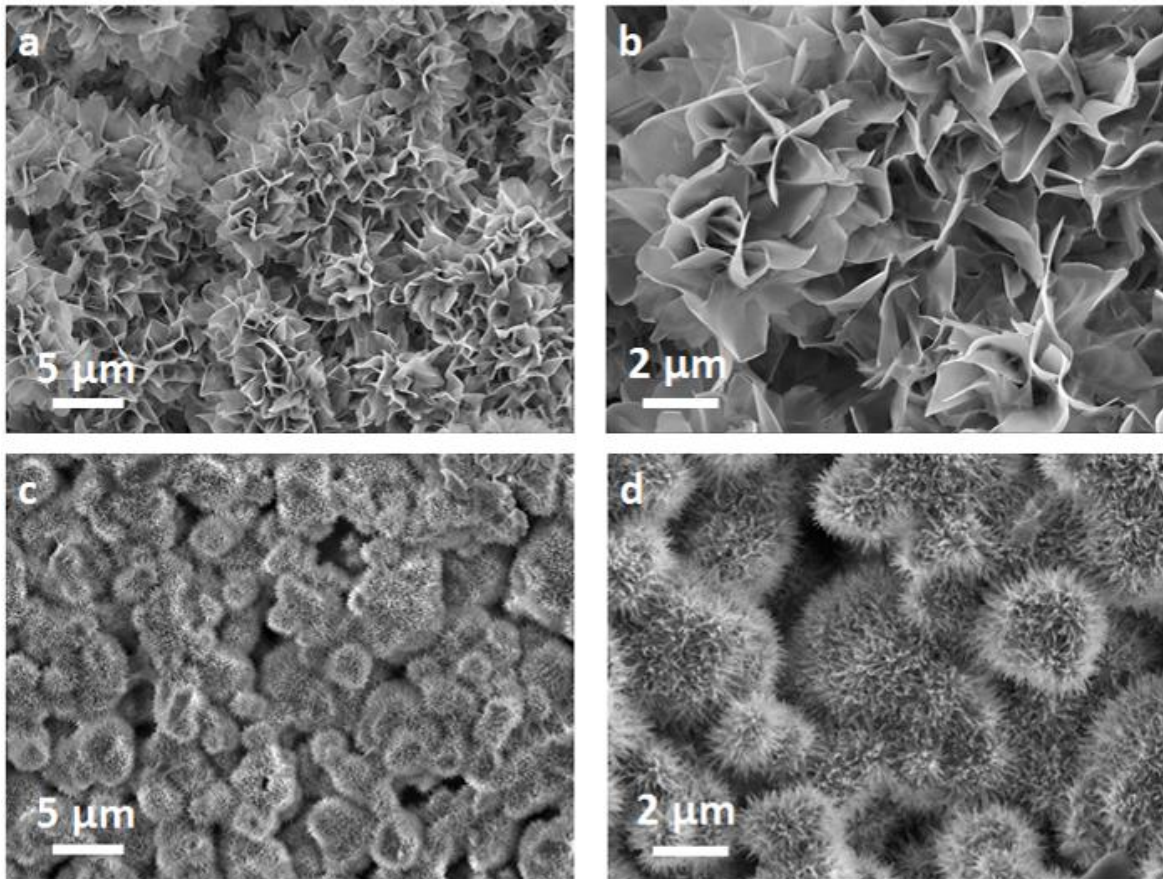


Figura 17: Imágenes SEM de cemento C55 (a, b) y F55 (c, d).

Estas observaciones son coherentes con los resultados de difracción de rayos X que mostraron mayor cristalinidad en el caso de cementos C que de los F.

La diferencia en la morfología entre los cristales de los cemento C y F se explica por la influencia de la granulometría del polvo de α -TCP [24]. La granulometría del polvo de α -TCP F, al ser más pequeño, presenta una mayor superficie disponible para reaccionar en contacto con la fase líquida del cemento. Esto significa que la disolución del α -TCP F da lugar a un grado de supersaturación más elevado que para el polvo C. Esta sobresaturación favorece la creación de muchos núcleos cristalinos en vez de favorecer su crecimiento. En el caso del polvo C, al ser un polvo de mayor tamaño, la superficie es menor y el grado de saturación también. Esto resulta en la formación de menos núcleos pero favorece su crecimiento.

4.1.2.2 Efecto del tipo de fraguado en la microestructura

Los cementos fraguados en autoclave presentan un tipo de cristales diferentes de los precedentes. Para el caso de un cemento C, en vez de observarse placas grandes (material fraguado a 37°C) se observan pequeñas placas alargadas como se puede ver en

la Figura 18. No es de extrañar el obtener diferentes morfologías de cristal para un mismo material fraguado a 37°C o en autoclave puesto que en este último caso la aplicación de presión y temperatura (121°C) cambia completamente las condiciones de precipitación.

Las muestras autoclavadas presentan un tipo de cristales diferentes de los precedentes. Se observa un bosque de pequeñas placas alargadas como se puede ver en la Figura 18.

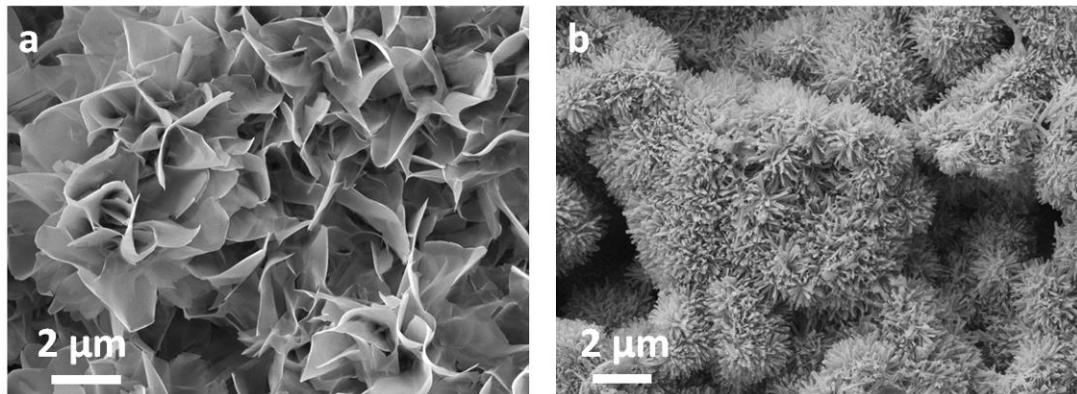


Figura 18: Imágenes SEM de un C35 fraguado a 37°C (a) o en autoclave (b).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que, aunque generalmente la microestructura de cementos autoclavados se compone de pequeñas placas alargadas (imagen (b) de la Figura 19), en algunos casos para los cementos autoclavados se forma en su superficie una microestructura completamente diferente que se compone de cristales muy alargados y más grandes (imagen (a) de la Figura 19).

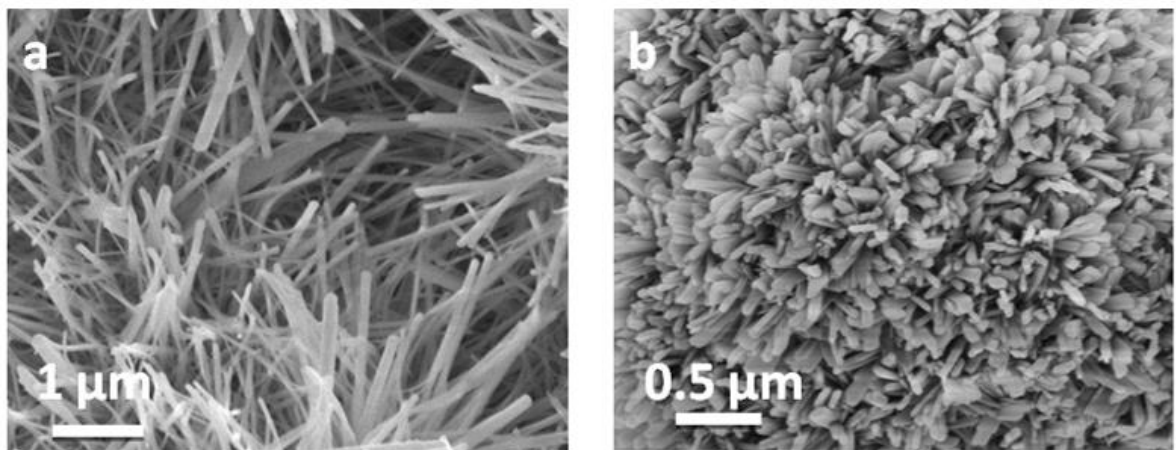


Figura 19: Imágenes SEM de dos cementos C autoclavados.

Por el momento, no se conoce con exactitud la razón por la que se induce la formación de una u otra microestructura, sin embargo, es posible que tenga que ver con el tiempo que transcurre antes de poner los cementos en el autoclave. Esta duración es un parámetro

que cambia entre 30 minutos y 2 horas en función de las muestras. Usualmente los tiempos lo más largos corresponden a muestras con una relación líquido/polvo elevado ya que necesitan más tiempo para tener cohesión antes de poderlas poner en el autoclave.

Con estas observaciones se deduce que los cristales de hidroxiapatita crezcan de varias maneras en función de las condiciones de preparación.

4.1.2.3 Efecto de la relación líquido-polvo en la microestructura

La Figura 20 muestra la superficie de tres cementos preparados con diferentes relaciones líquido/polvo a dos aumentos diferentes.

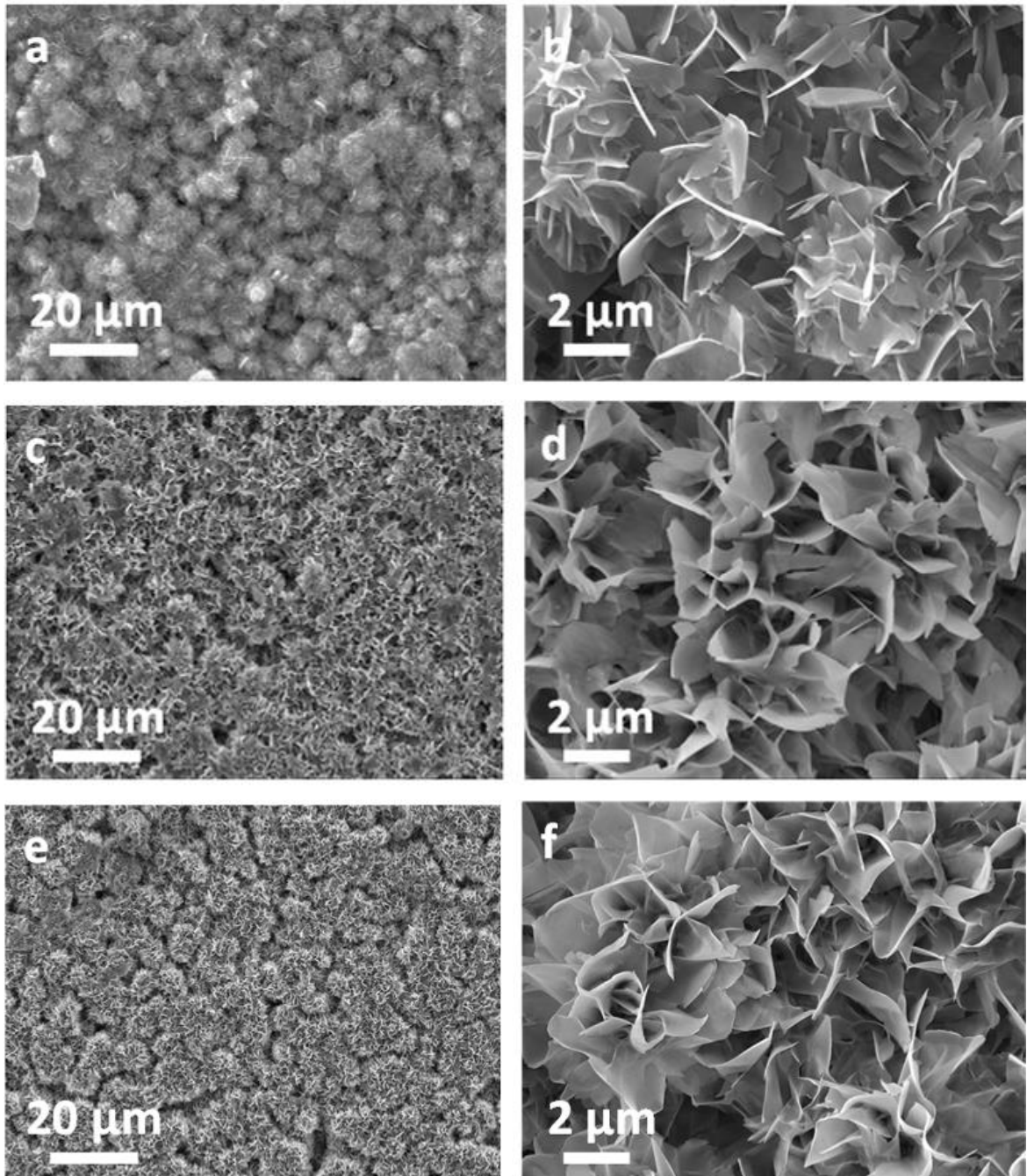


Figura 20: Imágenes SEM de cemento C35 (a, b), C45 (c, d) y C55 (e, f).

Las imágenes son similares. Al SEM, no se observa diferencias microestructurales para varias relaciones líquido/polvo. Aunque a priori pudiera pensarse que variando la relación líquido/polvo deberían verse superficies con agregados más separados cuanto más elevado el contenido de líquido, el resultado muestra que independientemente de la relación líquido/polvo la morfología en superficie es muy similar. Este efecto es debido al moldeado. La separación entre agregados se evidenciara en la sección siguiente con las medidas de porosidad.

Para el caso de las muestras autoclavadas, la relación L/P tampoco afectó a la microestructura de la superficie Figura 21.

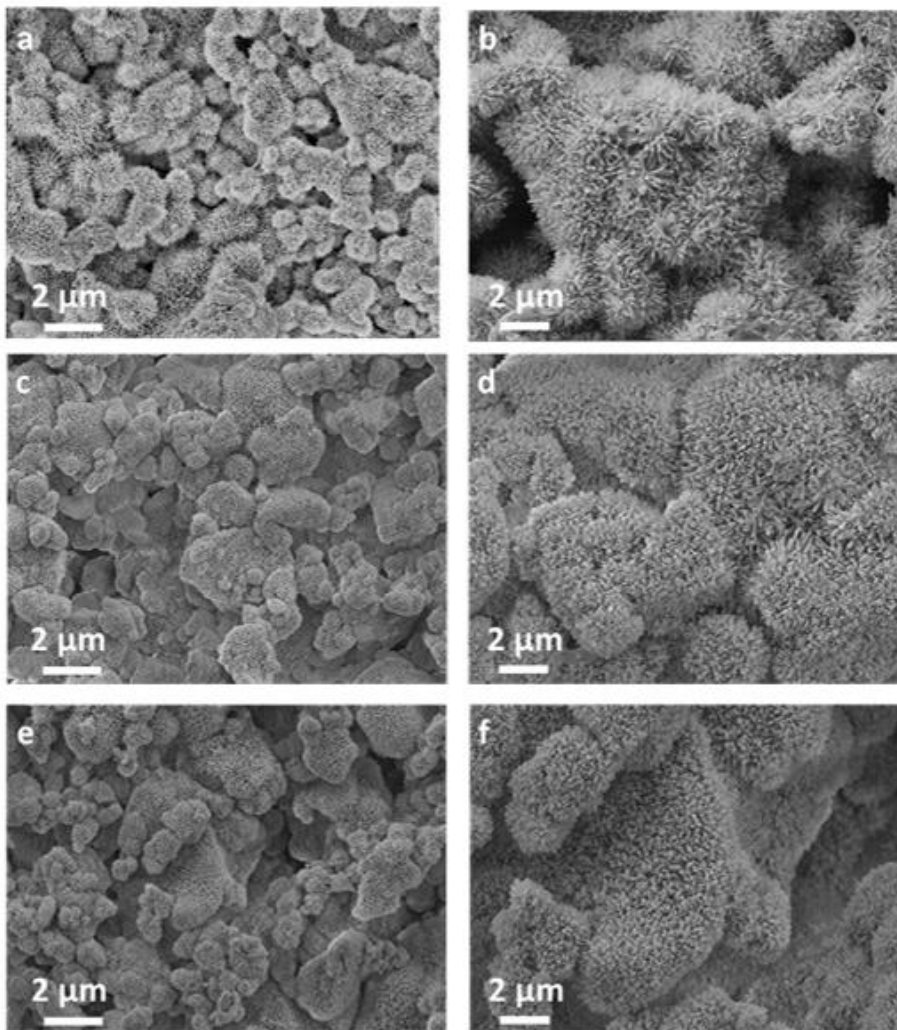


Figura 21: Imágenes SEM de cemento autoclavados C35 (a, b), C45 (c, d) y C55 (e, f).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que no existe microestructura perfecta. Cada cemento tiene variaciones en el tamaño y la forma de sus cristales de hidroxiapatita. Una pequeña proporción de cristales diferentes es normal y no tiene efecto en la carga media de toda su superficie. Pero ocurre que cementos presentan microestructura con demasiada irregularidades y no es un fenómeno despreciable como se explicará en una próxima parte (ver 4.2.2).

4.1.3 Porosidad de los cementos de hidroxiapatita

La porosidad de los diferentes materiales medida por MIP o tomada de referencias publicadas sobre muestras similares [35] se muestra en la Figura 22.

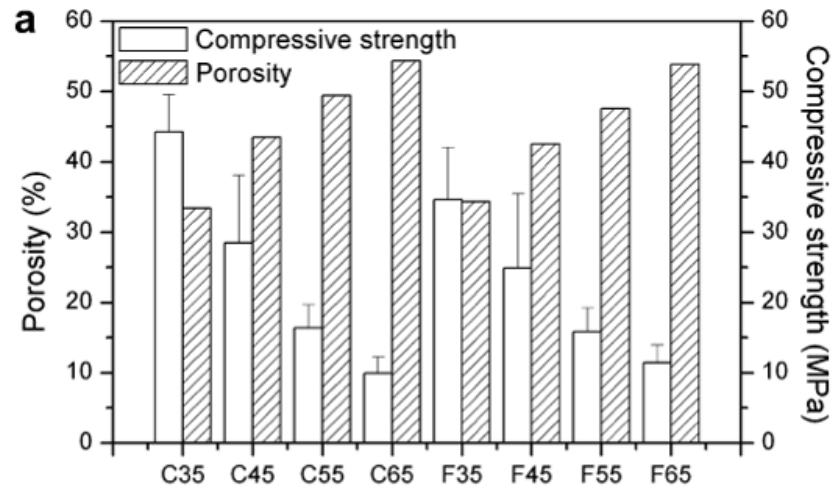


Figura 22: Valores de porosidad y resistencia en compresión para 8 tipos de cemento de hidroxiapatita. [35]

Aunque las imágenes de SEM de la superficie de los cementos no mostraron diferencias a nivel de porosidad con la relación líquido/polvo (Figura 20), la porosidad de los cementos medida por MIP claramente aumenta con el aumento de la relación líquido/polvo. Como lo muestra la Figura 23, las condiciones de fraguados influyen también la porosidad de los cementos.

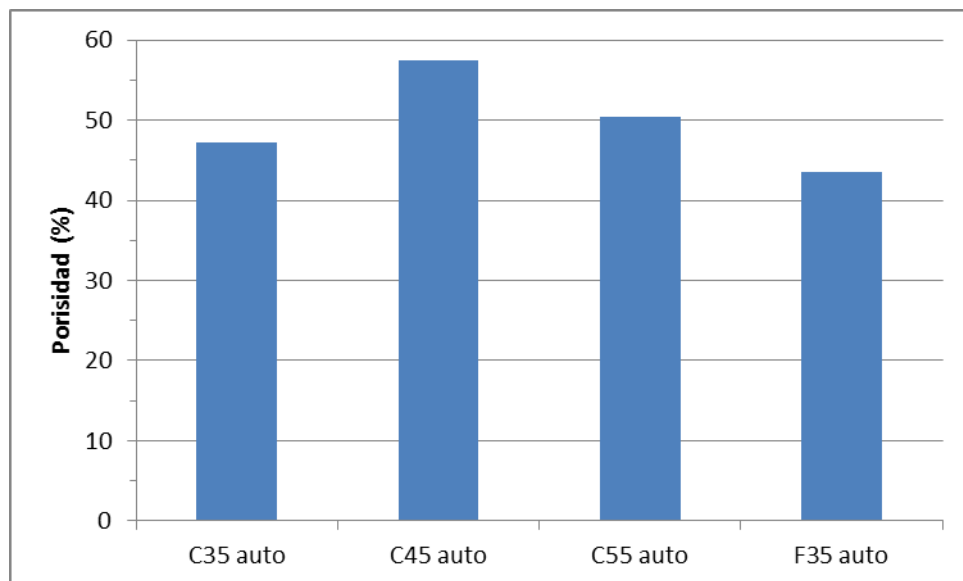


Figura 23: Valores de porosidad para cementos C35, C45, C55 y F35 fraguados en autoclave

Para los cuatro casos estudiados de cementos autoclavados la porosidad es muy elevada, superior a la del mismo cemento fraguado a 37°C. El fraguado a temperatura y presión más elevadas abre la microestructura, reduciendo el efecto de la relación líquido/polvo.

4.2 Preparación de muestra para potencial zeta

Aunque la preparación de cementos convencionales (discos, cilindros) no es compleja, las muestras para hacer medidas de potencial zeta deben ser planoparalelas, relativamente grandes en longitud y ancho ($2 \times 1 \text{ cm}^2$) pero con espesor el mínimo posible ($<1 \text{ mm}$). La fragilidad del material y los requerimientos anteriores hace que no sean muestras fáciles de preparar. A continuación se detallan varios aspectos a tener en cuenta en su preparación.

4.2.1 Efecto del tipo de molde

Se pensó que trabajar con moldes flexibles de látex en vez de los rígidos tradicionales hechos con teflón facilitaría la fabricación de muestras de cemento con una relación líquido/polvo elevada ya que después del fraguado permitiría desmoldar con más facilidad el material.

Observaciones con SEM de las superficies de las muestras fabricadas con moldes de Látex revelaron que en la superficie en contacto con el molde se impide la formación de la microestructura típica de los cementos tal y como se ve en la Figura 24.

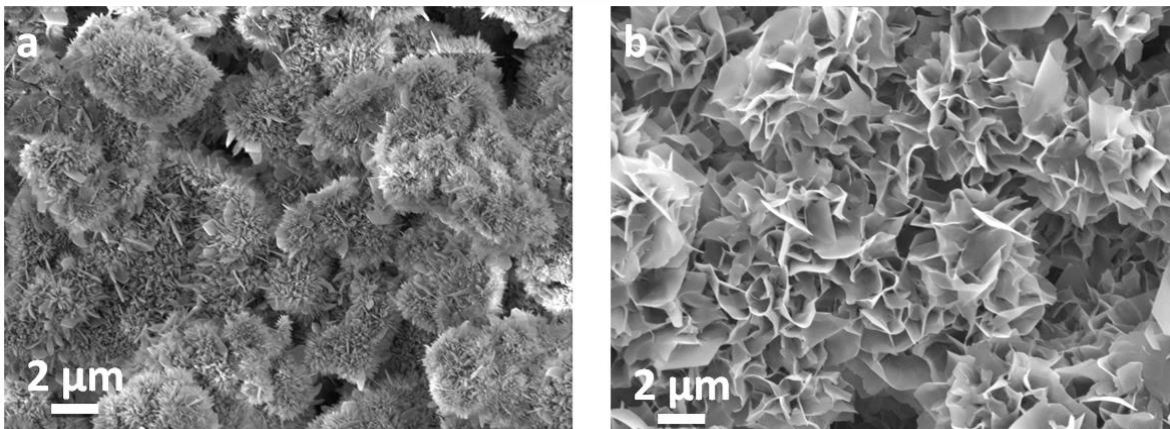


Figura 24: Microestructura de un cemento C35 fabricado en molde de Látex (a) y en molde de Teflón (b).

En vez de formarse la misma microestructura en el molde de Látex, cristales en forma de placas, se obtiene una microestructura irregular con una mezcla de cristales en forma de placas y otros en forma de agujas.

Estas observaciones muestran que el Látex no es un material adecuado para moldear cementos y siempre y cuando se requiera trabajar con la superficie en contacto con el molde éste deberá ser de teflón.

4.2.2 Efecto del prensado del cemento

Se descubrió en muestras principalmente de cementos F preparados con relaciones líquido/polvo bajas (por ejemplo 0.35 ml/g), varias zonas en la superficie con la microestructura alterada como puede verse en la Figura 25. Estas zonas coincidían que correspondían a la superficie superior de la muestra.

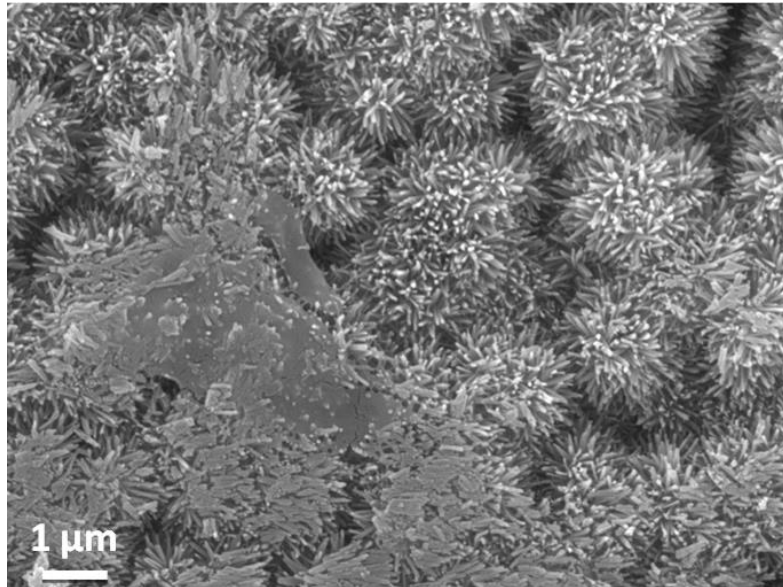


Figura 25: Imagen SEM de zonas sin agujas en una muestra F35

En la Figura 25 se observa que los cristales se desarrollan correctamente alrededor de estas zonas alteradas eliminando el que su formación pueda ser debida a un problema del cemento. Además, como la microestructura no parece destruida, no presenta cristales rotos, se deriva que los cristales no crecieron y que su origen está en durante la formación de la microestructura. Su origen se cree que está ligado a las propiedades de la superficie en contacto con la cual el cemento se fragua.

Durante el moldeado del cemento, especialmente para relaciones líquido/polvo bajas, hay que aplicar presión encima de la hoja de Teflón para rellenar bien el molde. Se cree que esta presión ejercida prensa demasiado el cemento separando la fase líquido del polvo lo que afecta al fraguado y por tanto al desarrollo de su microestructura.

El efecto del prensado del cemento no se limita al estado de su superficie final. Según el artículo de Sergey V.Dorozhkin [1], el ejercitar una presión en el cemento provoca también la disminución de la porosidad de la muestra. Este efecto es visible en los cementos cuando se compara la cara superior e inferior del material moldeado, sobre todos los cementos con una relación líquido/polvo baja que necesitan más presión para obtener muestras tan finas y planas que se desea. Para minimizar variabilidades, en general se

considera que las caras superiores de los cementos son de mejor calidad que las inferiores y son las que se escogen para su análisis.

4.2.3 Efecto del lavado del cemento con metanol

Un aspecto crítico en la medida del potencial zeta de muestras porosas es asegurar que la medida se realiza en muestras completamente mojadas con electrolito sin que quede aire atrapado en los poros. La presencia de burbujas de aire podría falsear significativamente el resultado. Una forma de solucionar el problema es lavar la muestra con metanol para disolver las burbujas de aire y después sustituir gradualmente el metanol por electrolito (sección 3.3.2). Sin embargo, según el artículo de Mark E. DRY y Ralph A. BEEBE [36], el metanol tiene afinidad por la apatita adsorbiéndose en su superficie. Si el metanol no se desorbiera su presencia puede falsear las medidas de potencial zeta.

En este artículo, trabajan con hidroxiapatita sintética en forma de polvo tratada térmicamente para secar a 450°C, tratado que no se realiza con los cementos de hidroxiapatita en este proyecto. El metanol queda todavía absorbido en este material después de una noche de desgasificación a 0°C.

Para verificar si la preparación usando metanol influye los resultados en el caso de las muestras de cemento de hidroxiapatita que se usan en este proyecto, se intenta otro método para preparar y poder comparar los resultados.

La idea es preparar muestras sin secarlas en ningún momento tal y como se presenta en la Figura 26. De esta manera, el aire tiene poca probabilidad de entrar en los poros del material y no es ya necesario tener una etapa para eliminarlo.

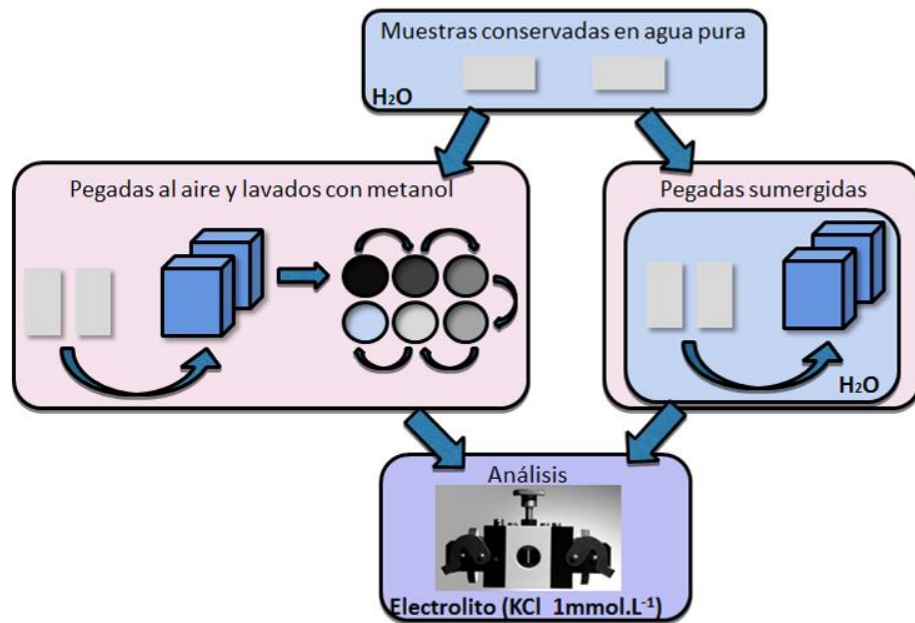


Figura 26 : Dos posibilidades para preparar muestras de análisis de potencial zeta.

4.3 Medidas de potencial zeta

Gracias al trabajo reciente publicado por Yaroshchuck y Luxbacher [29] es posible obtener medidas de potencial zeta para muestras porosas, lo que no era posible con la fórmula clásica que asumía que las muestras eran densas. No solo es posible medir el potencial zeta de muestras porosas sino que además el artículo distingue dos tipos de potenciales, el externo que sería el valor clásico y el interno que es el de la superficie de los poros (Ec. 4 y Figura 9).

$$\frac{dI_{str}}{d\Delta p} = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 W}{\eta L} (H \cdot \zeta_{ext} + 2H_p \cdot \gamma \cdot \zeta_{int}) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde la corriente de flujo se expresa en función de la permitividad en el vacío (ε_0), de la constante dieléctrica (ε), de la viscosidad (η), de la longitud de la muestra considerada (L), el ancho de la muestra (W), de la distancia entre las dos muestras medidas (H), del potencial zeta externo (ζ_{ext}), del valor de la penetración del flujo dentro de la muestra (H_p), de la porosidad (γ) y del potencial zeta interno (ζ_{int}).

Para hablar de potencial interno tiene que darse que la porosidad del material sea una porosidad abierta, el electrolito tiene que fluir por entre los poros. Para muestras muy porosas H_p corresponde al grosor de la muestra pero para el caso de materiales tortuosos y de porosidades pequeñas, como es el caso de los cementos, H_p es el grosor del material

penetrado por el flujo. Esta fracción se deduce de la fórmula (Ec. 5) que relaciona la porosidad en función de la conductancia dentro de los poros (C_p) y de la conductancia teórica del electrolito en un volumen equivalente (C_{cub}).

$$\gamma = \frac{C_p}{C_{cub}} = \frac{C_p}{\Omega \frac{\text{sección}}{\text{longitud}}} = \frac{C_p}{\Omega \frac{W \cdot 2H_p}{L}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Se obtiene la ecuación (Ec. 6), el valor de la penetración del flujo dentro de la muestra en función de la longitud de la muestra considerada, la conductancia dentro de los poros, la conductividad eléctrica del electrolito (Ω), el ancho de la muestra y la porosidad.

$$H_p = \frac{L \cdot C_p}{2\Omega \cdot W \cdot \gamma} \quad (\text{Ec. 6})$$

Durante este proyecto, se han realizado aproximadamente 150 medidas con más de 45 muestras. A pesar del gran número de medidas no todas han sido válidas. El trabajo, sin embargo, ha servido para poner a punto esta técnica para la medida de muestras complejas como son los cementos. Como objetivo principal se ha querido ver la influencia del procesado de varios cementos con diferentes microestructuras y porosidades en el potencial zeta interno/externo.

4.3.1 Efecto de la preparación de muestras en la medida del potencial zeta

Previo a la realización de las medidas en los diferentes cementos se analizó el efecto de la presencia de zonas deterioradas en la microestructura del cemento así como del efecto del lavado con metanol de las muestra en las medidas de potencial Z. En la Figura 27 se puede ver que una microestructura dañada induce diferencias en los resultados de potencial zeta.

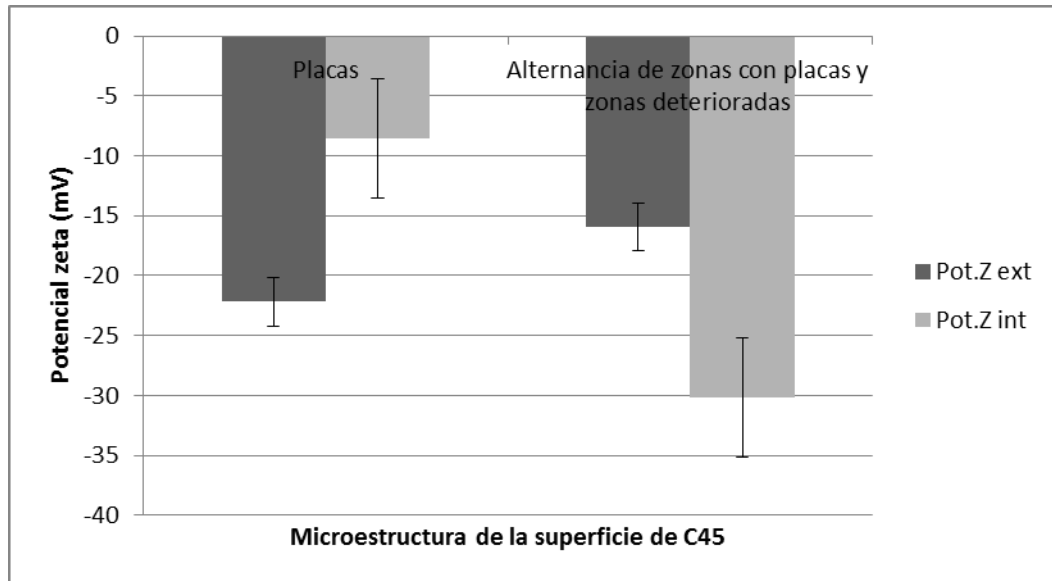


Figura 27: Resultados de potencial zeta interno y externo en caso de muestras C45 con superficie constituida por la típica estructura de cristales en forma de placas o por mezcla de esta microestructura y de zonas deterioradas.

Las muestras C se caracterizan por tener una microestructura constituida por una sucesión de placas (Figura 20, imágenes c y d). En el caso de tener superficies deterioradas, si la proporción de zonas deterioradas es demasiado importante (Se considera buenas superficies con al máximo 5 % de zonas deterioradas o con cristales diferentes), los valores de potencial Z cambian notablemente.

El potencial externo de la muestra deteriorada es superior al de otras. Al contrario, los resultados de potencial interno para la muestra con zonas sin pequeñas placas son muy inferiores a los usuales. Así es muy crítico analizar el estado de las superficies de las muestras antes de analizarlas.

Con respecto al efecto del montaje de las muestras, la Figura 26 resume el efecto de montar muestras secas seguido por un lavado con metanol (elimina el aire atrapado) o bien el montarlas sin secar para evitar la introducción de aire. Según los datos obtenidos en el caso del cemento C35, los resultados de muestras preparadas con los dos métodos son similares lo que significa que cualquiera de ellos es bueno. Además se observa que los lavados con metanol no influyen las medidas de potencial zeta de estos cementos de hidroxiapatita. Por cuestiones prácticas montar las muestras sin utilizar metanol permite evitar las dos horas necesarias de lavado y el condicionamiento de la máquina SurPASS es más rápido. La Tabla 2 presenta resultados de potencial zeta para cementos similares preparados con los dos métodos.

Preparación de las muestras	ζ_{ext} (mV)	ζ_{int} (mV)
Pegadas al aire y lavados con metanol	-23,42	-13,43
	-22,69	-26,63
Pegadas sumergidas	-22,45	-17,58

Tabla 2: Valores de potencial zeta para muestras de C35 preparadas con los dos métodos.

Según los datos obtenidos en el caso del cemento C35, los resultados de muestras preparadas con los dos métodos son similares. Los lavados con metanol no influyen las medidas de potencial zeta de estos cementos de hidroxiapatita.

4.3.2 Medidas de potencial zeta de cementos C en función de la relación líquido/polvo

Los gráficos de la Figura 28 representan las rectas de corriente de flujo y conductancia que se generan al hacer pasar un flujo entre dos muestras en función de la distancia que las separa. El estudio se ha hecho para cementos C con las siguientes relaciones líquido/polvo $0,35 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,45 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,55 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. La Tabla 3 presenta todos los parámetros de estas rectas y los valores de potencial zeta calculados con ellos.

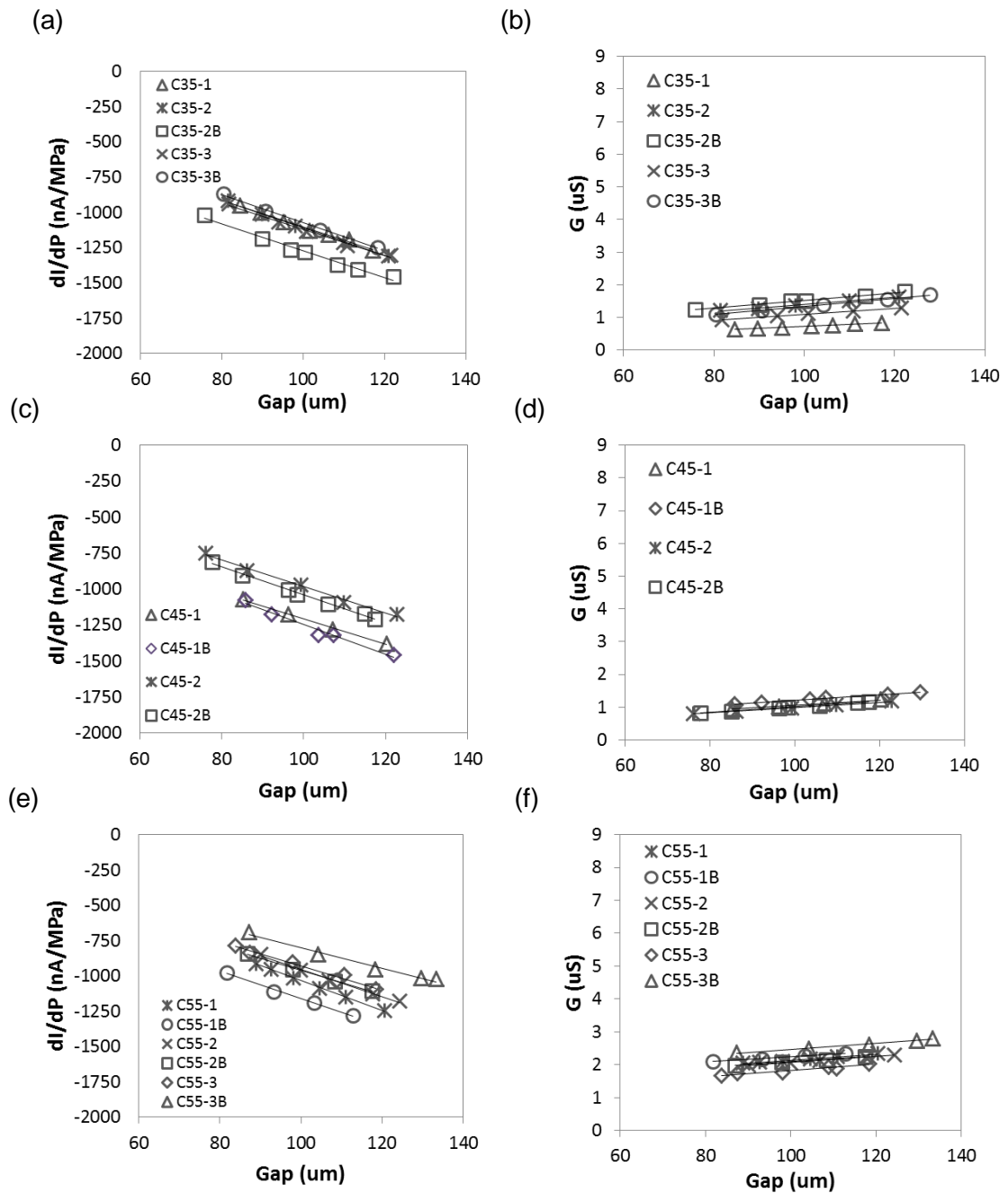


Figura 28: Rectas de corriente de flujo y conductancia en función de la distancia entre las muestras para C35 (a, b), C45 (c, d) y C55 (e, f). Los números 1, 2 y 3 indican medidas sobre muestras diferentes. La letra "b" indica medidas de la misma muestra pero cambiando su orientación.

nombre muestra	dl/dP vs gap			Cond. vs gap		ζ_{ext} (mV)	ζ_{int} (mV)
	offset (nA/MPa)	pendiente (nA/(MPa.μm))	R ²	conductancia (μS)	R ²		
C35-1	-160	-9,43	0,9915	0,11	0,9994	-22,76	-26,10
C35-2	-123	-9,87	0,997	0,29	0,9958	-23,83	-7,63
C35-2B	-323	-9,5	0,9831	0,34	0,9943	-22,93	-17,15
C35-3	-190	-9,31	0,9911	0,20	0,999	-22,47	-17,37
C35-3B	-80	-9,92	0,9961	0,10	0,9996	-23,95	-15,25
C45-1	-310	-8,96	0,9963	0,25	0,9997	-21,63	-22,91
C45-1B	-207	-10,38	0,9772	0,39	0,9971	-25,06	-9,64
C45-2	-67	-9,15	0,992	0,19	0,9951	-22,09	-6,38
C45-2B	-70	-9,7	0,9957	0,13	0,9972	-23,42	-9,67
C55-1	24	-10,6	0,9989	1,20	0,9914	-25,59	0,36
C55-1B	-191	-9,7	0,9932	1,42	0,999	-23,42	-2,44
C55-2	9	-9,6	0,9943	1,12	0,9984	-23,17	0,15
C55-2B	-93	-8,7	0,9951	1,24	0,9976	-21,00	-1,36
C55-3	-75	-8,6	0,9738	0,87	0,9857	-20,76	-1,56
C55-3B	-78	-7,2	0,9824	1,55	0,9704	-17,38	-0,91

Tabla 3: Datos obtenidos de cada recta de la Figura 28 y cálculos derivados con los resultados de potencial Z de los diferentes cementos.

La Figura 29 agrupa los resultados calculados a partir de los parámetros de las rectas de los gráficos precedentes.

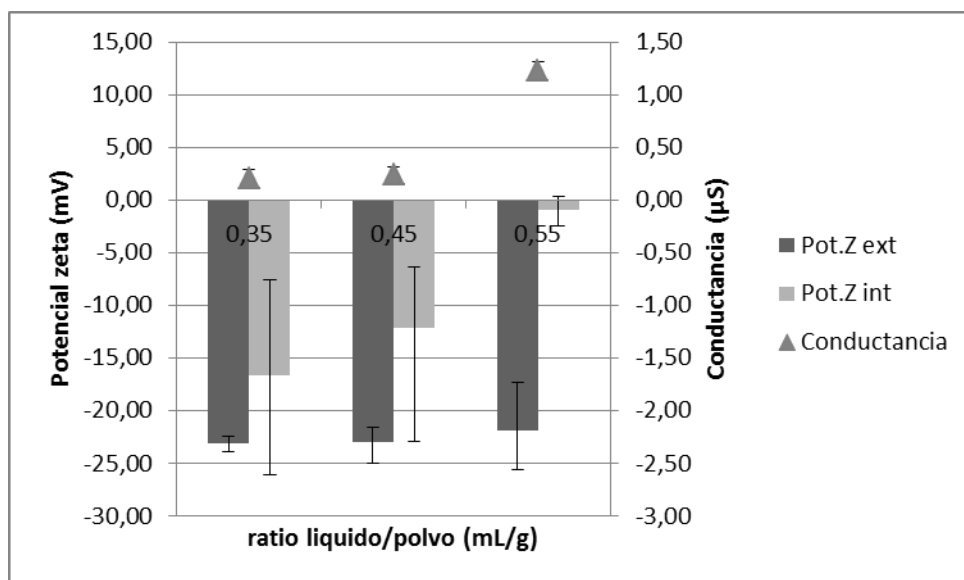


Figura 29: Potencial zeta externo e interno y conductancia en función función de la relación líquido/polvo para cementos C.

Los resultados muestran que la diferencia en porosidad de cementos preparados con diferentes relaciones líquido/polvo (Tabla 3) no parece tener influencia sobre su potencial zeta externo que permanece estable alrededor de -23 mV. Sin embargo, se observa que el aumento en la relación líquido/polvo de $0,35 \text{ mL.g}^{-1}$ a $0,55 \text{ mL.g}^{-1}$ induce un aumento del potencial zeta interno. Para el caso de los cementos C55, este potencial llega incluso a oscilar entre valores positivos y negativos. Se observa también que porosidad y conductancia son parámetros relacionados: aumentando la porosidad se aumenta la conductancia.

La similitud en los resultados de potencial zeta externo no son de extrañar puesto que la microestructura de la superficie de estos cementos ya se vió que era muy similar (Figura xx). Tampoco es de extrañar que el potencial zeta interno (a pesar de la elevada dispersión en los resultados) tienda a ser menos negativo con el aumento de la porosidad ya que la presencia de poros tiende a “diluir” la densidad de carga. Sin embargo lo que no tiene sentido es que haya un cambio en el signo del potencial interno para el cemento C55. Este aspecto deberá estudiarse con más detalle en el futuro.

Los resultados muestran que la presencia de poros tiene pues un gran efecto en los valores de potencial zeta.

La relación líquido/polvo tiene una influencia cierta en la porosidad interna de la muestra. Aunque el flujo no penetra por todo el espesor del cemento, la variación de potencial zeta interno puede relacionarse con esta variación de porosidad interna. El aumento de la porosidad induce una concentración iónica media inferior dentro del poro.

4.3.3 Medidas de potencial zeta de cementos C autoclavados en función de la relación líquido/polvo

Los gráficos de la Figura 30 representan las rectas de corriente de flujo y conductancia que se generan al hacer pasar un flujo entre dos muestras en función de la distancia que las separa. El estudio se ha hecho para cementos C autoclavados con las siguientes relaciones líquido/polvo $0,35 \text{ mL.g}^{-1}$, $0,45 \text{ mL.g}^{-1}$ y $0,55 \text{ mL.g}^{-1}$. La Tabla 4 presenta todos los parámetros de estas rectas y los valores de potencial zeta calculados con ellos.

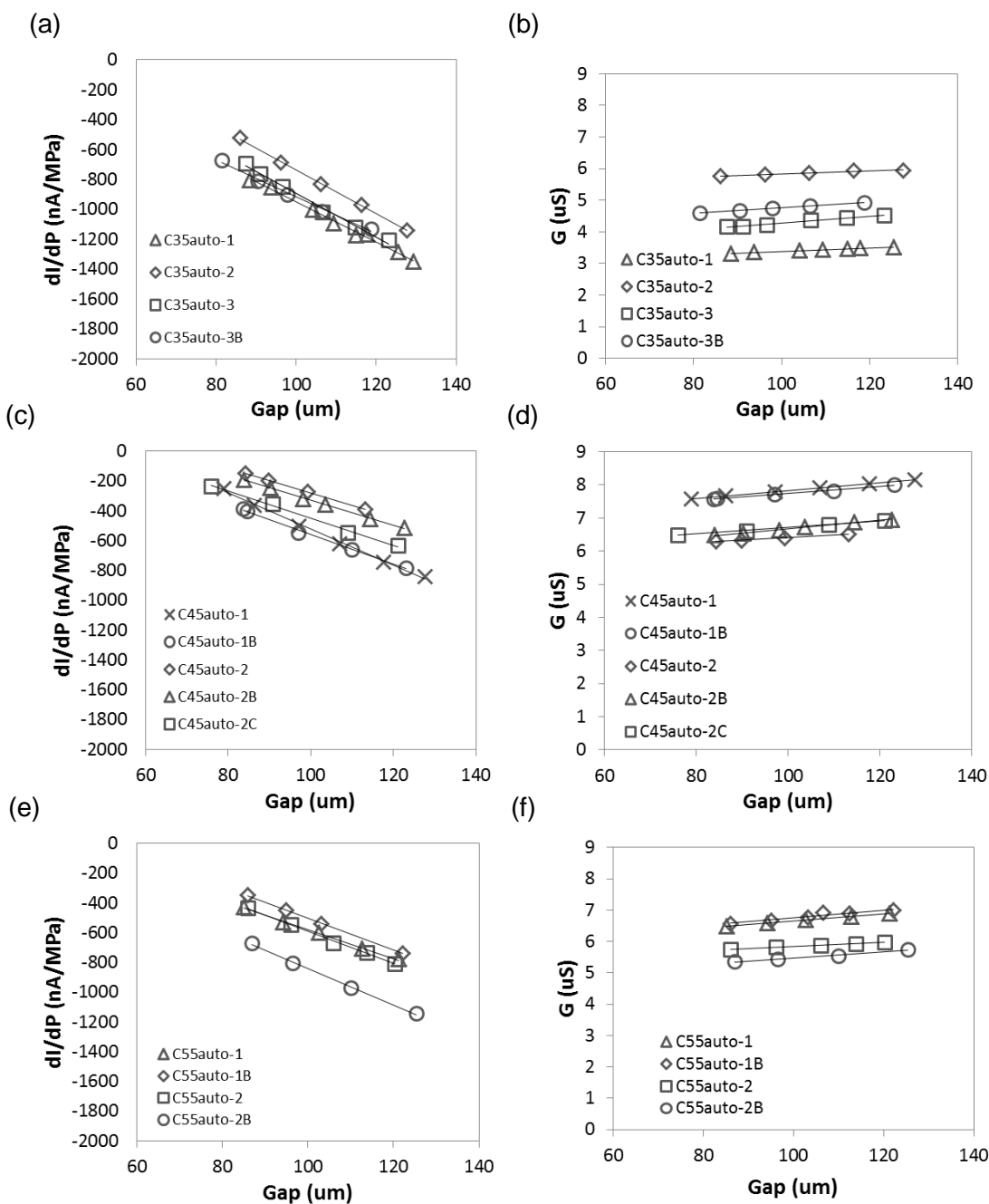


Figura 30: Rectas de potencial de flujo y conductancia en función de la distancia entre las muestras para C35 (a, b), C45 (c, d) y C55 (e, f) autoclavados cuyos parámetros son usados para las próximas comparaciones. (Los números 1,2 y 3 indican medidas sobre muestras diferentes, b y c indican medidas de la misma muestra pero cambiando su orientación)

nombre muestra	dl/dP vs gap			Cond. vs gap		ζ_{ext} (mV)	ζ_{int} (mV)
	offset (nA/MPa)	pendiente (nA/(MPa.μm))	R ²	conductancia (μS)	R ²		
C35auto-1	386	-13,4	0,9942	2,83	0,9843	-32,35	2,47
C35auto-2	731	-14,7	0,999	5,39	0,8937	-35,49	2,45
C35auto-3	563	-14,6	0,9905	3,19	0,9823	-35,24	3,19
C35auto-3B	313	-12,3	0,9909	3,92	0,9994	-29,69	1,45
C45auto-1	690	-12,1	0,9966	6,64	0,9998	-29,21	1,88
C45auto-1B	439	-10	0,9953	6,67	0,9857	-24,14	1,19
C45auto-2	546	-8,3	0,9998	5,64	0,9914	-20,04	1,75
C45auto-2B	512	-8,4	0,9986	5,38	0,9935	-20,28	1,72
C45auto-2C	459	-9,1	0,9942	5,74	0,9967	-21,97	1,45
C55auto-1	396	-9,8	0,9978	5,49	1	-23,66	1,31
C55auto-1B	567	-10,7	0,9998	5,51	0,929	-25,83	1,86
C55auto-2	496	-10,9	0,9968	5,19	0,9999	-26,31	1,73
C55auto-2B	385	-12,3	0,9973	4,49	0,9936	-29,69	1,55

Tabla 4: Datos obtenidos de cada recta de la Figura 30 y cálculos derivados con los resultados de potencial Z de los diferentes cementos.

La Figura 31 agrupa los resultados calculados a partir de los parámetros de las rectas de los gráficos precedentes.

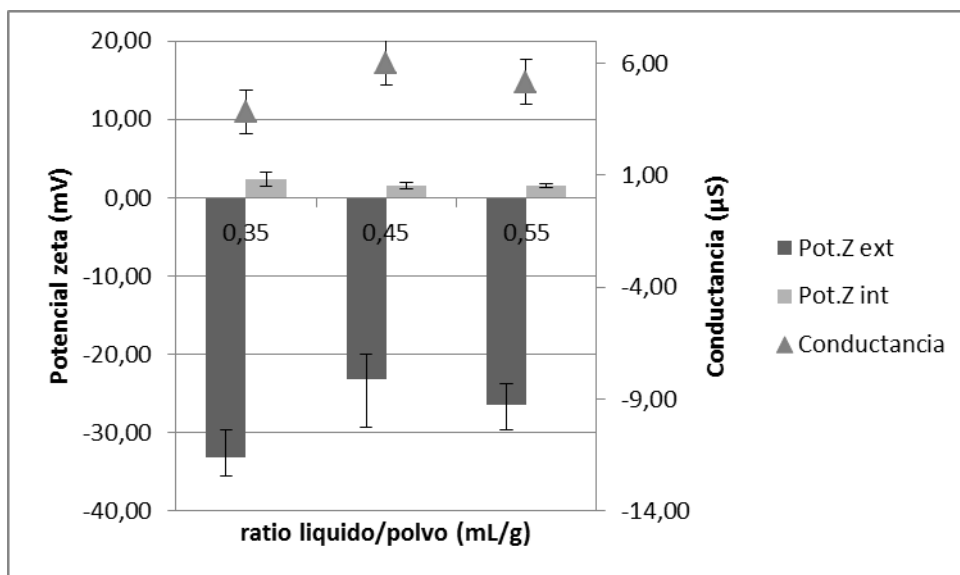


Figura 31: Potencial zeta externo e interno y conductancia en función de la relación líquido/polvo de cementos C autoclavados.

Es interesante observar que independientemente de la relación líquido/polvo, las muestras autoclavadas tienen resultados similares de potencial zeta externo, interno y también de conductancia. Esta similitud se puede explicar por los niveles de porosidad tan similares

entre las muestras después del proceso del autoclavado. Para estas muestras no se puede atribuir una influencia de la relación líquido/polvo sobre los resultados de potencial zeta ni para los valores de conductancia.

Un aspecto que llama la atención es el cambio de signo entre el potencial zeta externo y el interno. Se observa que para los tres tipos de cementos presentados, el potencial zeta interno es positivo y estable mientras que el potencial zeta externo es negativo y la conductancia es claramente elevada aunque no se destaca ninguna tendencia.

Hay que tener en cuenta que los difractogramas de rayos X indican una fracción importante de β -TCP en los cementos autoclavados comparado con los cementos fraguados a 37°C. Puesto que esta fase es soluble, su disolución libera iones calcio positivos que pueden estar absorbidos por la superficie negativa de la hidroxiapatita. Así, aunque esta fase no interviene directamente en los valores de potencial zeta medidos, no se excluye la posibilidad que cambia en parte la carga de la superficie de la hidroxiapatita. [37]

4.3.4 Medidas de potencial zeta de cemento con microestructuras diferentes y relación líquido/polvo fijo

Los gráficos de la Figura 32 representan las rectas de corriente de flujo y conductancia que se generan al hacer pasar un flujo entre dos muestras en función de la distancia que las separa. El estudio se ha hecho para tres tipos de cementos con la misma relación líquido/polvo de 0,35 mL.g⁻¹. Más precisamente, estos tipos son cemento F, cemento C, cemento C autoclavado. La Tabla 5 presenta todos los parámetros de estas rectas y los valores de potencial zeta calculados con ellos.

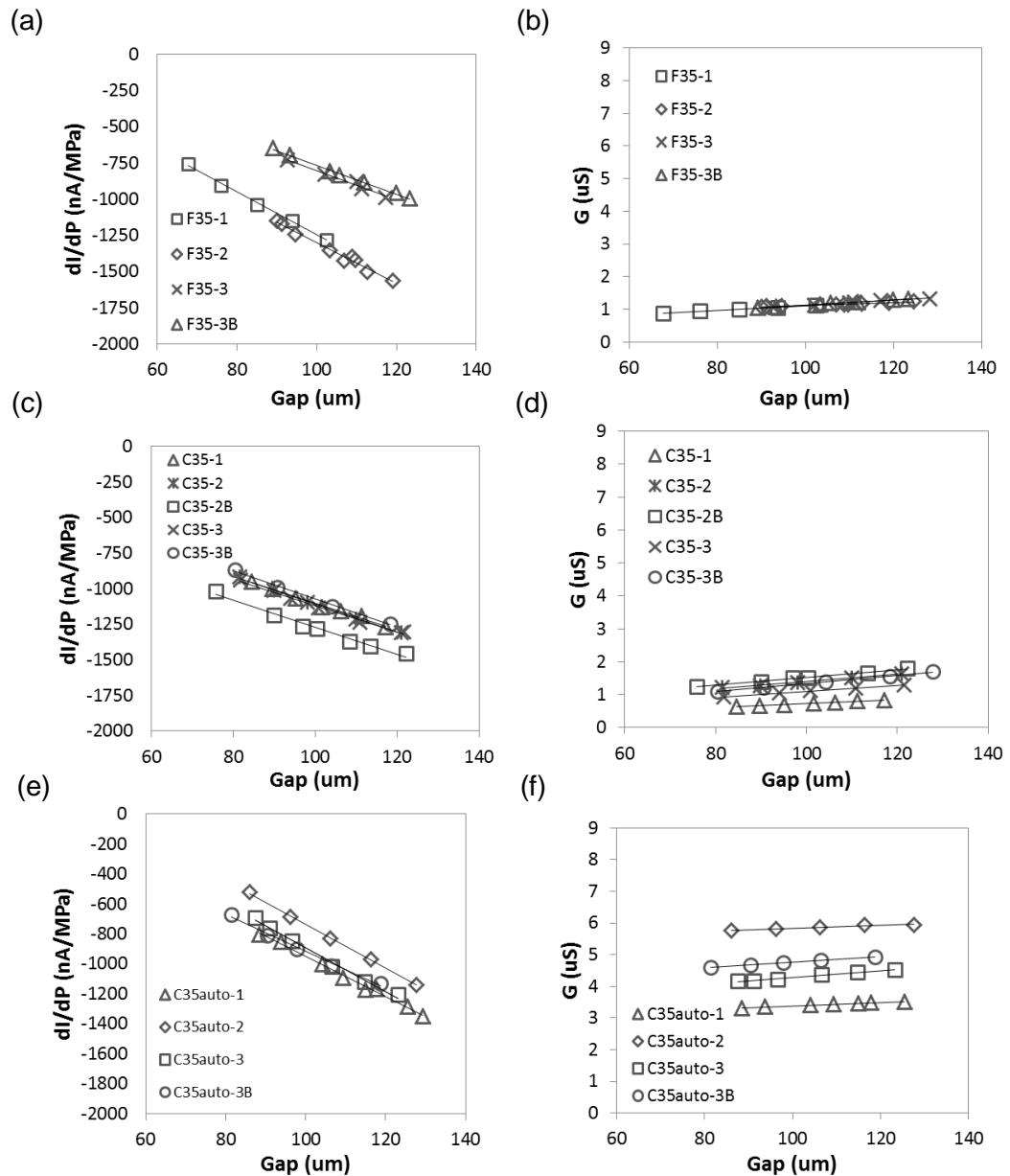


Figura 32: Rectas de corriente de flujo y conductancia en función de la distancia entre las muestras para F35 (a,b), C35 (c, d) y C35 autoclavado (e, f) cuyos parámetros son usados para las próximas comparaciones.

Se observa que las muestras autoclavadas presentan valores de conductancia en función de la distancia entre las muestras más elevados que las no autoclavadas.

nombre muestra	dl/dP vs gap			Cond. vs gap		ζ_{ext} (mV)	ζ_{int} (mV)
	offset (nA/MPa)	pendiente (nA/(MPa.μm))	R ²	conductancia (μS)	R ²		
F35-1	233	-14,8	0,9964	0,43	0,9954	-35,73	9,92
F35-2	99	-14	0,9827	0,67	0,9657	-33,80	2,66
F35-3	215	-10,2	0,98	0,42	0,9805	-24,62	9,35
F35-3B	235	-10	0,9963	0,29	0,9955	-24,14	14,78
C35-1	-160	-9,43	0,9915	0,11	0,9994	-22,76	-26,10
C35-2	-123	-9,87	0,997	0,29	0,9958	-23,83	-7,63
C35-2B	-323	-9,5	0,9831	0,34	0,9943	-22,93	-17,15
C35-3	-190	-9,31	0,9911	0,20	0,999	-22,47	-17,37
C35-3B	-80	-9,92	0,9961	0,10	0,9996	-23,95	-15,25
C35auto-1	386	-13,4	0,9942	2,83	0,9843	-32,35	2,47
C35auto-2	731	-14,7	0,999	5,39	0,8937	-35,49	2,45
C35auto-3	563	-14,6	0,9905	3,19	0,9823	-35,24	3,19
C35auto-3B	313	-12,3	0,9909	3,92	0,9994	-29,69	1,45

Tabla 5: Datos obtenidos de cada recta de la Figura 32 y cálculos derivados con los resultados de potencial Z de los diferentes cementos.

La Figura 33 agrupa los resultados calculados a partir de los parámetros de las rectas de los gráficos precedentes donde se pueden ver las similitudes y diferencias inducidas por las diferentes microestructuras.

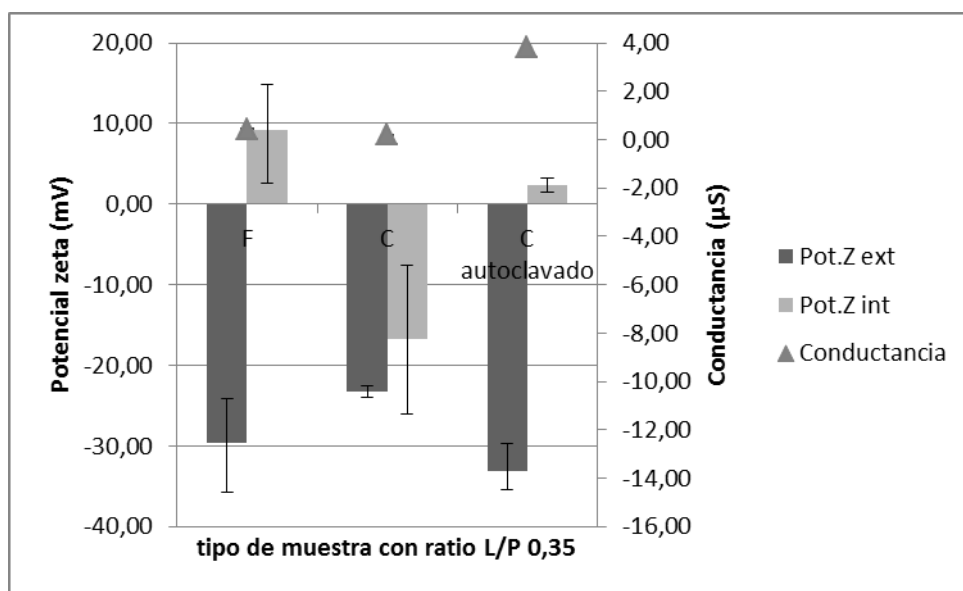


Figura 33: Potencial zeta externo e interno y conductancia en función del tipo de cemento para la relación líquido/polvo 0,35.

Los valores de conductancia para cementos autoclavados son más elevados que para cementos fraguados a 37°C. Todos estos cementos presentan un potencial zeta externo negativo inferior a -20 mV. Las muestras C tienen un potencial zeta interno negativo al contrario de los dos otros cementos presentados. Aunque ya se ha explicado que la presencia de fases solubles puede alterar los valores de potencial Z debido a la adsorción de iones, esto no explica el cambio de signo entre la muestra F y la C, fraguadas a 37°C, que están compuestas de hidroxiapatita únicamente.

Para explicar las variaciones en el signo de la carga de superficie entre estos dos cementos (C y F), es importante tener en cuenta la naturaleza de los cristales de hidroxiapatita. La HA tiene una estructura hexagonal y se sabe que la carga de las caras laterales de la red hexagonal de hidroxiapatita no es la misma que la de las caras superior e inferior por causa de los átomos que exhiben. Las caras hexagonales son negativas y las prismáticas son positivas [37]. Así, una posible hipótesis para explicar el cambio en el signo podría ser que en el interior y exterior del cemento hay diferente proporción entre caras laterales y hexagonales según como crezca y se disponga el cristal (Figura 34).

Esta organización, como la forma final de los cristales, va a depender de cómo se dispongan las redes de hidroxiapatita en los cristales tal y como se representa en la Figura 34.

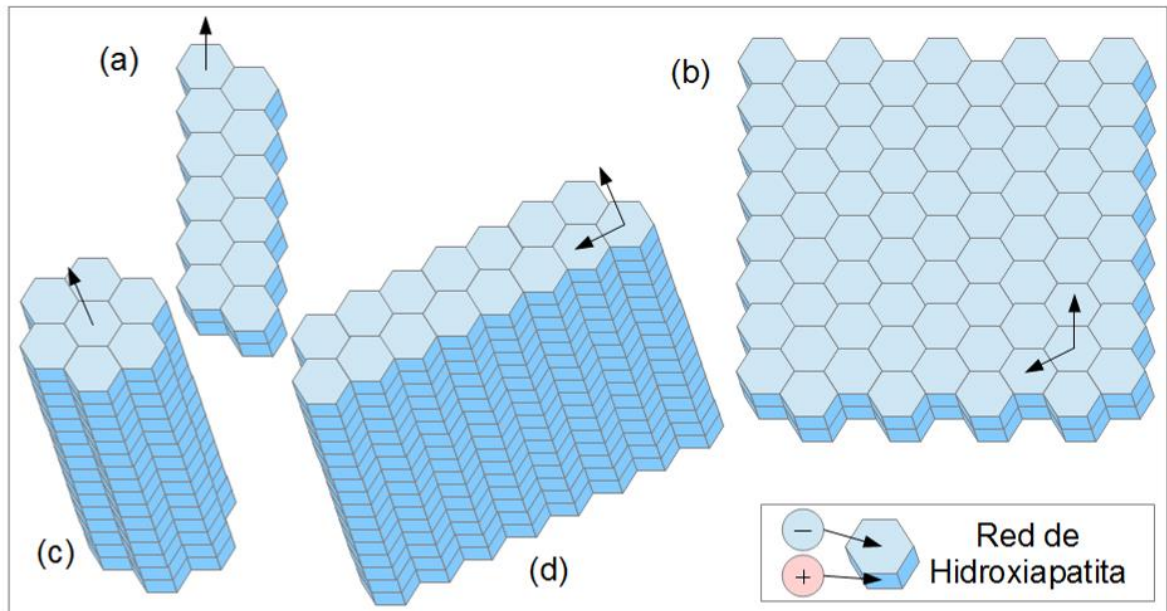


Figura 34: Representaciones de crecimiento posible de cristales en función de los ejes de desarrollo preferidos. Distingas morfologías de los cristales se representan en los esquemas a, b, c y d.

La microestructura al SEM de la superficie de los cementos de hidroxiapatita muestra cristales en forma de agujas para las muestras F y en forma de placas para las C. Un

artículo publicado por el grupo de investigación del BIBITE [24] explica la influencia de la granulometría del polvo de α -TCP sobre la microestructura de la manera siguiente. La granulometría del polvo de α -TCP más fina (F) presenta una superficie específica disponible para reaccionar más grande lo que favorece la disolución de este polvo obteniéndose un grado de supersaturación muy elevado. A su vez esta supersaturación favorece la creación de numerosos núcleos pero evita su crecimiento dando lugar a una red de cristales en forma de agujas. Con el polvo de mayor granulometría, el C, el grado de supersaturación es inferior lo que causa la formación de menos núcleos pero favorece el crecimiento de placas mayores.

Las diferencias observadas en potencial zeta entre los materiales F y C podrían pues explicarse en relación a la disposición de las caras cristalográficas en cada uno de los cristales. Según la Figura 34, las agujas en el cemento F crecerían según el esquema c y las placas del cemento C según el esquema b.

5 Conclusiones

Se deduce de la preparación de cementos de hidroxiapatita con varias microestructuras y porosidades y el posterior estudio de su carga superficial las conclusiones siguientes.

Respecto a la preparación de los cementos de hidroxiapatita, variaciones en el grado de supersaturación del polvo de α -TCP controlado por su granulometría (C y F) y por las condiciones de fraguado (37°C vs autoclave) provocan la formación de cristales con tamaño y forma diferentes. Cementos C fraguados en el autoclave a la temperatura de 120°C y presión de 1 bar, presentan un tamaño de cristales inferior a los cementos fraguados a 37°C. Los cementos C autoclavados tienen cristales en forma de pequeñas placas nanométricas alargadas, de tamaño similar al de los cristales en forma de agujas de los cementos F fraguados a 37°C, mientras que los cementos C fraguados a 37°C presentan cristales en forma de placas sub-micrométricas.

Los valores de potencial zeta externo para ambos tipos de cristales son negativos. Los cementos con cristales sub-micrométricos tienen un potencial zeta externo negativo alrededor de -23 mV. En el caso de las dos microestructuras nanométricas el potencial zeta externo es negativo también, oscilando entre -20 y -35 mV. Con respecto a los valores de potencial zeta interno, los cristales sub-micrométricos continúan dando (en general) valores negativos mientras que los nanométricos (en forma de placas o de agujas) son positivos.

La variación de la relación líquido/polvo en los cementos fraguados a 37°C tiene poca influencia en la microestructura de la superficie de las muestras pero cambia su porosidad interna lo que afecta a los valores de potencial zeta interno: son menos negativos con el aumento de la porosidad. En el caso de los cementos autoclavados la variación en la relación líquido/polvo no afecta significativamente la porosidad y tampoco los valores de potencial zeta.

Aunque se ha demostrado que la porosidad es un parámetro muy relevante en la evaluación de la carga superficial de los materiales, el tiempo limitado de este trabajo no permitió estudiar de forma exhaustiva el efecto de este parámetro en los cementos F que hubiera sido muy útil en la interpretación y validación de los resultados.

6 Costes y evaluación medioambiental

Esta parte presenta una estimación de los principales costes y del impacto medioambiental y social de este proyecto.

6.1 Costes

6.1.1 Coste total

La Tabla 6 presenta el coste total estimado de este proyecto.

tipo de gasto	coste (€)
material	529,37
Equipamiento	9968,00
Personal	13940,00
coste total del proyecto	24437,37

Tabla 6: Coste total del proyecto

El detalle de los diferentes costes es presentado en las siguientes partes.

6.1.2 Coste de los materiales

La Tabla 7 presenta el coste total estimado de los principales materiales.

tipo de gasto	coste (€/g o L o m ²)	coste (€)
CaHPO ₄	0,17	89,40
CaCO ₃	0,47	91,56
Hoja de Teflón	16,67	6,00
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (HO) ₂	0,02	0,25
KCl	0,15	10,35
Na ₂ HPO ₄	0,06	0,61
Agua destilada	2,00	40,00
Agua milliQ	3,50	280,00
MeOH	56,00	11,20
coste total de los materiales		529,37

Tabla 7: Coste total de los materiales

6.1.3 Coste del equipamiento

La Tabla 8 presenta el coste total estimado del equipamiento.

tipo de gasto	coste (€/h)	coste (€)
SurPASS	30	9000
SEM	36	360
	coste (€/muestra)	coste (€)
DRX	7	28
Porosimetria de mercurio	145	580
coste total de equipamiento		9968

Tabla 8: Coste total del equipamiento

6.1.4 Coste del personal

La Tabla 8 presenta el coste total estimado del personal.

tipo de gasto	coste (€/h)	coste (€)
Tutora	70	3500
Técnico	45	315
Estudiante	15	10125
coste total del personal		13940

Tabla 9: Coste total del personal

6.2 Evaluación medioambiental y social

Este proyecto tiene un gran impacto medioambiental y social. Puesto que este trabajo está centrado en la caracterización de materiales que se usan para aplicaciones biomédicas el impacto social es muy elevado y positivo.

Es importante mencionar que el protocolo para la síntesis de los reactivos y la preparación de los cementos fue pensado para tener el menor impacto medioambiental posible. Los principales reactivos usados y los productos fabricados durante este proyecto no son peligrosos para el medio ambiente y las reacciones no producen productos secundarios. Además, la hidroxiapatita, principal producto del proyecto, es un material inerte y fácil de reciclar.

Sin embargo, no se puede llevar a cabo este proyecto sin ningún tipo de contaminación. Por un lado, para reducir el impacto de los residuos, todos los restos se desecharon

siguiendo el protocolo de clasificación del BIBITE, separados según su naturaleza. Por otro lado, el consumo energético sería el punto que puede provocar la contaminación mayor. En efecto, todos los aparatos usados tienen un consumo no despreciable de electricidad. Además, los tratamientos térmicos necesarios se realizaban con temperatura hasta 1400°C.

Con respecto al impacto en la salud, se trabajó en campana cuando se hizo necesario el uso de disolventes como el Metanol y Tolueno cuyas emanaciones son tóxicas.

7 Agradecimientos

Quisiera agradecer a Dra. Maria Pau Ginebra para permitirme realizar este proyecto en las mejores condiciones.

Agradezco muy especialmente Montserrat Espanol que estaba todo el tiempo disponible para responder a mis preguntas y dirigirme en la buena dirección. Doy las gracias también a Anna por su ayuda en algunas fases de manipulación necesarias a este proyecto y Sandra para darme tan fácilmente y regularmente acceso al SEM.

Por fin, un último agradecimiento a toda la gente con la que compartí el equipamiento de los diferentes laboratorios en los que trabajé.

8 Referencias

- [1] Sergey V. Dorozhkin “*Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties*” J. Materials and Chemistry (2011): 1-48
- [2] Javier Gomez Del Rio, Paula Sanchez, Pedro J. Morando, Daniel S. Cicerone “*Retention of Cd, Zn and Co on hydroxyapatite filters*” Chemosphere 64 (2006): 1015–1020
- [3] Jhon Jairo Torres Ríos “*Anatomía del sistema óseo*” [<http://www.monografias.com/trabajos83/anatomia-del-sistema-oseo/anatomia-del-sistema-oseo.shtml>, 10 de diciembre de 2014]
- [4] Antonio Bernabé Salazar, José Antonio Navarro Cámara y Francisco José Pallarés Martínez “*Tejido óseo*” en “*Citología e histología veterinaria*”, Open Courseware Universidad de Murcia, 2012
- [5] “*UD2: Formas de organización de los seres vivos*” [http://recursos.cnice.mec.es/biologia/bachillerato/primero/biologia/ud02/01_02_04_02_026.html, 17 de diciembre de 2014]
- [6] “*Tejido óseo compacto*” [<http://elmercaderdelasalud.blogspot.com.es/2011/08/tejido-oseo-compacto.html>, 17 de diciembre de 2014]
- [7] Robert B. Heimann “*Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings*” Surface & Coatings Technology 233 (2013): 27–38
- [8] Luis Usquil Frisancho “*Factores que disminuyen el proceso de consolidación ósea en fracturas*” [<http://www.monografias.com/trabajos90/factores-proceso-consolidacion-osea-fracturas/factores-proceso-consolidacion-osea-fracturas.shtml>, 17 de diciembre de 2014]
- [9] Mohammad Hamdam Ali Alkhraisat “*Bioactividad de cementos fosfatos cálcicos sustituidos con estroncio y su aplicación en regeneración ósea*” Tesis doctoral, Madrid (2008): 35, 44, 46, 65, 98
- [10] Williams D.F. “*The Williams Dictionary of Biomaterials*” Liverpool, UK: Liverpool University Press (1999): 40

- [11] Wanpeng Cao, Larry L. Hench “*Bioactive materials*” Ceramics International 22 (1996): 493-507
- [12] Marco Antonio Velasco Peña, Diego Alexander Garzón Alvarado “*Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión*” Revista Cubana de Investigaciones Biomédica 29 (2010): 140-154
- [13] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine (2012)
- [14] Mar Fernández Gutiérrez “*Tema 3: interacciones biológicas en la superficie del biomaterial*”
- [15] Shuilin Wu , Xiangmei Liu, Kelvin W.K. Yeung, Huan Guo, Penghui Li, Tao Hu, C.Y. Chung, Paul K. Chu “*Surface nano-architectures and their effects on the mechanical properties and corrosion behavior of Ti-based orthopedic implants*” Surface & Coatings Technology 233 (2013): 13-26
- [16] Eric M. Rivera-Muñoz “*Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization*” Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges (2011): 75-99
- [17] Margarita Victoria García-Garduño, José Reyes-Gasga “*La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación*” Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 9, núm. 2 (2006): 90-95
- [18] S. Medina Macía, M. Mrales Doreste, R. Navarro García, E. Pérez García, P. Erdocia Eguia, A. Hernández Lecuona “*Osteoconducción en implantes*” 14” Jornadas canarias de traumatología y cirugía ortopédica, (2000): 32-33
- [19] Marta Elena Londoño, Alejandro Echavarría, Francenith De La Calle “*Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas*” Revista EIA (2006): 109-118
- [20] Sophie Cazalbou, Christèle Colombes, Diane Eichert and Christain Rey “*Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates*” J. Materials Chemistry (2004)
- [21] Marta Elena Londoño, Alejandro Echavarría, Francenith De La Calle “*Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas*” Revista EIA (2006): 109-118

- [22] D. Perie “*Preparación y caracterización de hidroxiapatitas substituidas con silicio obtenidas por mecano-síntesis*” Tesis doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya (2005)
- [23] J.J. Morales de Cano, A. García Ruzafa, J.A Planell Estany, M.P. Ginebra Molins, M. Driessens, J.A. Hernández Hermoso, “*Estudio de un cemento bioactivo de hidroxiapatita como material de substitución ósea*” Biomecánica, 10 (2002): 19-24
- [24] M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, “Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis” Biomaterials 25 (2004): 3453–3462
- [25] Bohner M. “*Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*” Injury (2000): 37-47.
- [26] Silvia Alejandra Ahualli, “*Propiedades electrocinéticas de suspensiones coloidales concentradas*” Tesis doctoral, Granada (2008).
- [27] Luciano Sandoval Yoval, Leticia Montellano Palacios, Martín Piña Soberanis y Laura Olivia, Sánchez Guzmán, “*Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer*” (2000) [<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/tratagua/mexicona/R-0150.pdf>, el 30 de enero de 2015]
- [28] Thomas Luxbacher, The ZETA Guide, Principles of the streaming potential technique, Anton Para GmbH (2014)
- [29] Andriy Yaroschuck, Thomas Luxbacher “*Interpretation of Electrokinetic Measurements with Porous Films: Role of Electric Conductance and Streaming Current within Porous Structure*”, Langmuir (2010)
- [30] Pilar Fernández Ibáñez, “*Propiedades coloidales de partículas de TiO₂: Aplicación al tratamiento fotocatalítico solar de aguas*” (2003)
- [31] M. Espanol, G. Mestres, T. Luxbacher, M.P. Ginebra “*The Role of Porosity on the Z-Potential of Calcium Phosphate Cements*” 26th European Conference on Biomaterials, Liverpool, 31st August – 3rd September 2014
- [32] “*Descripción de la Técnica MEB*” [<https://investigaciones.uniandes.edu.co/index.php/es/centro-de-microscopia/microscopio-electronico-de-barrido-meb/descripcion-de-la-tecnica-meb>, el 27 de octubre de 2014]

- [33] “*Microscopio electrónico de barrido (MEB, SEM)*”
[<http://www.upc.edu/sct/es/equip/714/microscopio-electronico-barrido-meb-sem.html>, el 27 de octubre de 2014]
- [34] Javier Alonso Rodríguez, “*Porosimetría por inyección de mercurio*” (2002)
- [35] M. Espanol, R.A. Perez, E.B. Montufar, C. Marichal, A. Sacco, M.P. Ginebra
“Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications” Acta Biomaterial 5 (2009): 2752-2762
- [36] Mark E. DRY y Ralph A. BEEBE “*Adsorption studies on bone mineral and synthetic hydroxyapatite*” (1960): 1300-1304
- [37] Kazuhiko Kandori, Aya Fudo, Tatsuo Ishikawa, “*Study on the particle texture dependence of protein adsorption by using synthetic micrometersized calcium hydroxyapatite particles*”, Colloids and surfaces: Biointerfaces 24 (2002): 145-153.

