

Caracterización de Hidroxiapatita por Difracción de Rayos X obtenida a partir de carbonato de calcio y fosfato de potasio monobásico.

*Characterization of Hydroxyapatite by X-Ray Diffraction obtained from calcium
carbonate and monobasic potassium phosphate.*

Elaborado por:

Carlos Germán Laverde Plazas	20062135045
Ivan Dario Ardila Martinez	20062135004

Monografía de Investigación



Universidad Distrital Francisco José de Caldas
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
Licenciatura en Física

Bogotá, 2016

Universidad Distrital Francisco José de Caldas

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

Pasantía de investigación presentado como requisito final para optar por el título de licenciados en física.

Elaborado por:

Ivan Dario Ardila Martinez	20062135004
Carlos Germán Laverde Plazas	20062135045

Director
Julian Salamanca
Director
Alfonso Leyva
Director
Gonzalo Sequeda



Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos a nuestros Directores de trabajo de grado: José Alfonso Leyva Rojas, Luis Gonzalo Sequeda Castañeda y Julián Andrés Salamanca Bernal, quienes con su apoyo y dedicación fueron vitales en el desarrollo de esta investigación que fue la base para esta monografía en la modalidad de PASANTIA DE INVESTIGACIÓN en la Pontificia Universidad Javeriana dentro del programa de MOVILIDAD del convenio entre la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y la Pontificia Universidad Javeriana

Al grupo de Biofísica, Bioquímica Estructural del departamento de Física y al Grupo de Investigación Físicoquímica de la Universidad Javeriana del departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana, por el apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo. De igual manera queremos agradecer a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana y Banco Santander por la financiación de este trabajo a través de los proyectos: PROTOTIPADO DE UN ANDAMIO DE MICROESFERAS DE SILICIO Y MATRIZ DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA PARA REGENERACIÓN ÓSEA EN ODONTOLOGÍA - ID 6387. (Financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana) y ELABORACIÓN DE UN BIOMATERIAL DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA MODIFICADO CON PLASMA RICO EN FIBRINA PARA FUTURA REGENERACIÓN DE LIGAMENTO PERIODONTAL- ID 6559. (Financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana y Banco Santander).

Finalmente queremos agradecer a Andrés Rubén Barón Aldana, Ingeniero en Instrumentación Electrónica, asistente de laboratorios de física en la uni-

versidad Distrital Francisco José de Caldas, por su apoyo en la toma de datos y asistencia en el manejo del equipo de difracción de rayos X.

Resumen

El presente trabajo de investigación trata acerca de los procesos de elaboración y caracterización de cristales de Hidroxiapatita (HAp) y del proceso de obtención mediante materiales de bajo costo. En la actualidad la Hidroxiapatita (HAp) es utilizada ampliamente en campos de estudio como la bioingeniería, medicina y odontología por sus propiedades de biocompatibilidad, oseointegración y bioactividad.

Por esta razón hemos desarrollado este trabajo de investigación para poder observar su funcionalidad y propiedades mecánicas y poder evidenciar mediante un exhaustivo proceso de elaboración la composición de este biomaterial.

Abstract

This work discusses research on the processes of elaboration on and characterization of crystals on Hydroxyapatite (HAp) is widely used in fields of study such as bioengineering, medicine and dentistry for its properties of biocompatibility, osseointegration and bioactivity.

For this reason we have developed this research to observe their functionality and mechanical properties and be able to demonstrate through an exhaustive process of elaboration the composition of this biomaterial.

Tabla de Contenido

Agradecimientos	2
1 Problema	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Objetivo General	1
1.3 Objetivos Especificos	1
1.4 Introducción	1
1.4.1 Método Polvo	3
1.4.2 Geometría del Polvo	5
1.4.3 Método de Von Laue	7
2 Fundamentación Teórica	12
2.1 Hidroxiapatita	12
2.2 Síntesis de Hidroxiapatita	13
2.2.1 Método Humedo	15
2.2.2 Método Químico	15
2.2.3 Método de Sol-Gel	16
2.3 Difracción de rayos X (<i>XRD</i>).	17
2.3.1 Ley de Bragg	17
3 Desarrollo Experimental	22
3.1 Metodología Experimental	22
3.1.1 Obtención de Hidroxido de Calcio	22
3.1.2 Obtención de HAp a partir de hueso bovino	23
3.1.3 Proceso hidrotermal	23
3.1.4 Síntesis Por Combustión	24
4 Análisis de Datos Y Resultados	25

Capitulo 1

Problema

Fortalecimiento biomecánico de hidroxiapatita (Hap), $(Ca_{10}(PO_4)_{10}(OH)_2)$ con microesferas de silicio para regeneración ósea en implantes dentales.

1.1 Objetivos

1.2 Objetivo General

Sintetizar Hidroxiapatita biológica (Hueso bovino) y refortalecimiento biomecánico apartir de Silicio (SiO_2).

1.3 Objetivos Especificos

- Obtención de Hidroxiapatita (Hap) apartir de la calcinación y sinterización de hueso bobino, además obtención por precipitación química convencional.
- Evaluar las características físicas del material obtenido de la calcinación y precipitación química convencional por medio Difracción de rayos X (XRD).

1.4 Introducción

En la actualidad los biomateriales constituyen un avance importante en los implantes y recubrimientos óseos y la HAp es uno de los bioceramicos que se emplea para realizar los implantes tanto en sustitutos óseos como en la parte dental gracias a su bioactividad, composición química similar y su forma

cristalográfica.

Por tal razón la demanda y la necesidad de crear un sustituto óseo que sea idóneo además de efectivo ha hecho que se realicen estudios e investigaciones con compuestos de fácil acceso y a su vez de bajo costo, pero una de las limitaciones que tiene este biocerámico es su fragilidad poca resistencia mecánica y su baja cantidad en la que se presenta, por tal motivo se realizan diferentes dopajes con distintos elementos como *Ti* o *Si*.

En el presente trabajo se realizó una serie de tratamientos empleando micro esferas de silicio, con el fin de mejorar su estructura cristalina y con esto brindar más fuerza al andamio de HAp y elevar su resistencia mecánica.

Otro inconveniente que se presenta al realizar un implante es que requiere de un injerto o implante con sustituto óseo en algunos casos hueso autógeno “hueso del mismo paciente” o hueso alogénico “hueso de cadáver” pero se corre el riesgo de rechazo por el paciente así como la presencia de infecciones [1].

Por este motivo se busca poder crear recubrimientos biocerámicos a base de (HAp) puesto que es el material inorgánico que se presenta en el hueso mineral y gracias a sus características biológicas es una de las mejores opciones en los estudios biomédicos y odontológicos para realizar diferentes tipos de implantes[2].

En los estudios actuales este material es empleado tanto de la industria farmacéutica como en la medicina y odontología, se realizan implantes con recubrimiento de (HAp) reforzados con distintos materiales como también en implantes dentales, al momento de usar este compuesto se busca que se pueda adherir al tejido sin ningún inconveniente y que presente un módulo de elasticidad adecuado y resistencia mecánica adecuada como una aceptación a los fluidos corporales [3].

Las investigaciones recientes muestran que es posible obtener (HAp) mediante cáscaras de huevo por su gran concentración de calcio (*Ca*) [4] por su bajo costo y fácil acceso debido a que algunos materiales deben ser importados o tiene un elevado costo.

Es como en este trabajo de investigación se muestra la producción de hidroxipatita a base de cáscaras de huevo con un costo económico asequible[5], para brindar un aporte a los avances de prótesis dentales y de esta manera

tener un impacto positivo en la parte social y científica.

Posteriormente se realizaron las correspondientes caracterizaciones de los polvos mediante la aplicacin de difracción de rayos X (DRX) para poder identificar las mejores fases tanto de exposición como de envejecimiento, y así poder tener un punto de partida para identificar las mejores opciones en las cuales sea posible implementar la Hap con mayores porcentajes en cristalinidad[6], fuerza mecánica y biocompatibilidad.

1.4.1 Método Polvo

La difracción de rayos X permite en gran medida analizar los diversos componetes que caracterizan un cristal, el cual se ha realizado desde el siglo XIX iniciando con P. Debye y P. Scherer (1916) y simultaneamente por A. W. Hull en los Estados Unidos[7]. Por consiguiente, esta técnica es de vital importancia en el desarrollo de esta investigación ya que permite identificar las fases cristalinas del polvo analizar.

Por lo tanto, para analizar los diferentes aspectos de la difracción de rayos X es necesario definir las generalidades que estan presentes en dicho fenómeno. Asi pues, cuando se tiene un cristal se debe considerar como un sólido compuesto de átomos o moléculas ordenadas, las cuales se organizan en repetición de tres dimensiones, es decir en el espacio. Sin embargo, no todos los critales se organizan de forma isotrópica tal es el caso de un simple vidrio.[8], Para visualizar de manera mas clara este aspecto se habla de una red espacial, **Fig. 4.4**.

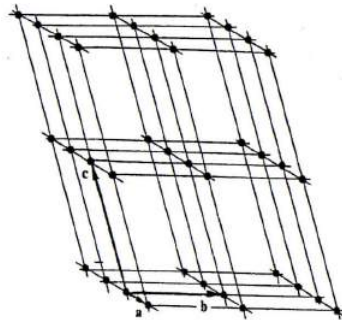


Fig. 4.4 Red Espacial

[7] La red espacial es una red tridimensional la cual considera un punto de una serie de traslaciones, definidas por vectores a, b, c , ahora si se toma como partida el punto de origen, las cordenadas están dadas por $pa + qb + rc$ donde p, q, r son números enteros cuales quiera en el rango $(-\infty, \infty)$, pero

si se toma un punto diferente al origen se tiene las siguientes coordenadas $t = Pa + Qb + Rc$ lo cual indica que los puntos respecto al nuevo origen estan dados por:

$$(p - P)a + (q - Q)b + (r - R)c = p'a + q'b + r'c$$

donde p', q', r' son igualmente números enteros.

Por lo tanto, para distinguir las principales características u organizaciones se implementan parámetros cristalográficos de la siguiente manera, **Fig. 4.5** [7]:

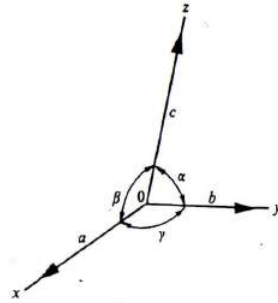


Fig. 4.5 *Parámetros Cristalográficos*

Al igual se hace necesario evidenciar las principales relaciones axiales y angulares de los sistemas cristalinos, representados en la siguiente **Tabla 4.1**, [7]:

Relaciones axiales y angulares de los sistemas cristalinos

Sistema	Relaciones axiales y angulares	Figura representativa más simple
Triclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	Paralelepípedo general
Monoclínico (*)	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	Paralelepípedo oblicuo
Ortorrómico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Paralelepípedo rectangular
Trigonal (Puede ser considerado como una subdivisión del hexagonal)	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$ (Ejes romboédricos) $a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ (Ejes hexagonales)	Romboedro Prisma hexagonal
Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Prisma rectangular
Hexagonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	Prisma hexagonal
Cúbico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Cubo

Tabla 4.1 (*) Otra alternativa de los ejes en este sistema es: $a \neq b \neq c$,
 $\alpha = \beta = 90^\circ \neq \gamma$

Sin embargo, como en esta investigación no se tiene exactamente un cristal, sino se tiene un polvo al cual se le realizara la técnica de Difracción de rayos X se hace necesrio e indispensable vincular la geometría del polvo la cual se desarrollara a continuación.

1.4.2 Geometría del Polvo

Para realizar este estudio se debe tener presente que se desarrollan dos técnicas experimentales: radiación monocromática y organización estructural del polvo, esta última hace referencia a que el polvo este bien extendido en el soporte para que realice la función de un "cristal" para que produzca análogamente la difracción, y no permita que haya otra orientación no deseada dado que la muestra es cuerpo "isotrópico".[9] En la aplicación del método de difracción se experimenta una múltiple rotación tridimensional en el espacio elegido, tal como se muestra en la **Fig. 4.6**[7] :

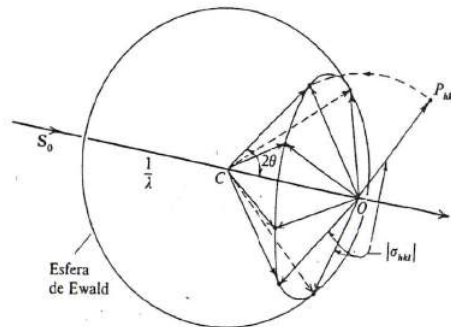


Fig. 4.6 En un polvo policristalino ideal el vector recíproco σ_{hkl} puede considerarse que está desorientado al azar en todas las direcciones del espacio, como si hubiera experimentado una rotación tridimensional y continua al rededor del origen O de la red recíproca el lugar geométrico de los puntos recíprocos correspondientes, P_{hkl} es una esfera de radio $|\sigma_{hkl}|$. La intersección de esta esfera con la esfera de Ewald es una circunferencia, por cuyo perímetro pasarán los rayos reflejados en el polvo cristalino real, situado en el centro C ; el resultado es la formación de un cono de radiación reflejada semiángulo 2θ y coaxial con la dirección S_0 .

Por lo tanto, en el esquema anterior se considera el vector recíproco σ_{hkl} el lugar geométrico de una esfera de radio $|\sigma_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}}$ sobre los puntos P_{hkl} , además, los rayos poseen como de difracción respecto a C con un semiángulo (2θ). Por consiguiente, se presenta que el efecto de difracción total produce una serie de rayos reflejados, coaxiales con relación al rayo incidente, como se visualiza en la **Fig. 4.7** [7]:

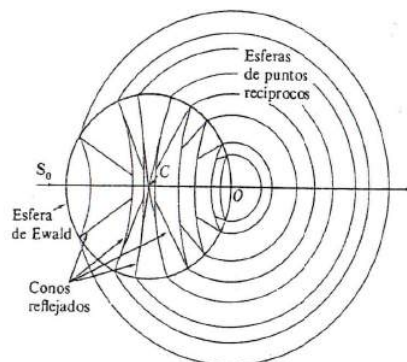


Fig. 4.7 Serie de esferas de puntos recíprocos concéntricas con el origen de la red recíproca, O , en la cual se forman conos con ángulos variables con la dirección S_0 entre $2\theta = 0$ (en la dirección positiva de S_0 y $2\theta = 180^\circ$ (en la dirección negativa).

Sin embargo, al hacer referencia al proceso de difracción de rayos X en un cristal se debe realizar dos procesos muy relevantes, el Método de Von Laue y la ley de Bragg [10], que se haran más explicitos a continuación.

1.4.3 Método de Von Laue

Al realizar un choque de rayos X en un arreglo de átomos paralelos se, **Fig. 4.8** se crea una dispersión la cual forma dos ángulos el ϕ_2 referente al rayo incidente y Ψ_2 relacionado con la dispersión, además de un espacio en b ,

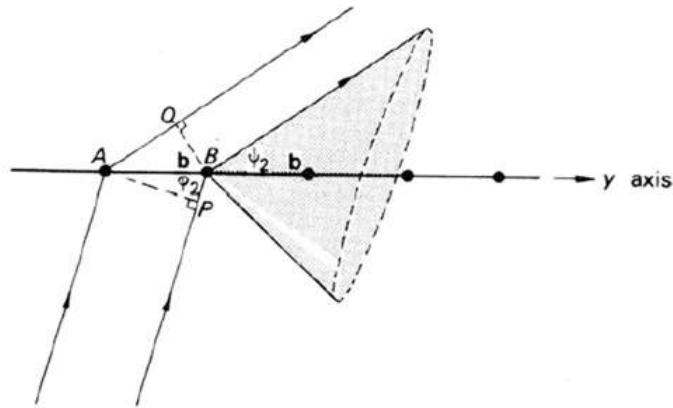


Fig. 4.8 Difracción de una línea de dispersión de centros a lo largo de b en el eje y en la cual se genera un cono.

Ahora, analizando la **Fig. 4.8** se tiene que $AQ - BP$ o $b(\cos\Psi_2 - \cos\phi_2)$ donde la diferencia debe ser igual al número de onda así:

$$b(\cos\Psi_2 - \cos\phi_2) = k\lambda \quad (1.1)$$

Debido a que cuando hay dispersión de rayos X sobre un cristal se describe en términos de la intensidad de la función dispersión y ángulo de dispersión.

Por consiguiente, para hacer más lógico esta explicación se toma, se puede tomar un ejemplo clásico,[11] cuando se hace el estudio de dispersión de rayos X de un electrón, se dice que este emite una onda electromagnética lo cual indica que se hace una dispersión talque el haz incidente emitido por el electrón tiene la misma longitud de onda y frecuencia debido a que el rayo incidente es coherente con la dispersión **Fig. 4.9**, es decir, se tiene una dispersión $(\lambda/2)$ que es la que se evidencia al hacer la difracción de rayos X en un cristal, lo cual indica que se tiene una relación directa entre el haz que se dispersa y el haz incidente.

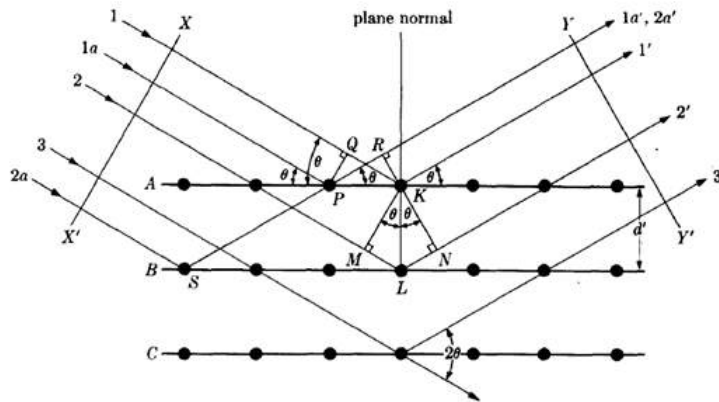


Fig. 4.9 Difracción de rayos X para un Cristal

Además, cuando incide sobre un electrón se puede llegar a una relación del plano con el rayo monocromático entre la amplitud Ψ_0 del haz incidente de la onda y la constante f proporcional con el haz reflejado ϕ , así:

$$\Psi = f\Psi_0$$

Por tanto, cuando se hace una dispersión por ejemplo, de dos electrones [10], donde se quiere determinar la fase dada la **Fig. 4.10**.

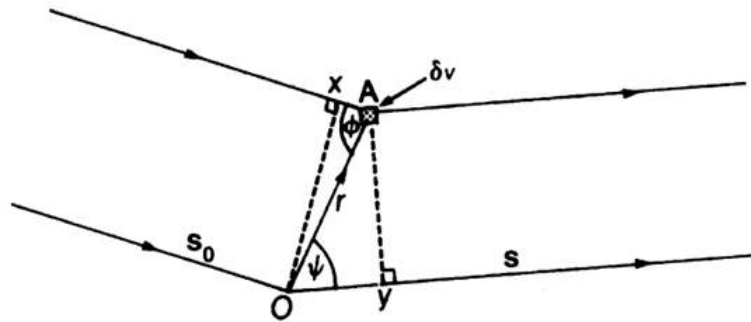


Fig. 4.10 Difracción de rayos X para un Cristal

Así pues, la diferencia de un punto P , donde OP es mayor que OA donde se dispersaron los electrones, lo cual indica que $OY - AX$; por lo tanto, la diferencia de fase ϕ es $(2\pi/\lambda)\delta$, lo que indica que,

$$\phi = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)(OY - AX)$$

Si se tiene que OA es $|r|$ la difracción de donde se puede inferir por vectores unitarios s_0 y s , tal que $AX = r - s_0$ y $OY = r - s$, por tanto,

$$\phi = 2\pi \left(\frac{r \cdot s - r \cdot s_0}{\lambda} \right) = 2\pi r \left(\frac{s}{\lambda} - \frac{s_0}{\lambda} \right) = 2\pi r \cdot S$$

donde el vector S es normal al plano y se convierte en la reflexión al plano O , por ende,

$$S = |s - s_0| \lambda \quad (1.2)$$

donde

$$|S| = S = \frac{2s \sin \theta}{\lambda}$$

Por tanto, la ec. (1.1) se convierte,

$$b(\cos \Psi_2 - \cos \phi_2) = k\lambda = b \cdot s - b \cdot s_0$$

y utilizando la ec (1.2), se obtiene:

$$b \left(\frac{s - s_0}{\lambda} \right) = b \cdot S = k \quad (1.3)$$

Por consiguiente, la **Fig. 4.10** hace relación a los ángulos Ψ y ϕ se evidencia una serie de conos de orden k ($k = 0, 1, 2, 3, \dots$) de allí la **Fig. 4.11**.

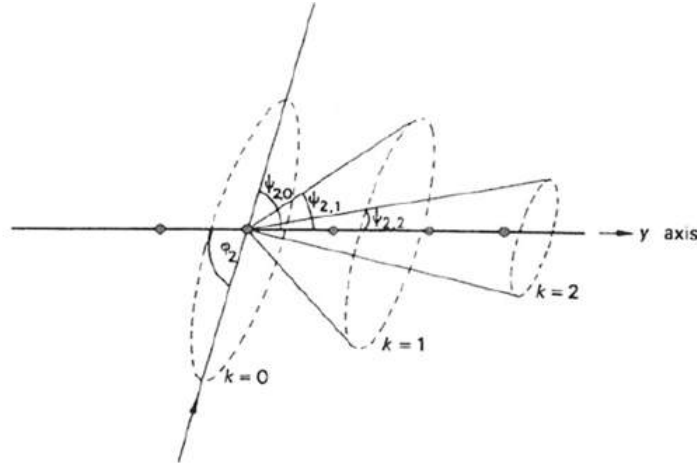


Fig. 4.11 Varios órdenes de difracción puede tener una fila de dispersión centros, para un valor dado de ϕ_2 , a valores enteros de k .

De lo cual se puede deducir que respecto a, b se tiene:

$$a \cdot \left(\frac{s - s_0}{\lambda} \right) = a \cdot s = h$$

y

$$b \cdot \left(\frac{s - s_0}{\lambda} \right) = b \cdot s = k$$

Haciendo la relación a un espacio tridimensional, es decir, a un plano de red, se obtiene las ecuaciones de Laue

$$\begin{aligned} a \cdot s &= h \\ b \cdot s &= k \\ c \cdot s &= l \end{aligned} \tag{1.4}$$

De aquí se visualizan como aspectos particulates contribuyen en gran parte a aspectos más generales como tres dimensiones que estan presentes en una red de dispersión, lo que produce que una matrix de tres dimensiones se vea involucrado la fase en un espectro de (hkl) [11], con ayuda de la **Fig. 4.12** asi,

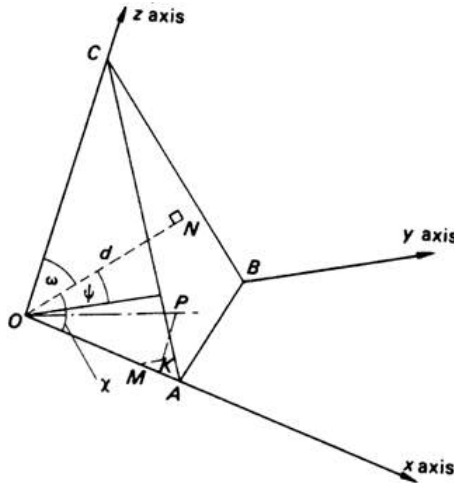


Fig. 4.12 Plano ABC en tres dimensiones del espacio que es normal al origen O

De lo cual se puede decir que respecto al plano tridimensional se tienen tres ángulos diferentes respectivamente (α, β, γ) y recordando que S equivale a $(2\sin\theta/\lambda)$, se pueden reescribir las ecuaciones (4.4), como:

$$\begin{aligned}a \cdot S &= \frac{2a \sin \theta}{\lambda \cos \alpha} = h \\b \cdot S &= \frac{2b \sin \theta}{\lambda \cos \alpha} = k \\c \cdot S &= \frac{2c \sin \theta}{\lambda \cos \alpha} = l\end{aligned}\tag{1.5}$$

Además, las direcciones adyacentes a los ángulos (α, β, γ) junto con el vector S son normales al plano, y son parte integrante del conjunto (hkl) .

Capitulo 2

Fundamentación Teórica

2.1 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (Hap), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ es el componente mas importante en la regeneración osea en los vertebrados dado que este componente es capaz de regenerarse por si mismo, además que posee una biocompatibilidad y bioactividad de diferentes biomateriales artificiales [12]. De allí nace la necesidad de un estudio formal de las diferentes características que de este material primordial de los huesos en pro de nuevas técnicas e investigaciones para el desarrollo de un mejor material en la reconstrucción ósea.

Por consiguiente, la hidroxiapatita (Hap) esta constituida primordialmente de calcio, fósforo e hidrógeno que se encuentra en dientes y huesos la cual presenta una estructura hexagonal, como se observa en **Fig. 4.1**, [13].

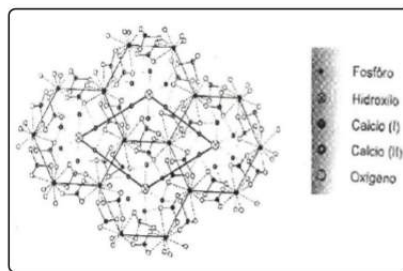


Fig. 4.1 Estructura atómica de la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita y posiciones del Ca, P, O, H.

Por lo tanto, los principales componentes de la hidroxiapatita son el calcio y el fosfato constituyentes principales de los huesos y dientes en los vertebrados.

dos. Al igual se debe visualizar la estructura jerárquica de los huesos, como se muestra en el siguiente esquema, **Fig. 4.2** [12]:

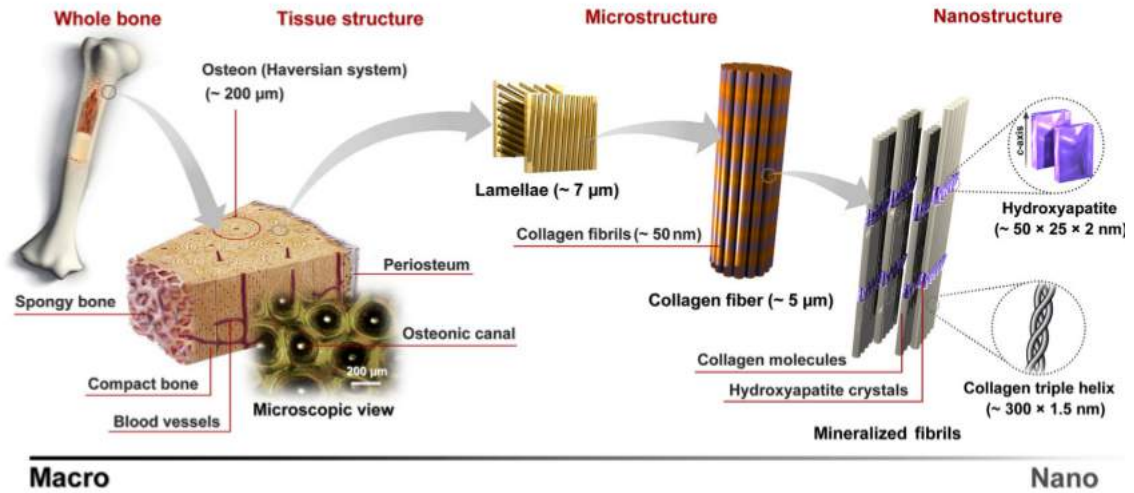


Fig. 4.2 The hierarchical structure of typical bone at various length scales. The microstructure of cortical or compact bone consists of Haversian systems (circles in cross-section and microscopic view) with osteonic canals and lamellae, and at the nanoscale, the structural framework is collagen fibers composed of bundles of mineralized collagen fibrils

El Fosfato de Calcio (*CaP*) está en la hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_{10}(OH)_2$, dado que este químico posee una fase cristalina estable. Por consiguiente, es de vital importancia en todo el estudio de la regeneración ya que es capaz de generar una osteoconducción¹, ya que este material ayuda a una gran porosidad permitiendo el desarrollo biológico de los huesos que son de gran importancia en los implantes.

2.2 Síntesis de Hidroxiapatita

En el estudio de este material se pueden visualizar muchos tratamientos para la obtención de la (*Hap*), $Ca_{10}(PO_4)_{10}(OH)_2$ y dependiendo del tratamiento se puede obtener diferentes tipos de cristales, por lo tanto los más usuales son: reacciones de estado sólido, precipitación química y síntesis hidrotermal,

¹La osteoconducción permite que los huesos tengan una gran conducción de diversos materiales en los huesos porosos, es decir, debido a su gran capilaridad permite que compuestos cercanos ayuden al crecimiento de huesos y tejido fibrovascular[12].

entre otros métodos.[13]

Por consiguiente, en el desarrollo de esta investigación se basará particularmente en la experimentación Precipitación química convencional y Combustión, por lo tanto, el primer método es un método muy práctico ya que no se trabaja con una temperatura ambiente obteniendo buenos cristales para analizar dado que la fase de CaP es estable [1], para una mayor comprensión de este método se presenta el siguiente imagen, **Fig. 4.3**:

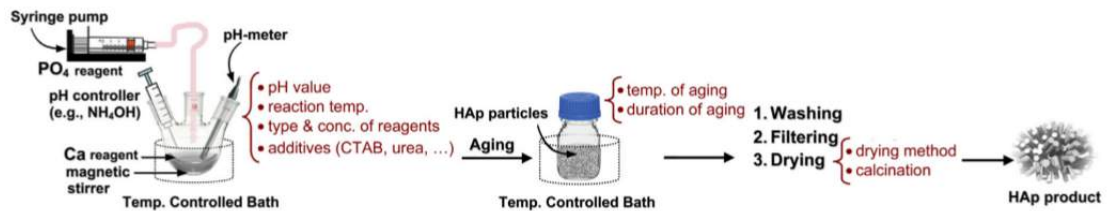


Fig. 4.3 Preparation of HAp nanoparticles via conventional chemical precipitation. [14]

Por lo tanto, como en la experiencia se encuentran numerosos métodos en la preparación de Hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_{10}(OH)_2$ como se ilustra en **Fig. 4.17**, de allí nace la necesidad de explicar más en detalles los métodos utilizados en la presente investigación.

Method	Processing aspects			Characteristics of powder				
	Number of chemicals	Cost	Morphology	Crystallinity degree	Phase purity	Ca/P ratio	Size	
Dry methods	Solid-state method	few	low	diverse	very high	usually low	variable	usually micron
	Mechanochemical method	few	low	diverse	very high	low	usually non-stoichiometric	nano
Wet methods	Chemical precipitation	frequently few	low	diverse	frequently low	variable	non-stoichiometric	usually nano
	Hydrolysis method	few	usually high	diverse	variable	usually high	stoichiometric	variable
	Sol-gel method	variable	variable	diverse	variable (usually low)	variable	stoichiometric	nano
	Hydrothermal method	variable	usually high	frequently needle-like	very high	usually high	stoichiometric	nano or micron
	Emulsion	many	high	frequently needle-like	frequently low	variable	non-stoichiometric	nano
	Sonochemical Method	few	usually low	diverse (usually needle-like)	variable	usually high	variable	nano
High Temp. processes	Combustion method	few	usually low	diverse (usually irregular)	variable	usually high	variable	usually nano
	Pyrolysis method	variable	usually low	diverse	high	variable	usually stoichiometric	nano particles embedded in micron aggregates
	Synthesis from biogenic sources	few	usually low	diverse	variable	usually high	variable	variable
	Combination procedures	variable	variable	diverse (frequently needle-like)	frequently high	usually high	usually stoichiometric	usually nano

Fig. 4.17 Comparison of different methods for the preparation of (HAp) nanoparticles. [14]

2.2.1 Método Humedo

Este método es bien importante ya que además de ser un poco sencillo permite tener un control del tamaño del polvo (nanopartícula Hap), lo que permitira después un mejor análisis de este, por ejemplo utilizando la técnica de Difracción de rayos X . No obstante, como este método se caracteriza por manejar temperaturas bajas se tiene una gran desventaja impurezas, es decir, distintas faces de CaP^2 lo que indica que no se encuentra una Hidroxiapatita pura, [14].

2.2.2 Método Químico

Este proceso se utiliza temperatura ambiente lo cual permite un mejor control del pH (aproximado a 14,2) lo que tambien permite mantener un mejor tamaño del polvo [17], este proceso se visualiza con man detalle en **Fig. 4.3**.

Por consiguiente, para elaborar la mezcla se utilizan dos reactivos bien importantes con contenido de Fosfato y Calcio[18], por lo tanto, en esta investigación se trabajo en un primer proceso con Fosfatos de Potasio Monobásico (KH_2PO_4) que es la fuente de fosfato y Carbonato de Calcio ($CaCO_3$) continene el calcio. Este proceso se realiza con un goteo lento donde un reactivo esta en constante agitación como se ilustra en la **Fig. 4.18**, el cual permite obtener una buena relación molar de (Ca/P) [16] y asi poder obtener una mejor calidad de Hidroxiapatita.



Fig. 4.18 Preparación Química de los reactivos KH_2PO_4 y $CaCO_3$

²En el estudio de biominerales es importante el tamaño del cristal dado que se requiere que tenga un tamaño menor a $100nm$ [15], al igual se tener en cuenta que la temperatura promedio es del orden de los $700^{\circ}C$ en donde se obtiene una relación molar Ca/P cercana al 1,67 [16].

Sin embargo, para mantener el pH, [19] se debe agregar otro químico ya sea para elevar o disminuir su número, lo que implica un deterioro en la pureza de la $(Hap), Ca_{10}(PO_4)_{10}(OH)_2$, es decir, se puede llegar a obtener Fosfato Dicálcico Dihidratado o Brushita ($DCPD, CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), Fosfato Dicálcico Anhidro o Monetita ($DCPA, CaPHO_4$), Fosfato Octacálcico ($OCP, Ca_8H_2(PO_4)6.5H_2O$) entre otros, [20].

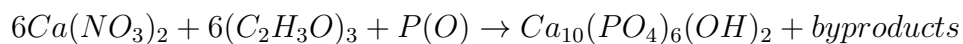
De igual forma en esta investigación se realizó el segundo proceso de precipitación química con los mismos parámetros que el primer proceso lo que cambia es los reactivos el Nitrato de Calcio Tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) y Pentaóxido de Fósforo (P_2O_5) [6], la cual conlleva a una mejor creación de cristales de Hidroxiapatita [21], No obstante, antes de obtener los cristales se obtiene un Sol-gel al aplicarle Tetraetilortosilicato ($TEOS, Si(OC_2H_5)_4$) [22] y lo se lleva a combustión. Lo que implica ver con mayor detalle el método de Sol-gel.

2.2.3 Método de Sol-Gel

Importante método para sintetizar muchos materiales, en este caso la hidroxiapatita, por ende, este proceso permite que se forme un estado de de polimerización química llegando a un estado líquido (sol) a bajas temperaturas, además, su principal ventaja es la gran homogeneidad debido a que ocurre en reacciones a nivel nanométrico, [23].

Otro aspecto relevante del uso del método de sol gel es la obtención de una estructura estequiométrica con gran área (aproximadamente $50nm$ lo que permite analizar estos polvos)[12]. Sin embargo, se tiene una gran desventaja que se genera una fase de Óxido de Calcio (CaO), lo cual afecta de manera mínima la obtención de hidroxiapatita pura.

Por consiguiente, este método se caracteriza por su gran capacidad de gelificación el cual se obtiene después de un proceso de envejecimiento como se ilustra en la **Fig. 4.19**, que posteriormente después de un tratamiento térmico (Calcinación) de $700^\circ C$ por $3h$ [24], donde este proceso se puede esquematizar por una reacción química [12] así:



Donde los demás productos se derivan de las soluciones acuosas [14].

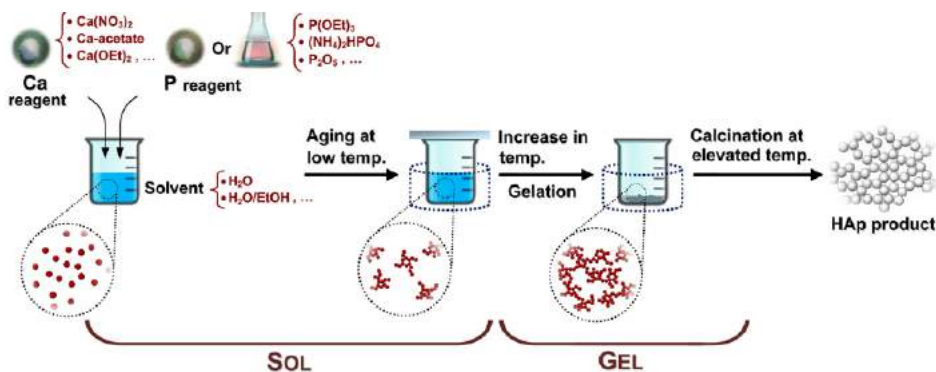


Fig. 4.19 Preparation of HAp nanoparticles via solgel process.

2.3 Difracción de rayos X (XRD).

2.3.1 Ley de Bragg

Se deduce de la relación de la aplicación de la difracción de rayos X aplicado a un cristal donde se produce una dispersión por un haz incidente formando un ángulo φ que después del choque con el cristal se dispersa con un giro de ángulo 2φ respecto a un plano.

Por consiguiente, en la Fig. 4.13 [10], si se poseen dos planos (hkl) donde se visualizan los rayos incidentes y reflejados. Se tiene que la parte incidente que no se refleja en un nivel lo realiza en un nivel mas profundo del cristal, no obstante, todos los rayos incidentes permaneceran iguales a los rayos reflejados respecto a uno plano.

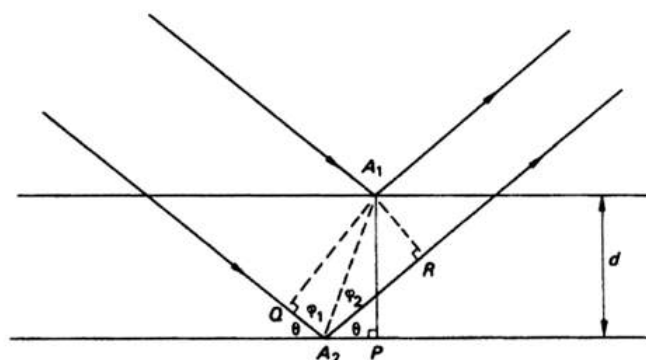


Fig. 4.13 Geometría de reflexión de rayos x , con planos sucesivos ($QA_2 - A_2R$).

Como la separación de los planos es d y los rayos incidentes tienen un ángulo θ y los rayos después de la reflexión deben seguir en fase, por lo tanto, los rayos son proporcionales a un número de veces de longitud de onda.

Por lo cual,

$$QA_2 + A_2P = n\lambda \quad (2.1)$$

donde

$$QA_2 = A_2P$$

además de la **Fig. 4.13** se puede deducir un triángulo rectángulo **Fig. 4.14** así,

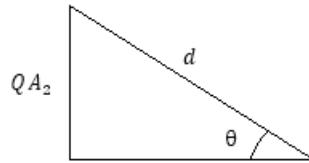


Fig. 4.14 Relación trigonométrica de los planos mediante la separación entre ellos d

Lo que indica que **Fig. 4.14** es

$$\sin\theta = \frac{QA_2}{d} \Rightarrow \sin\theta d = QA_2$$

retomando la ecuación (2.1) y reemplazando lo anterior se obtiene,

$$(\sin\theta d + \sin\theta d) = n\lambda$$

$$2\sin\theta d = n\lambda \quad (2.2)$$

Esta ecuación es la ley de Bragg donde n es número entero, corresponde al orden de reflexión de Bragg

Por otra parte, la diferencia de trayectoria δ se calcula como:

$$\begin{aligned} \delta &= QA_2 + A_2R = A_1A_2\cos\phi_2 = A_1A_2(\cos\phi_1 + \cos\phi_2) \\ \delta &= 2A_1A_2\cos\left[\frac{\phi_1 - \phi_2}{2}\right]\cos\left[\frac{\phi_1 + \phi_2}{2}\right] \end{aligned}$$

Ahora, si se toma el plano reflectante (hkl) con relación a las ecuaciones (1.5), lo cual indica que un haz incidente por “reflexión” y si d_{hkl} es la distancia interplanar, entonces:

$$d_{hkl} = \frac{a}{h \cos \alpha} = \frac{b}{k \cos \beta} = \frac{c}{l \cos \gamma} \quad (2.3)$$

Por lo tanto, despejando h, k, l e igualando con las ecuaciones (1.5), se tiene,

$$\begin{aligned} h &= \frac{\mu}{\cos \alpha d_{hkl}} = \frac{2 \mu \sin \theta}{\lambda \cos \alpha} \Rightarrow h = 2 \sin \theta d_{hkl} = \lambda \\ k &= \frac{\beta}{\cos \beta d_{hkl}} = \frac{2 \beta \sin \theta}{\lambda \cos \beta} \Rightarrow k = 2 \sin \theta d_{hkl} = \lambda \\ l &= \frac{\zeta}{\cos \gamma d_{hkl}} = \frac{2 \zeta \sin \theta}{\lambda \cos \gamma} \Rightarrow l = 2 \sin \theta d_{hkl} = \lambda \end{aligned}$$

Resumiendo las relaciones se tiene,

$$2 \sin \theta d_{hkl} = \lambda$$

la cual se reduce a la relación de Bragg así:

$$2 \sin \theta d_{hkl} = n \lambda \quad (2.4)$$

Dentro de las consideraciones de Von Laue, en la cual se hace referencia a que la dispersión se debe encontrar dentro esfera de Ewald ya que sino es así no sera valida la relación o ley de Bragg. Por lo tanto, se exige siempre que la radiación sea altamente monocromatica para poder observar con mayor presición la red cristalina, de no ser asi se tendrán diferentes lecturas o fotografías del fenómeno de difracción de rayos X , que complicaran el estudio de la experiencia.[9]. Esto implica directamente que la magnitud y dirección del vector reciproco σ_{hkl} mencionado anteriormente y el plano (hkl) que difracta rayos X , talque su punto reciproco esta situado en la superficie de la esfera de reflexión en la dirección S .

Por lo tanto, con la ecuación (2.4) para $n = 1$ se deduce que,

Donde el ángulo θ de la relación de Bragg respecto a los planos (hkl) del cristal respecto a C y se traza una línea normal a CB difractado de los planos (hkl) . De donde se deduce que el triángulo ABC , se obtiene,

$$\sin\theta = \frac{BC}{AC} = \frac{H_{hkl}}{\frac{2}{\lambda}} = \frac{1}{\frac{2}{\lambda}}$$

$$\sin\theta = \frac{\lambda}{2d_{hkl}} \Rightarrow \lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$$

Que es nuevamente la ley de Bragg, la cual se satisface para los planos (hkl) cuando se encuentra en los límites de la superficie de la esfera. Es decir, la reflexión se encuentra en un radio $(1/\lambda)$, donde λ es la longitud de onda de la radiación monocromática. Además la esfera de Ewald satisface la condición de que los puntos de reflexión deben estar dentro del límite de radio $(1/\lambda)$; de igual manera de la **Fig. 4.7** se concluye que,

$$|\sigma| = \frac{1}{d_{hkl}} = \left(\frac{2}{\lambda}\right) \sin\theta$$

Capitulo 3

Desarrollo Experimental

3.1 Metodología Experimental

3.1.1 Obtención de Hidroxido de Calcio

En el proceso de poder obtener un polvo de hidroxiapatita (Hap) de bajo costo y fácil acceso, se realizó un proceso con cascaras de huevo y así poder obtener óxido de calcio e hidróxido de calcio [21], para después poder sintetizarlo con otros materiales para la fabricación de una (HAp) con características similares tanto en resistencia mecánica como la más adecuada cristalinidad y una mejor similitud a el componente natural.

El proceso de obtención se basó en tener gran cantidad de cascaras para que de esta forma poder contar, con abundante material para los diferentes procesos y estudios; se realizó como primera medida un lavado de las cascaras de huevo para poder eliminar el material orgánico que aun presentaban, este procedimiento se realiza varias veces filtrando una y otra vez las cascaras en agua limpia hasta observar que no presentan ningún tipo de residuo, después de un lavado de 6 horas se deja secar a temperatura ambiente por un periodo de 48 horas, para que as se fuera eliminando el exceso de agua que estas tenían.

Al transcurrir las 48 horas, se pusieron en ollas comunes para llevarlas a una estufa eléctrica para poder continuar con el proceso de secado, al verificar que las cascaras están totalmente secas se muelen y así se llevan a un horno para realizarles un precalentamiento con una temperatura de $150^{\circ}c$ durante un tiempo de 24 horas, al finalizar este tiempo de precalentamiento se hacen bandejas de aluminio con 90g de cascaras y se llevan a una mufia a una temperatura de $450^{\circ}c$ durante 24 horas y así se elimina por completo

todo el exceso de material orgánico que haya quedado.

Cuando finalizan las 24 horas y no hay evidencia de material contaminante se eleva la temperatura de la mufla hasta los $750^{\circ}c$ por un tiempo de 36 horas, finalmente con la temperatura de $750^{\circ}c$ se observa que es posible obtener hidróxido de calcio el cual es necesario para la fabricación de nuestra hidroxiapatita y así poder continuar con nuestro estudio, el polvo obtenido de CaO_2 se lleva al equipo de rayos x para verificar su estructura y poder tener una muestra como base para el producto final.

3.1.2 Obtención de HAp a partir de hueso bovino

El hueso se lleva a un lavado para poder retirar parte del material orgánico que aun tiene, seguido se le agrega Cal y se deja en este químico por periodo de 96 horas para que así la Cal actué y elimine el tejido que esta adherido al hueso, transcurrido las 96 horas el hueso se lleva a una olla con agua para que se cocine durante 24 horas, de esta forma se limpia de la Cal que tiene todavía el hueso.

Se deja enfriar el hueso para poder limpiarlo totalmente, ya con el hueso libre de tejido se lleva a una mufla a temperatura de $250^{\circ}c$ durante 36 horas, para poder eliminar la grasa del hueso y no se presente ningún tipo de combustión, nuevamente se lleva a mufla pero esta vez a $750^{\circ}c$ durante 24 horas, imagen hueso al finalizar el tiempo de calentamiento el hueso se muele en un mortero para poder pulverizarlo imagen hueso, el tamaño de la muestra de HAp sintética es importante ya que para poder hacer algún tipo de medición de la composición de la muestra en el equipo de difracción de rayos X este debe ser similar a un cristal.

3.1.3 Proceso hidrotérmal

En el proceso se emplean los siguientes elementos para realizar la síntesis:

- $CaCO_3$
- SiO_2
- $TEOS(SiCH_3CH_2O)_4$
- $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$

- $HAp(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$
- $Ca_{10}(PO_4)_{5.75}(SiO_2)_{0.25}(OH)_{1.75}$

Se realizan concentraciones de amonio más agua y amonio mas OH para poder estabilizar el PH del compuesto ya que la HAp debe tener un nivel de $PH = 12$ en este proceso de solubilizar SiO_2 a PH básico con concentración de $100.8mg$ en $25ml$ de H_2O y $100.5mg$ SiO_2 en $25ml$ de OH cada muestra a una temperatura de $90^\circ c$ por periodo de 4 horas, pasado el tiempo de mezcla se verifica el nivel de PH de la solución final la cual es de 11.

3.1.4 Síntesis Por Combustión

En un vaso precipitado se agregan $8.36g$ de $CaCO_3$ y se mezclan en una solución de KH_2PO_4 concentrada en una cantidad de $6.85g$ por mol, se pone en un agitador durante 12 horas, en este tiempo se va agregando SiO_2 para que se incorpore a la mezcla final.

Transcurrido las 12 horas se observa que queda un gel el cual se lleva a una mufla a una temperatura de $500^\circ c$ durante 24 horas, al retirar el material de la mufla se identifican cristales amorfos los cuales se llevan a una mufla para realizar una rampa de temperatura con las siguientes variaciones:

$300^\circ c$ ($1h$) a $10^\circ c/min$ hasta $400^\circ c$ ($1h$) a $10^\circ c/min$ hasta $500^\circ c$ ($1h$) a $10^\circ c/min$ hasta $600^\circ c$ ($1h$) a $5^\circ c/min$ hasta $700^\circ c$ ($1.5h$) a $2.5^\circ c/min$ hasta $800^\circ c$ ($1.5h$) a $2^\circ c/min$ hasta $900^\circ c$ ($1.5h$) a $2^\circ c/min$ hasta $1050^\circ c$ ($3h$) y comenzar a enfriar lentamente.

Con el material obtenido se procede a molerlo en un mortero y por medio de una tamización se busca un polvo de tamaño de $45\mu m$, el cual se lleva para realizarle un estudio en un equipo de difracción de rayos x, y también se procede a realizar un pastillaje con este material.

Capitulo 4

Análisis de Datos Y Resultados

Los respectivos análisis y Resultados quedan suprimidos ya que la presente investigación (Caracterización de Hidroxiapatita por Difracción de Rayos X obtenida a partir de carbonato de calcio y fosfato de potasio monobásico.) esta en curso y no se cuenta con los permisos para publicar abiertamente de los Grupos de Biofísica, Bioquímica Estructural del Departamento de Física y del Grupo de Investigación Físicoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, adscritos por la Vicerectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana y dado que la financiación es del Banco Santander a los proyectos: PROTOTIPADO DE UN ANDAMIO DE MICROESFERAS DE SILICIO Y MATRIZ DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA PARA REGENERACIÓN ÓSEA EN ODONTOLOGÍA - ID 6387. (Financiado por la Vicerectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana) y ELABORACIÓN DE UN BIOMATERIAL DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA MODIFICADO CON PLASMA RICO EN FIBRINA PARA FUTURA REGENERACIÓN DE LIGAMENTO PERIODONTAL - ID 6559.

References

- [1] Luis Gonzalo Sequeda, José Milciades Díaz, Sandra Janeth Gutiérrez, Sandra Janeth Perdomo, and Olga Lucía Gómez. Obtención de hidroxapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev. Colomb. Ciencia, Química y Farm. Farm. Unal*, 41(1):50–66, 2012.
- [2] Carlos Andrés García Negrete. *Síntesis de Nanopartículas de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y Al_2O_3 Para el Desarrollo de Sólidos Porosos de Interés Biomédico*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, 2009.
- [3] Esperanza López. Juan Vélez, Natalia Cardona, Juliana Gómez. Síntesis de Hidroxapatita por Combustión a Partir del Carbonato de Calcio Obtenido de Cascaras de Huevo de Gallina. *Rev. Colomb. Mater.*, pages 97–102, 2014.
- [4] Biswadeep Chaudhuri, Bholanath Mondal, D.K. Modak, K. Pramanik, and B.K. Chaudhuri. Preparation and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from egg shell and K_2HPO_4 solution. *Mater. Lett.*, 97:148–150, apr 2013.
- [5] P. Kamalanathan, S. Ramesh, L. T. Bang, A. Niakan, C. Y. Tan, J. Purbolaksono, Hari Chandran, and W. D. Teng. Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Ceram. Int.*, 40(PB):16349–16359, 2014.
- [6] Mohamadhassan Taherian, Ramin Rojaee, Mohammadhossein Fathi, and Morteza Tamizifar. Effect of different sol-gel synthesis processes on microstructural and morphological characteristics of hydroxyapatite-bioactive glass composite nanopowders. *J. Adv. Ceram.*, 3(3):207–214, 2014.
- [7] J Bermúdez-Polonio. *Métodos de difracción de rayos X: principios y aplicaciones*. Ciencia y técnica. Pirámide, 1981.

- [8] Martin J. Buerger Leonid V. Azároff. *The powder method in X-ray crystallography*. New York, McGraw-Hill, 1958, New York, 1958.
- [9] J Bermúdez-Polonio. *Teoría y práctica de la espectroscopia de rayos X*. Exedra (Alhambra): Físico-Química. Alhambra, 1967, 1967.
- [10] Mark Ladd and Rex Palmer. *Structure Determination by X-ray Crystallography*. Springer; Edición: 5th ed. 2013, 2003.
- [11] B.D. Cullity. *X-Ray Diffraction Addison-Wesley Metallurgy Series*. Addison-Wesley 1956, 1956.
- [12] Mehdi Sadat-Shojai, Mohammad-Taghi Khorasani, Ehsan Dinpanah-Khoshdargi, and Ahmad Jamshidi. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.*, 9(8):7591–7621, 2013.
- [13] José García-Garduño, Margarita Victoria; Reyes-Gasgay. La hidroxapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica . *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2):90–95, 2006.
- [14] Mehdi Sadat-Shojai, Mohammad-Taghi Khorasani, Ehsan Dinpanah-Khoshdargi, and Ahmad Jamshidi. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.*, 9(8):7591–7621, 2013.
- [15] Shih Ching Wu, Hsi Kai Tsou, Hsueh Chuan Hsu, Shih Kuang Hsu, Shu Ping Liou, and Wen Fu Ho. A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite. *Ceram. Int.*, 39(7):8183–8188, 2013.
- [16] Sergey V Dorozhkin. Acta Biomaterialia Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*, 6(3):715–734, 2010.
- [17] Mehdi Sadat-Shojai, Mohammad Taghi Khorasani, and Ahmad Jamshidi. 3-Dimensional cell-laden nano-hydroxyapatite/protein hydrogels for bone regeneration applications. *Mater. Sci. Eng. C*, 49:835–843, 2015.
- [18] Satoshi Hayakawa, Tomoko Kanaya, Kanji Tsuru, Yuki Shiroasaki, Akiyoshi Osaka, Eiji Fujii, Koji Kawabata, Georgiana Gasqueres, Christian Bonhomme, Florence Babonneau, Christian Jäger, and Hans-Joachim Kleebe. Heterogeneous structure and in vitro degradation be-

- havior of wet-chemically derived nanocrystalline silicon-containing hydroxyapatite particles. *Acta Biomater.*, 9(1):4856–67, jan 2013.
- [19] By Jinhua Zhan, Yao-hung Tseng, Jerry C C Chan, and Chung-yuan Mou. Biomimetic Formation of Hydroxyapatite Nanorods by a Single-Crystal-to-Single-Crystal Transformation **. pages 2005–2010, 2010.
- [20] Angel Manchon Miralles. *Síntesis y Caracterización de Cerámicas de Fosfato Cálcico Sustituidas con Iones de Estroncio, Silicio y Hierro*. Tesis doctoral, Universidad rey juan carlos, 2011.
- [21] D. L. Goloshchapov, V. M. Kashkarov, N. a. Rumyantseva, P. V. Seredin, a. S. Lenshin, B. L. Agapov, and E. P. Domashevskaya. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen’s eggshell. *Ceram. Int.*, 39(4):4539–4549, 2013.
- [22] Laura Marcela Rueda Reyes. *Evaluación de Recubrimientos Sol-Gel Dopados con Sales de Calcio Para la Mejora de la Bioactividad de Aleaciones de Magnesio*. PhD thesis, Universidad Industrial De Santander, 2013.
- [23] Marly Julieth Mogollón Sarmiento and Astrid Cristina Niño Pinzón. *Síntesis de Recubrimientos de Hidroxiapatita Biológica Dopada con Magnesio y Reforzada con TiO₂*. PhD thesis, Universidad Industrial de Santander, 2011.
- [24] Jingdi Chen, Yingjun Wang, Xiaofeng Chen, Li Ren, Chen Lai, Wen He, and Qiqing Zhang. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders. *Materials Letters*, 65(12):1923–1926, 2011.
- [25] S K Chatterjee. *X-Ray Diffraction: Its Theory and Applications*. Prentice-Hall Of India Pvt. Limited, New Delhi, 2004.