



Estudio de la influencia que tiene la molienda mecánica a altas energías en la morfología y la formación de fases en polvos de hueso de cerdo con el propósito de obtener hidroxiapatita sin fases espurias

Laisha Brighht Bonilla Rincón

Universidad Antonio Nariño
Facultad de Ingeniería Mecánica, Electrónica y Biomédica
Bogotá, Colombia
2021

Estudio de la influencia que tiene la molienda mecánica a altas energías en la morfología y la formación de fases en polvos de hueso de cerdo con el propósito de obtener hidroxiapatita sin fases espurias

Laisha Brighit Bonilla Rincón

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero Biomédico

Director (a): José Rodrigo Muñoz Hoyos

Título (Ingeniero físico, PhD.)

Codirector (a): Carlos Andrés Palacio Gómez

Título (Físico, PhD.)

Línea de Investigación:

Biomateriales

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Ingeniería Mecánica, Electrónica y Biomédica

Bogotá, Colombia

2021

“En el fondo hay espacio de sobra”.

Richard Feynman

Agradecimientos

A mis padres, Ricardo y Lucrecia, por apoyarme incondicionalmente durante todo mi proceso de aprendizaje y por ser el motor de mi esfuerzo.

A mi asesor, José Muñoz, por su orientación en el desarrollo de este proyecto, por sus conocimientos y disposición entregados durante el proceso.

A mi co-asesor, Carlos Palacio, por su dedicación y tiempo en esta investigación, quien estuvo ahí para ayudarme a afrontar las dificultades surgidas durante el proceso experimental.

Resumen

La hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es una biocerámica destinada al desarrollo de sustitutos óseos, debido a su presencia en la fase inorgánica de los tejidos óseo y dental. Sin embargo, la producción de HA sintética implica procedimientos costosos y complejos, asimismo, debido a la ausencia de oligoelementos (Na, Mg y Al) la HA comercial no demuestra actividad metabólica. Por otro lado, también se consideran los huesos de animales como fuente alternativa para la obtención de cristales de HA, que posiblemente promuevan el crecimiento celular. Este proyecto tiene como objetivo estudiar la influencia de los parámetros experimentales de molienda (velocidad y tiempo de giro), en las características morfológicas y la formación de fases cristalinas durante la obtención de polvos de HA a partir de hueso de cerdo. El material para ser sometido a el proceso de molienda se obtuvo de la trituración de hueso femoral previamente sometido a un proceso de desproteinización, y la molienda mecánica de este material se realizó en un molino planetario de un solo brazo. Se establecieron dos series experimentales, en la primera se establecen tres velocidades de giro por 2 horas y en la segunda se analizan varios tiempos de molienda a 650 rpm. Las muestras obtenidas fueron caracterizadas por Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), a partir del análisis de resultados se consiguió determinar las condiciones que permiten obtener las características adecuadas para continuar con el proceso de obtención de hidroxiapatita cristalina con el menor tamaño de partícula posible.

Palabras clave: Hueso de cerdo, hidroxiapatita, molienda mecánica, DRX y MEB.

Abstract

Hydroxyapatite (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is a bioceramic intended for the development of bone substitutes, due to its presence in the inorganic phase of bone and dental tissues. However, the production of synthetic HA involves procedures costly and complex, likewise, due to the absence of trace elements (Na, Mg and Al), commercial HA does not show metabolic activity. On the other hand, animal bones are also considered as an alternative source for obtaining HA crystals, which possibly promote cell growth. The objective of this project is to study the influence of the experimental parameters of grinding (speed and turning time), in the morphological characteristics and the formation of crystalline phases during the obtaining of HA powders from pig bone. The material to be subjected to the grinding process was obtained from the crushing of femoral bone previously subjected to a deproteinization process, and the mechanical grinding. As of this material was made in a single-arm planetary mill. Two experimental series were established, in the first three rotation speeds were established for 2 hours and in the second several times of grinding at 650 rpm were analyzed. The samples obtained were characterized by X-ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM), from the analysis of results it was possible to determine the conditions that allow obtaining the appropriate characteristics to continue with the process of obtaining crystalline hydroxyapatite with the smallest possible particle size.

Keywords: Pig bone, hydroxyapatite, mechanical grinding, XRD y SEM.

Contenido

	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Estado del arte	5
2. Marco teórico.....	7
2.1 El tejido óseo.....	7
2.2 Ingeniería de tejidos óseos.....	8
2.2.1 Sustitutos óseos	8
2.2.2 Biomateriales.....	9
2.3 Hidroxiapatita	10
2.3.1 Métodos de síntesis HA	11
2.3.2 Estructura cristalina de la HA.....	12
2.4 Molienda mecánica	15
2.4.1 Molino planetario de bolas	17
2.4.2 Variables del proceso	17
2.5 Técnicas de caracterización	20
2.5.1 Difracción de rayos X (DRX).....	20
2.5.2 Microscopía óptica.....	23
2.5.3 Microscopía electrónica	23
3. Metodología	2.5.3-25
3.1 Materiales.....	2.5.3-25
3.2 Preparación del precursor para molienda mecánica.....	2.5.3-26
3.3 Molienda mecánica	2.5.3-28
3.3.1 Modelamiento cinemático	3.3.1-29
3.3.2 Proceso de Molienda	3.3.2-30
3.4 Caracterización de los polvos obtenidos	3.3.2-32
3.4.1 Difracción de Rayos X	3.4.1-33
3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	3.4.2-33
4. Resultados y discusiones	35
4.1 Simulación modelamiento cinemático.....	35
4.2 Molienda mecánica	37
4.2.1 Primera serie experimental	37
4.2.2 Segunda serie experimental	39

4.3	Difracción de Rayos X.....	41
4.4	Microscopia Electrónica de Barrido	44
5.	Conclusiones y recomendaciones	49
5.1	Conclusiones	49
5.2	Recomendaciones	50
5.3	Trabajos futuros	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1 Organización jerárquica del tejido óseo desde de la escala macro a la nano. Fuente: Mingzu et al. 2021	8
Figura 2-2 Representación esquemática de una celda unitaria de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ Fuente:(Pawloswski & Blanchart, 2018)	13
Figura 2-3 Comparación de DRX para a) bio-HA y b) HA comercial. Fuente: (Giraldo-Betancur et al., 2013)	14
Figura 2-4 DRX de Fe-Ni sintetizado con pH 0. Fuente: Muñoz, J. 2012	22
Figura 3-1 Diagrama de flujo para el proceso de elaboración de hidroxiapatita biológica	2.5.3-26
Figura 3-2 Dos imágenes de hueso femoral de cerdo sometido a proceso de cocción por 1 h y lavado convencional.	2.5.3-27
Figura 3-3 Huesos posterior a su inmersión en acetona, lavado (agua destilada) y secado en mufla durante 1 h a 100 °C.....	2.5.3-27
Figura 3-4 Astillas de hueso de cerdo sometidas a un proceso de trituración.....	2.5.3-28
Figura 3-5 Mecanosíntesis de precursor para la obtención de HA. a) Astillas de hueso de cerdo y 20 bolas de acero inoxidable, b) Jarro sellado y c) Jarro posicionado en el molino planetario.	3.3.2-31
Figura 4-1 Efecto del tiempo de molienda en la energía acumulativa para diferentes velocidades angulares del disco (Indicadas a la derecha de la figura).....	36
Figura 4-2 Potencia transferida al material durante la mecano-síntesis en función de la velocidad angular del disco y el número de bolas (indicadas a la derecha de la figura)...	37
Figura 4-3 Primera serie experimental, a) HA1, b)HA2 y c)HA3 con condiciones de molienda: wp= 400,500 y 650 rpm respectivamente, mb:mp=20:1 (Nb=20 bolas) y t= 2 h.	38
Figura 4-4 Efectos del incremento de la velocidad de giro del disco en la muestra (a), bolas (b) y jarro (c y d).....	38
Figura 4-5 Segunda serie experimental, condiciones de molienda: wp=650 rpm,	40
Figura 4-6 Perfil DRX de los polvos de HA1, HA2 y HA3 obtenidos por procesos de mecano-síntesis con un tiempo de 2 h y a tres diferentes velocidades de giro: 400, 500 y 650 rpm comparadas con el patrón de referencia HA ICSD 082289.....	42
Figura 4-7 Perfil DRX de la muestra HA4D obtenida por procesos de mecano-síntesis por 8 horas a 650 rpm, compara con el patrón de referencia HA ICSD 082289.....	43

Figura 4-8 MEB de polvos sintetizados por molienda mecánica, tres de ellas molidas por 2 horas a: a) 400 rpm, b)500 rpm y c) 650 rpm. La imagen d corresponde a la muestra sometida a tratamiento térmico previo (120 °C) y molida por 8 h a 650 rpm. 500x..... 45

Figura 4-9 MEB de polvos sintetizados por molienda mecánica, tres de ellas molidas por 2 horas a: a) 400 rpm, b)500 rpm y c) 650 rpm. La imagen d corresponde a la muestra sometida a tratamiento térmico previo (120 °C) y molida por 8 h a 650 rpm. 2000x 46

Figura 4-10 MEB de polvos sintetizados por molienda mecánica, tres de ellas molidas por 2 horas a: a) 400 rpm, b)500 rpm y c) 650 rpm. La imagen d corresponde a la muestra sometida a tratamiento térmico previo (120 °C) y molida por 8 h a 650 rpm. 5000x..... 47

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1 Materiales más utilizados en el diseño de implantes en el cuerpo humano.	9
Tabla 2-2 Comparación diferentes métodos para la obtención de HA.....	11
Tabla 2-3 Materiales implicados en el diseño de jarros y bolas para un molino planetario	18
Tabla 2-4 Comparación técnicas de microscopia electrónica (MEB- TEM)	24
Tabla 3-1 Reactivos e instrumentación utilizados para la producción de hidroxiapatita de origen animal.....	2.5.3-25
Tabla 3-2 Parámetros de molienda: segunda serie experimental (muestra HA4), se mantiene la misma relación mb:mp= 20:1 para todos los procesos	3.3.2-32
Tabla 4-1 Cantidad de las muestras recolectadas de acuerdo con la velocidad angular configurada. HA1= 400 rpm, HA2=500 rpm y 7 HA=650 rpm.	39
Tabla 4-2 Primer grupo: tamaño medio y desviación estándar de los granos más grandes de HA para cada una de las series experimentales.	48
Tabla 4-3 Segundo grupo: tamaño medio y desviación estándar de los granos más grandes de HA para cada una de las series experimentales.	48

Lista de abreviaturas

<i>HA</i>	Hidroxiapatita
<i>Bio-HA</i>	Hidroxiapatita biológica
<i>DRX</i>	Difracción de Rayos X
<i>MEB</i>	Microscopia Electrónica de Barrido
<i>HA1</i>	Muestra obtenida por molienda mecánica a 400 rpm por 2 horas
<i>HA2</i>	Muestra obtenida por molienda mecánica a 500 rpm por 2 horas
<i>HA3</i>	Muestra obtenida por molienda mecánica a 650 rpm por 2 horas
<i>HA4</i>	Muestra sometida a 120 °C por 4 horas en un horno tipo mufla
<i>HA4A</i>	Muestra HA4 obtenida por molienda mecánica a 650 rpm por 2 horas
<i>HA4B</i>	Muestra HA4 obtenida por molienda mecánica a 650 rpm por 4 horas
<i>HA4C</i>	Muestra HA4 obtenida por molienda mecánica a 650 rpm por 6 horas
<i>HA4D</i>	Muestra HA4 obtenida por molienda mecánica a 650 rpm por 8 horas

1. Introducción

El tejido óseo es un tejido conectivo constituyente principal de los huesos, que se compone de una fase orgánica, una fase inorgánica y agua, que le confiere al hueso flexibilidad, elasticidad, resistencia, dureza y rigidez. El entendimiento de dicha composición ósea es importante en aplicaciones biomédicas [1]. Los compuestos basados en fosfatos de calcio son biomateriales de gran interés para la ciencia, la razón fundamental es que la fase inorgánica del hueso está formada por fosfatos de calcio y otros oligoelementos, que a su vez, constituyen a los cristales de hidroxiapatita [2].

La hidroxiapatita (HA) es un biomaterial cerámico ampliamente utilizado en reparaciones óseas debido a su biocompatibilidad, bioactividad, naturaleza osteofílica y fácil incorporación en el tejido óseo, por lo que el uso de HA como injerto óseo se asemeja al hueso natural [3]. La HA se utiliza como secciones pequeñas de hueso artificial, relleno de cavidades, refuerzo de materiales compuestos y como recubrimiento de superficies para implantes, entre otros [4]. Debido a las atractivas propiedades de la HA, han surgido una serie de investigaciones centradas en desarrollar técnicas para producir hidroxiapatita, generalmente, se sintetizan mediante dos métodos diferentes; proceso en seco y húmedo. Sin embargo, el proceso en húmedo es complicado y requiere ajuste y control de pH. Por lo que al requerir polvos altamente cristalinos a gran escala se busca trabajar con técnicas en seco que garanticen una alta reproducibilidad y a bajo costo [5].

Como alternativa al sustituto óseo aparece la hidroxiapatita sintética comercial, que al tener una distribución estequiométrica de sus componentes no posee las mismas trazas minerales que el hueso natural, importantes en el proceso de osteointegración [6]. De hecho, la HA sintética es el compuesto más utilizado y es altamente confiable, a pesar de su complejo y costoso proceso de producción [7]. Por ello, se ha buscado obtener hidroxiapatita a partir de fuentes naturales, tales como animal, corales y cáscaras de

huevo, entre otros. La molienda mecánica como método de síntesis ha sido participe en la obtención de polvo de HA de origen animal debido a su bajo costo y tiempo empleado. La mecano-síntesis es una herramienta eficaz en la preparación de fases cristalinas y amorfas metaestables y formación de materiales nanoestructurados, debido a su acortamiento en los tiempos de reacción, reducción de las altas temperaturas necesarias en reacciones de estado sólido y la obtención de propiedades especiales en la activación mecánica a la que es sometida el material [8].

El proceso de molienda se basa en relación que existe entre el tiempo de molienda y la reducción de tamaño de la partícula, además, se genera gran cantidad de calor que se puede producir cuando se usan tiempos excesivos [9]. La principal dificultad de esta técnica consiste en establecer con exactitud los valores adecuados de los parámetros experimentales con el propósito de facilitar la formación de nuevas fases cristalinas, sin embargo, existen modelos útiles que buscan establecer una relación directa entre la energía que se transfiere al material y las variables configuradas en el usuario por el molino, tales como velocidad y tiempo de molienda.

Siendo el objetivo de este trabajo el estudio de la evolución morfológica y de las fases cristalinas o amorfas que aparezcan en el proceso de obtención de polvos de hidroxiapatita natural a partir de huesos de cerdo por molienda mecánica. Para ello, se consideran la Difracción de Rayos X y la Microscopia Electrónica de Barrido como técnicas de caracterización, buscando establecer las condiciones óptimas de velocidad y tiempo de molienda en la obtención de HA natural.

La estructura de este proyecto de grado está desarrollada en 5 capítulos y parte de las bases requeridas para el desarrollo de la investigación. Es por ello que el capítulo 2, denominado marco teórico, está dedicado a describir los aspectos teóricos de los materiales de estudio y sus propiedades, así como los métodos de síntesis y caracterización existentes. En el capítulo 3 se presenta la metodología, en la que se indican los materiales y métodos utilizados para obtener las muestras pulverizadas de HA natural, y se describe en detalle cómo se realizó la síntesis por molienda mecánica del material, así como la implementación, también se describen aquí las técnicas de caracterización. El capítulo 4, de resultados y discusiones, abarca el análisis de los resultados en la obtención y caracterización de la HA. Finalmente, se presentan las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

1.1 Planteamiento del problema

A pesar de que la hidroxiapatita sintética con tamaño de partícula nanométrico ha demostrado una bioactividad y biocompatibilidad similares al material óseo en comparación con la HA a granel, su forma rentable que demuestre la actividad metabólica, respuesta dinámica al medio ambiente y respuesta inmunogénica de la hidroxiapatita natural no está fácilmente disponible, debido a la ausencia de algunos oligoelementos (NA, Mg, y Al) presentes en el hueso humano [10]. Como respuesta a ello, un método alternativo para preparar HA es por medio de la extracción de fuentes naturales, como huesos de bovino y de cerdo, que busca obtener cristalitas del orden de los nanómetros deseables para promover el crecimiento celular. En efecto, con frecuencia se aplica un paso de molienda previo a la síntesis por calcinación de los polvos de hidroxiapatita, con el único objetivo de producir cristales con el menor tamaño de posible. Sin embargo, la molienda mecánica en un molino de bolas de alta energía comprende un método de síntesis en seco, en la que los polvos pueden activarse mecánicamente [11]. No obstante, al ser una técnica relativamente nueva, no se indican la ruta de síntesis y parámetros óptimos de velocidad angular del disco y tiempo de molienda, configurables en el molino planetario para la producción de polvos a partir de precursores de origen natural.

Para efectos de esta investigación, se formula la siguiente pregunta ¿Cuál es la influencia del tiempo de molienda y la velocidad angular del disco en la molienda mecánica en las características morfológicas y en la formación de fases durante la obtención de polvos de hidroxiapatita a partir de hueso de cerdo?

1.2 Justificación

La aplicación de los cerámicos esta ceñida a sus características morfológicas y cristalográficas. El establecer parámetros de obtención y síntesis es de vital importancia para potenciar su en la industria biomédica. El polvo de hidroxiapatita, por su parte, ha sido participe en investigaciones recientes en las que se busca formar un enlace real entre el tejido óseo circundante y el implante [12]. Dichas investigaciones deben garantizar la obtención de un tamaño de partícula controlado, El control de estos parámetros puede conducir a la obtención de la HA con propiedades que posibiliten potenciar su aplicación como biomaterial en el campo biomédico, considerando un proceso optimo en cuanto a costos y disponibilidad de reactivos y maquinaria. Sin embargo, considerando que no

existen registros concisos que mencionen la evolución morfológica y cristalográfica de la hidroxiapatita natural durante su síntesis por el proceso de molienda mecánica, así como la escasa información de protocolos ideales para dicho método, surge el interés de conocer los parámetros, tales como velocidad, tiempo de giro y relación masa bola: masa polvo que permitan obtener el material de forma más eficiente, lo que lleva a explorar la mecanosíntesis en pro de nuevas técnicas y estudios para la optimización de las características de la HA.

Este trabajo de grado pretende estudiar la evolución morfológica y las fases cristalinas o amorfas que aparezcan en el proceso de obtención de polvos de hidroxiapatita a partir de hueso de cerdo, usando diferentes velocidades de giro del disco y tiempos de molienda mecánica en un molino planetario a altas energías.

1.3 Objetivos

A continuación, se describen el objetivo general y los objetivos específicos de este proyecto.

1.3.1 Objetivo general

Estudiar la influencia que tiene la molienda mecánica a altas energías en la morfología y la formación de fases en polvos de hueso de cerdo con el propósito de obtener hidroxiapatita sin fases espurias con el menor tamaño de partícula posible.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener el precursor de hidroxiapatita a partir de la desproteinización de hueso femoral de cerdo indicados en el protocolo [3].
- Utilizar diferentes condiciones de velocidad de giro del disco y tiempo de molienda en el molino planetario para la obtención de hidroxiapatita.
- Caracterizar los polvos obtenidos en diferentes condiciones de molienda mecánica a través de Difracción de Rayos X y Microscopía Electrónica de Barrido.
- Determinar la evolución morfológica y de la formación de las fases de los polvos obtenidos en las diferentes condiciones de molienda mecánica.

- Identificar los parámetros de molienda mecánica que permiten obtener las muestras con el menor tamaño de partícula, conservando las fases características de este material y sin la presencia de fases espurias.

1.4 Estado del arte

La síntesis de polvos de hidroxiapatita es un amplio campo de investigación, se busca la obtención de HA óptima en cuanto a calidad a costos, biodisponibilidad y calidad. La sinterización a partir de fuentes biológicas abarca procesos en secos, donde aparece la molienda mecánica, una técnica relativamente nueva que relaciona las condiciones de molienda y la transferencia de energía al material. Sin embargo, la limitada información de parámetros óptimos, tales como a velocidad angular del disco y el tiempo de molienda, dificulta la ruta de obtención de polvos de hidroxiapatita por este método. Para el desarrollo de esta investigación se parte de rutas establecidas por algunos autores [3] [13] [14] [15] y [16], donde los huesos de bovino y/o porcino desproteinizados son sometidos a un proceso de calcinación en un rango de temperaturas entre 700 °C y 1200 °C. Además, en cada uno de las investigaciones, con el fin de obtener polvos maleables y finos, se aplica un paso de molienda previo a su síntesis en molinos de bolas de acero inoxidable y ágata.

Ruksudjarit et al. Sometieron las astillas desproteinizadas a un proceso de molienda en un molino de bolas durante 24 h y cada 20 g se volvieron a triturar mediante molienda vibratoria utilizando etanol como medio de molienda, variando el tiempo de molienda ($0 < t < 8$ h). El efecto del tiempo sobre el tamaño del cristalito en los polvos fue calculado a partir de la ecuación de Scherrer, relacionada en la sección 2.5. A partir de lo anterior, se concluyó que el tiempo óptimo de molienda de 2 a 4 h podría afectar levemente la estructura de la HA ósea original, obteniendo tamaño de cristalito inferior a los 100 nm [15]. Sin embargo, en dicho artículo no se hace mención a la velocidad angular del disco y composición de los elementos del molino.

Nasiri-Tabrizi et al. Por su parte, tienen como punto de partida hidróxido de calcio, fosfato dicálcico y anhidro y carbonato de calcio. Los compuestos son molidos en un molino planetario de alta energía, en viales de poliamida-6 y acero cromado templado y utilizando bolas de zirconia durante 15, 40 7 80 h a 600 rpm, con una relación masa bola: masa polvo

20:1. A partir de los difractograma, se observó que el aumento del tiempo de molienda provocó una disminución del tamaño del cristalito [17].

Mandal et. al reporta la síntesis de hidroxiapatita nanocristalina mediante el método mecanoquímico usando pentóxido de fósforo y polvos de calcio como punto de partida en un molino planetario. El estudio muestra que las condiciones óptimas de molienda se alcanzan a una velocidad crítica del 60 % durante 15 horas de trabajo y se obtiene un tamaño de partícula de 9 nm [8].

A diferencia de las investigaciones mencionadas, este proyecto busca conseguir hidroxiapatita natural pulverizada por medio de molienda mecánica como único método de síntesis. Considerando que la principal dificultad es la limitada información de los parámetros óptimos de obtención de HA natural en relación con la energía transferida al material, se relaciona los modelos teóricos existentes en la literatura [18] [19] [20] [21], descritas más adelante.

Como punto de partida para esta investigación, se tiene en cuenta los tamaños de partícula reportados por Rana et. al, quienes realizaron un estudio comparativo de la extracción de HA de hueso cortical humano y bovino por descomposición térmica. El tamaño de cristal se extrajo mediante análisis MEB de las muestras sometidas a 650 – 1250 °C. Después de ser calcinadas a 950 °C las muestras de hueso bovino y humano, los tamaños de partícula fueron 195,5- 339,8 nm respectivamente. Cuando se sinterizaron a 1050 – 1250 °C los tamaños de partícula fueron 315,2- 379,9 nm y 234,9 nm- 2,084 µm de diámetro [22].

2. Marco teórico

2.1 El tejido óseo

El hueso está formado por diferentes tejidos: tejido óseo, cartílago, tejido conectivo denso, epitelio, tejido adiposo y tejido nervioso. Por su parte, el tejido óseo se encuentra en un proceso constante de crecimiento, remodelación y autorreparación. Contribuye al homeostasis del organismo, brinda sostén y protección, produce células sanguíneas y almacena minerales y triglicéridos. A nivel microscópico, el tejido óseo contiene una abundante matriz extracelular que rodea células muy separadas entre sí, la matriz osteoide está constituida por 15% de agua, 30% de fibras colágenas y 55% de fases minerales cristalizadas (Figura 2-1). La sal mineral más abundante es el fosfato de calcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ que combinado con hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ forman los cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Además, también se combinan con otras sales minerales, como el carbonato de calcio (CaCO_3) y con iones (Mg, F, K, SO_4). La calcificación de los cristales sucede cuando estos se depositan en las estructuras formadas por las fibras colágenas de la matriz osteoide, allí estas sales minerales se cristalizan [23]. Dichas combinaciones entre sales minerales y fibras colágenas le conceden al hueso sus características, visto desde la ciencia de los materiales se considera al tejido óseo como un material compuesto, en el que su parte mineral soporta la mayor parte de las cargas mecánicas y la parte orgánica le proporciona al hueso flexibilidad [24].

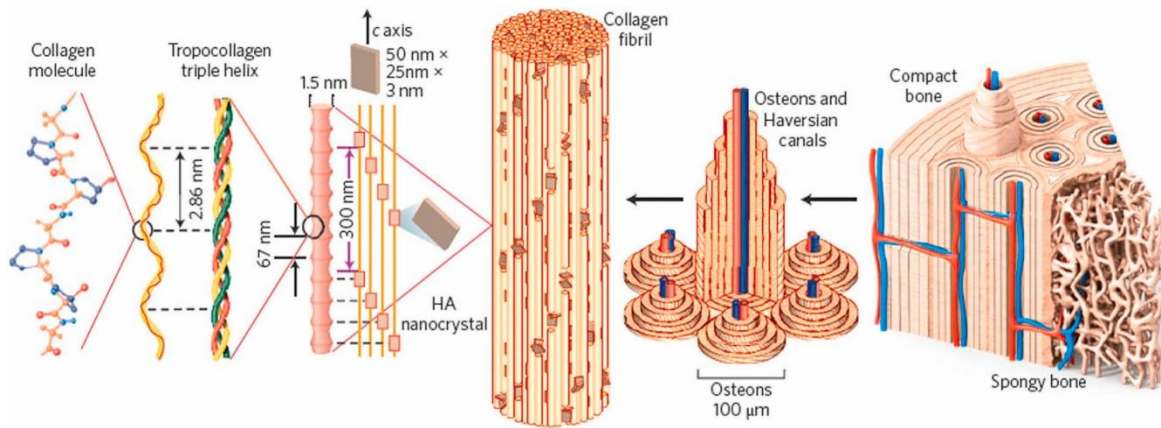


Figura 2-1 Organización jerárquica del tejido óseo desde de la escala macro a la nano.
Fuente: [25]

2.2 Ingeniería de tejidos óseos

La ingeniería de tejidos se refiere a la disciplina que usa los principios y métodos de la ingeniería y de la ciencia orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos, así como la restauración, mantenimiento y mejora de las insuficiencias tisulares [26]. La ingeniería tisular ósea tiene como objetivo reparar los defectos óseos que por múltiples causas no pueden consolidarse de forma natural, por lo tanto, se ocupa de desarrollar sustitos óseos implantables a través de la combinación sinérgica de biomateriales y/o células [27].

2.2.1 Sustitos óseos

El deterioro del tejido óseo tiene origen muy variado, lo que influye en la elección del método de relleno, para ello, se recurre al uso de una amplia gama de sustitos óseos. Se define como sustito óseo a cualquier producto de la ingeniería tisular que pueden ser de origen humano, natural, animal, vegetal y sintético destinado a ser implantado en mamíferos, cuyas estructuras presentan deterioro de origen traumático u ortopédico [28]. A continuación, se describen sustitos óseos derivados de hueso (humano y animal) y de origen no óseo:

- Los autoinjertos autólogos son el método más usado, involucran la toma de un fragmento óseo del propio paciente, tiene propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas, sin embargo, su uso se ve limitado por la cantidad de la muestra y la morbilidad en el sitio de extracción.

- Un aloinjerto óseo consiste en la toma de un hueso proveniente de un cadáver de un individuo de la misma especie, su tasa de incorporación es baja en comparación con los injertos existentes debido a la ausencia de células osteoprogenitoras, además, puede causar una reacción inmune y transmitir posibles patógenos del individuo donante.
- Los xenoinjertos, consisten en la utilización de fragmentos de hueso de animales de diferente especie, su uso se ve limitado por la reacción inmunológica intensa que causan en el paciente[26].
- Los sustitutos sintéticos surgen a causa de los riesgos microbiológicos presentes en los injertos de origen natural y se obtienen a partir de síntesis química.

2.2.2 Biomateriales

Un biomaterial se define como un material biocompatible adecuado para reemplazar o modificar la función de tejidos u órganos corporales. La ciencia de los materiales es una disciplina que reúne conocimientos de bioingeniería, química, ingeniería eléctrica, ingeniería mecánica, biología y medicina. El diseño y desarrollo de implantes introduce una amplia gama de materiales, se agrupa en metales, polímeros, cerámicos o una combinación entre ellos. Además de las propiedades mecánicas, resistencia, elasticidad y durabilidad que los caracteriza, los biomateriales contienen factores clave en su uso, tales como la biocompatibilidad, la toxicología, biofuncionalidad y su disponibilidad[29]. En la tabla 2-1, se presentan algunas ventajas y desventajas de la clasificación de los materiales más utilizados en implantes.

Tabla 2-1 Materiales más utilizados en el diseño de implantes en el cuerpo humano.

Materiales	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Polímeros (Nylon, Silicón, Poliéster, Politetrafluoroetileno, etc.)	Elástico Fácil de fabricar	Débil Se deforma con el tiempo Puede degradar	Suturas, vasos sanguíneos, encaje de cadera, oído, nariz, otros tejidos blandos.
Metales (Ti y aleaciones, Co-aleaciones Cr, aceros inoxidables, Au, AG, Pt, etc.)	Fuertes, Dureza, dúctil	Puede corroerse Densos Difícil de hacer	Reemplazo de articulación, placas de hueso, implantes de raíz dental, marcapasos e hilo de sutura.
Cerámicos (óxido de aluminio, fosfatos de	Biocompatible Inerte	Frágil No es elástico	Dental, reemplazo cabeza femoral de

calcio incluyendo Hidroxiapatita, carbón)	Fuerte compresión en	Difícil de hacer	cadera, revestimiento e implantes dentales.
Composites (Carbón-Carbón, cemento óseo reforzado con fibra)	Fuerte Hecho a medida	Difícil de hacer	Implantes de articulación, válvulas cardíacas.

Fuente: [30]

Para fines de este proyecto, se hace necesario enfatizar los biomateriales cerámicos y su potencial aplicación como implante óseo.

La cerámica es un material fabricado a partir de materiales inorgánicos no metálicos [30]. Los cerámicos se caracterizan por su gran biocompatibilidad, baja toxicidad, alta resistencia a la corrosión y a la compresión, altas temperaturas de fusión, dureza, fragilidad, baja conductividad eléctrica y térmica, que lo hace atractivo para la industria biomédica [2]. Dentro de los compuestos señalados en la tabla 1-1, se incluyen los fosfatos de calcio, que son relevantes para los investigadores dado su similitud con la fase inorgánica del tejido óseo y su influencia en la regeneración del mismo, comprenden muchos miembros que difieren en su relación calcio/fosfato (Ca/P) [28].

2.3 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA) es una cerámica bioactiva cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Es uno de los fosfatos de calcio más estables con una relación Ca/P de 1,67 y es el componente inorgánico más importante en la regeneración ósea por su presencia en la fase mineral de los huesos y el esmalte dental. El polvo de HA pura es blanco, mientras que la HA de origen natural suele tener coloraciones marrón, amarillo e incluso verde [31]. La literatura reporta dos principales formas de obtención de hidroxiapatita; mediante síntesis química y a partir de una fuente natural [16]. La principal diferencia entre la apatita presente en el hueso y la HA sintética es la ausencia de impurezas (iones de carbonato y magnesio) en la estructura en este último [32]. Como biomaterial, la hidroxiapatita posee una excelente biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y comportamiento no tóxico, considerando esto, es destinado al desarrollo de implantes, reparaciones y sustituciones óseas [33]. En su forma natural, el tamaño de cristal suele ser de 20-80 nm de largo y 2-5 nm de ancho, mientras que la HA sintética producida comercialmente presenta un tamaño mayor [34].

2.3.1 Métodos de síntesis HA

La principal desventaja del uso de la hidroxiapatita está en su baja resistencia mecánica, que depende del tamaño y distribución del grano, porosidad y demás defectos microestructurales, a raíz de ello y de la necesidad de potenciar su uso en diferentes áreas de la industria biomédica, existe diversos métodos de síntesis de HA, la Tabla 2-2 contiene la clasificación de tres grupos existentes para la preparación de hidroxiapatita; métodos secos, métodos húmedos y procesos de alta temperatura, junto con las características de los polvos obtenidos. Los métodos más frecuentes son: precipitación química, sol-gel, síntesis hidrotermal, deposición térmica y el método de reacción en estado sólido [35].

Tabla 2-2 Comparación diferentes métodos para la obtención de HA.

Método		Procesamiento		Características del polvo					
		Productos químicos	Costo	Morfología	Cristalinidad	Pureza de fase	Relación Ca/P	Tamaño	Distribución
Seco	Estado sólido	Poco	Bajo	Diversa	Muy alta	Baja	Variable	Micro	Amplio
	Mecanoquímico	Poco	Bajo	Diversa	Muy alta	Baja	No estequiométrica	Nano	Amplio
Húmedo	Precipitación química	Poco	Bajo	Diversa	Baja	Variable	No estequiométrica	Nano	Variable
	Hidrolisis	Poco	Alta	Diversa	Variable	Alta	Estequiométrica	Variable	Variable
	Sol-gel	Variable	Variable	Diversa	Variable	Variable	Estequiométrica	Nano	Angosto
	Hidrotermal	Variable	Alta	En forma de aguja	Muy alta	Alta	Estequiométrica	Nano o micro	Amplio
	Emulsión	Muchos	Alta	En forma de aguja	Bajo	Variable	No estequiométrica	Nano	Angosto
	Sonoquímico	Poco	Baja	Diversa	Variable	Alta	Variable	Nano	Angosto
Procesos de alta temperatura	Combustión	Poco	Baja	Diversa	Variable	Alta	Variable	Nano	Amplio
	Pirólisis	Variable	Baja	Diversa	Alta	Variable	Estequiométrica	Nano en agregado de micras	Variable
	Fuentes biogénicas	Poco	Bajo	Diversa	Variable	Alta	Variable	Variable	Variable
	Combinación de procesos	Variable	Variable	Diversa	Alta	Alta	Estequiométrica	Nano	Variable

Fuente: [36].

- Método seco: este método no requiere disolventes y no están influenciadas por los parámetros de procesamiento. Al no requerir condiciones controladas, este proceso es adaptable para la producción en masa de polvos.

- Método húmedo: se describe como un método de síntesis que utiliza reactivos líquidos y tienen la capacidad de controlar la morfología y el tamaño medio del polvo. Sin embargo, la baja de temperatura de preparación genera fases de CaP distintas de HA.
- Procesos de alta temperatura: Se identifican por sus elevadas temperaturas y se utilizan para calcinar precursores.
- Síntesis de fuentes biológicas: utiliza residuos biológicos que implica la cocción durante unas horas para eliminar los materiales orgánicos [36]. Generalmente, para obtener hidroxiapatita a partir de hueso es necesario inducir la cristalinidad de la muestra por medio de calcinación [1]. Los huesos de animales tienen una morfología y estructura similar al hueso humano, contienen trazas de iones beneficiosos en la regeneración ósea, además requiere un procesamiento de bajo costo [37].

2.3.2 Estructura cristalina de la HA

La cristalografía se define como el estudio de la estructura y propiedades de los sólidos cristalinos, que aporta información en cuanto a la distribución de los átomos, iones y moléculas que constituyen al material [38]. Al describir la estructura cristalina, se abarca los siguientes conceptos:

- Cristal, que es un sólido compuesto de átomos dispuestos en un orden periódico a largo alcance.
- Una red cristalina, se define como la distribución ordenada de puntos en el espacio, donde cada uno de estos puntos se conoce como punto reticular [39].
- El concepto de estructura cristalina aparece cuando se ubican átomos, iones o moléculas en los puntos reticulares de la red cristalina.
- La celda unitaria es el mínimo patrón que se repite en la estructura cristalina, que resulta de la unión de los puntos reticulares en forma de paralelepípedo. La disposición de los átomos dentro de una celda unitaria determina la estructura de un cristal. El tamaño y forma de la celda se describen por medio de los parámetros de red, que corresponden a las longitudes de las tres aristas independientes a , b y c , y a los ángulos entre estas aristas α , β y γ [40].

A partir de las configuraciones atómicas de los materiales cristalinos, surgen los siete sistemas cristalinos, Cúbico, Hexagonal, Tetragonal, Romboédrico, Ortorrómico, Monoclínico y Triclínico; que definen las posibles geometrías de las redes cristalinas, conocidas como las 14 redes de Bravais [39].

En un cristal perfecto la repetición de esta celda unitaria debería cumplirse hasta infinito en todas las direcciones del espacio físico, sin embargo, los cristales reales tienen un límite, lo cual conlleva a afirmar que la celda unitaria tendrá un número n finito de repeticiones. Generalmente, un material policristalino puro está constituido por elementos o compuestos con una estructura cristalina definida, sin embargo, se presentan regiones donde la orientación de la estructura cristalina es diferente en cada una de ellas. En partículas de polvo de materiales sólidos estas regiones se denominan cristalitos. Y generalmente, un material se considera más cristalino cuando mayor sea el tamaño del cristalito.

Por su parte, el monocristal de HA tiene una estructura hexagonal compleja, con parámetros de red $a=b=0,942$ nm y $c=0,688$ nm, además la celda incluye 44 átomos como se observa en la figura 2-2.

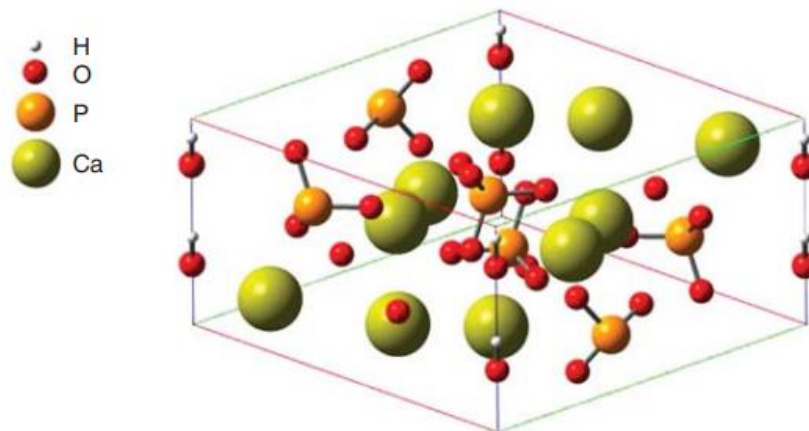


Figura 2-2 Representación esquemática de una celda unitaria de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Fuente:[41].

Como se mencionó anteriormente, la hidroxiapatita puede obtenerse a partir de precursores químicos, que son relativamente costosos, tales como nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, el fosfato monoácido de diamonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, el ácido fosfórico H_3PO_4 , el hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y el pentaóxido de fósforo P_2O_5 . La HA sintética tiene

proporciones estequiométricas con una razón Ca/P de 1,67 y un ejemplo de ello, es la HA comercial Coralina (HAp-200). Por otro lado, la hidroxiapatita obtenida a partir de fuentes biológicas (Bio-HA) no es estequiométrica y presenta una razón Ca/P menor que 1,67, y se puede encontrar en la fase inorgánica de los huesos de animales, esqueletos minerales de los corales, escamas de peces, entre otros [1].

La figura 2-3 indica los patrones de difracción de rayos X de muestras de HA de origen animal obtenidas mediante diferentes tratamientos: desgrasado, alcalino y calcinado, y para cinco muestras comerciales: NIST, Sigma, Apafill G, Coralina y Biograft.

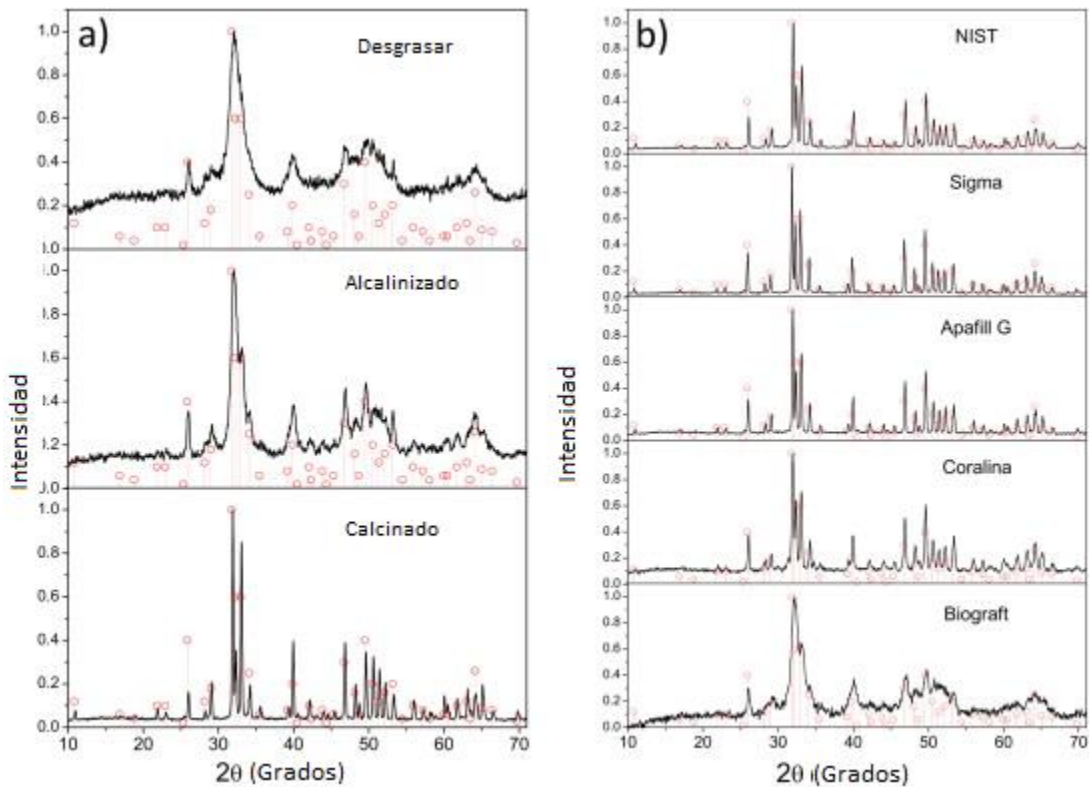


Figura 2-3 Comparación de DRX para a) bio-HA y b) HA comercial. Fuente: [6].

La hidroxiapatita es más estable en cuanto más cercana sea la razón Ca/P a 1,67. Dicha relación determina el comportamiento térmico de la HA, junto a la atmosfera en que se realice el proceso. Además, la estequiometría es un factor importante en la determinación de las propiedades mecánicas del material, mientras que el tamaño de partícula se relaciona con la resistencia mecánica. Se ha demostrado que si los gránulos superan los 2 μm , la resistencia mecánica disminuye [2].

2.4 Molienda mecánica

La molienda mecánica es una técnica útil que favorece la reducción del tamaño de partículas de diferentes materiales. Además, surge como un método alternativo de síntesis de materiales en estado sólido. Consiste en la continua fractura, deformación y soldadura de elementos, con el objetivo de obtener una microestructura fina y controlada de polvos e incluso facilita el proceso de mezcla y obtiene muestras homogéneas sin promover transformaciones químicas. Con base en esto, la mecano-síntesis busca mejorar las propiedades físicas mediante la activación mecánica del material expuesto.

El proceso de molienda se realiza en un molino planetario, donde se sitúa la muestra en el interior de los jarros junto con esferas resistentes al desgaste mecánico y estos a su vez, situados sobre una plataforma dentro del molino. A causa de los movimientos opuestos de la plataforma y los jarros aparecen fuerzas centrífugas en el sistema, lo que provoca que los polvos se fracturen al colisionar las esferas con la superficie interna de los jarros. Este proceso implica la transferencia de energía hacia el material conduciendo en ocasiones a la formación de nuevas fases [42]. En la Figura 2-5 se muestra la configuración de un molino de bolas planetario, indicando las direcciones de rotación contrarias del jarro y el disco. Dicho proceso, se basa en la relación que existe entre el tiempo de molienda y la reducción del tamaño de partícula, de tal manera que a medida que aumenta el tiempo, el tamaño de partícula disminuye. Además, involucra parámetros experimentales tales como número y tamaño de bolas, cantidad de material, relación masa bola: masa polvo y velocidad angular de los jarros y de la plataforma.

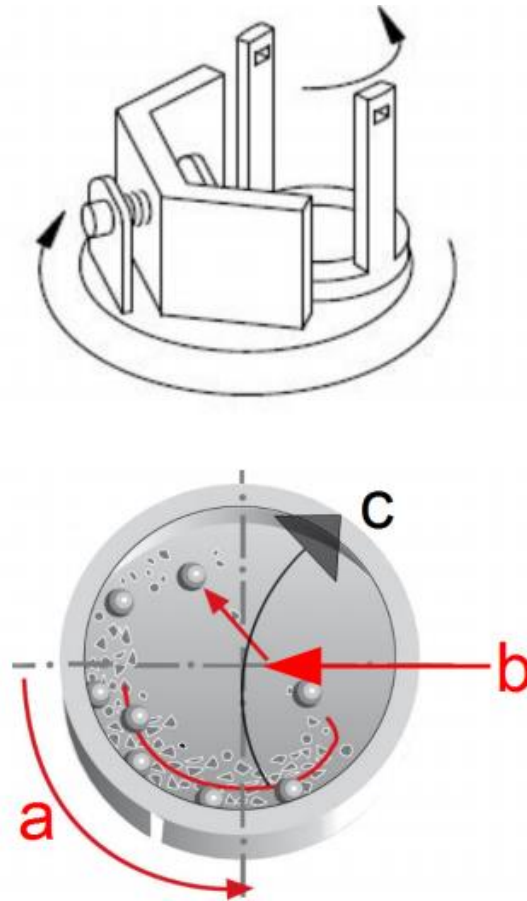


Figura 2-5 Dibujo esquemático del funcionamiento de un molino de bolas planetario, los sentidos de rotación del jarro (a) y del disco portador (c) son opuestas, por lo que las fuerzas centrífugas (b) actúan de manera alterna. Fuente: [43]

El mecanismo de molienda generalmente se presenta en las siguientes etapas:

- La primera etapa comienza con la fractura y deformación del polvo debido a las colisiones en el interior de los jarros y el tamaño de partícula disminuye.
- En la segunda etapa dado el aumento de la superficie de contacto entre los polvos se facilita su interacción y por lo tanto su reordenamiento estructural, aparecen partículas con estructura multicapa, en la que existe un predominio de soldadura entre las mismas, incrementando su espesor.
- En la tercera etapa las partículas equiaxiales se generan mediante el mecanismo de soldadura. Debido a la pérdida de ductilidad del material, hay una mayor tendencia de fractura. Finalmente, se alcanzará el equilibrio de los mecanismos de soldadura y fractura entre las partículas.

- En la última etapa, los polvos alcanzan un refinamiento estructural. Consiste en la disminución del tamaño de las partículas de acuerdo a un proceso de homogenización [9].

En relación con lo anterior, la duración del procesado de los polvos por molienda mecánica depende de los factores energéticos y mecánicos implicados en el accionamiento del molino.

2.4.1 Molino planetario de bolas

Un molino planetario de bolas está destinado para la molienda en seco o húmeda de muestras, trituración y desarrollo de materiales. Le debe su nombre al movimiento planetario de sus jarros, que están dispuestos en un disco de soporte giratorio y un motor de accionamiento hacen que giren alrededor de su propio eje. La alta velocidad de rotación tanto de los recipientes como de las bolas, conducen a grandes energías de impacto de los elementos contenidos en el jarro, que logra un rendimiento efectivo de molienda [18].



Figura 2-6 Molino planetario PULVERISITTE 6 classic line. Molino existente en la Universidad Antonio Nariño- Sede Tunja

2.4.2 Variables del proceso

La mecano-síntesis es un proceso que depende de muchos parámetros experimentales, tales como:

- Tipo de bolas: la energía cinética que se crea en el sistema depende de la masa y velocidad de las bolas. El uso de bolas pequeñas aumenta la frecuencia de las colisiones, por lo que se obtiene una síntesis más fina, a su vez, una mayor cantidad de bolas reduce el tiempo de molienda.
- Jarros: El impacto de los elementos contenidos en las paredes de los recipientes se puede ver afectado por la incorporación de polvos no deseados en la muestra, de allí la importancia del uso de un material adecuado para los recipientes. Normalmente se utilizan jarros y bolas de molienda del mismo material, la Tabla 2-2 reúne los materiales usados en la construcción de dichos elementos, así como sus respectivas características. Además, el tamaño y forma es importante en el diseño de los jarros, por un lado, un recipiente de 80 ml aumenta la frecuencia de colisión entre bolas, mientras que uno de 500 ml aumenta la velocidad de las bolas, lo que implica fuerzas de impacto más fuertes [44].

Tabla 2-3 Materiales implicados en el diseño de jarros y bolas para un molino planetario

Material (Jarro y bolas)	Componentes principales	Densidad g/cm ³	Resistencia a la abrasión	Inserto para material de molienda
Ágata	(99,9 % SiO ₂)	2,65	buena	muestras blandas a semiduras, molienda sin metal
Nitruro de silicio	(90 % Si ₃ N ₄)	3,25	extremadamente buena	Muestras abrasivas, molienda sin metal
Corindón sintetizado	(99,7 % Al ₂ O ₃)	3,9	Buena en determinadas condiciones	Muestras semiduras, fibrosas, molienda sin metal

Óxido de circonio	(99,2 % ZrO_2)	5,7	Muy buena	Muestras abrasivas, fibrosas, molienda sin metal
Acero inoxidable templado	(16,0 – 18,0 % Cr)	7,7	Buena en determinadas condiciones	Muestras semiduras, quebradizas
Carburo de wolframio	(93 % CW+6 % Co)	14,9	Muy buena	Muestras duras, abrasivas

Fuente: [43]

- Velocidad de giro: entre más rápido gire el molino, mayor será la energía entregada a la muestra. Teniendo en cuenta que, a altas velocidades la temperatura en los jarros puede alcanzar un valor muy alto. Puede ser ventajoso en casos en los que se requiere homogenización o aleaciones en polvos, además puede acortar la duración de molienda e incrementar el porcentaje de partículas finas, aunque en algunos casos puede ser desventajoso para la muestra porque el aumento de la temperatura puede acelerar los procesos de descomposición de soluciones solidas e incluso contaminarla.
- Tiempo de molienda: los tiempos requeridos para desarrollar una estructura está en función del alcance de equilibrio entre la soldadura y fractura de las partículas [11]. Para optimizar la duración de la molienda pueden utilizarse jarros y bolas de molienda con una mayor densidad, relacionados en la tabla 2-2, esto, garantiza una mayor energía de impacto [43].

2.5 Técnicas de caracterización

La caracterización de los materiales tiene como objetivo conocer cualitativa y cuantitativamente, la composición estructural, morfológica y química de los elementos. A continuación, se describen las técnicas necesarias para analizar evolución morfológica y de formación de fase de los polvos obtenidos por molienda mecánica.

2.5.1 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es un método de análisis no destructivo utilizado para estudiar la naturaleza de un material cristalino o amorfo. La DRX permite analizar e identificar compuestos cristalinos desconocidos aplicando la ecuación de la ley de Bragg y también proporciona información sobre su estructura cristalina [45]. Las variables de trabajo para realizar el ensayo son fijadas de acuerdo a los requisitos de la muestra, entre estas se tiene el paso de escaneo, el tiempo de recolección, el rango, el voltaje y la corriente del tubo de rayos X [46]

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética ionizante de elevada energía y corta longitud de onda. Cuando un haz de rayos X incide sobre una muestra cristalina o no cristalina, parte de este haz se dispersa en todas las direcciones a causa del acomodo cristalino de los átomos.

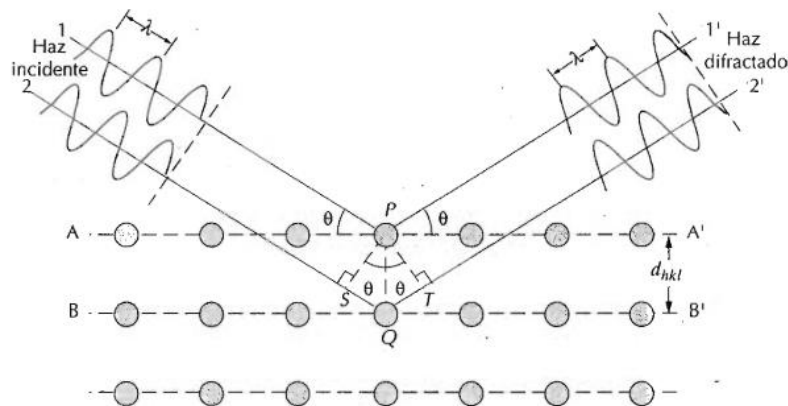


Figura 2-6 Difracción de rayos X por los planos atómicos. Fuente: [40]

En la figura 2-6 se observan dos rayos que inciden con el mismo ángulo θ sobre un arreglo cristalino de átomos en dos dimensiones, donde se asume que las líneas A-A' y B-B' representan dos planos cristalinos paralelos con los mismos índices de Miller h, k y l. La figura muestra que uno de los rayos es difractado por el plano A-A' mientras que el otro es difractado por el plano B-B'. Como consecuencia de la interacción entre los haces difractados se pueden presentar dos: en el primero, los haces pueden presentar interferencia destructiva, por lo cual, la intensidad de la radiación por los haces difractados al lado opuesto de la incidencia será mínima (casi cero); en el segundo caso, los haces presentaran interferencia constructiva, generándose valores de intensidad de radiación diferentes de cero al lado opuesto de la incidencia de los rayos. Considerando que los planos AA' y BB' presentan los mismos índices de Miller h, k y l. La ley de Bragg muestra que la interferencia constructiva va a depender parámetros como el ángulo de incidencia Θ y longitud de onda λ de los rayos X y de la distancia de separación entre los planos con iguales índices de Miller (distancia interplanar d_{hkl}) en la estructura cristalina. La relación que muestra esta dependencia se presenta a continuación [40] :

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta$$

Donde n es el orden de la difracción.

En un ensayo por DRX se obtiene como resultado un perfil de difracción de rayos X como el presentado en la figura 2-6. En la imagen se presenta la gráfica de la intensidad normalizada de luz detectada (I/I_{max}) en función de 2 veces el ángulo de incidencia de los rayos X (2θ). En los perfiles de difracción de muestras policristalinas se presenta la formación de picos de difracción a determinados valores de 2θ . Cuando se busca obtener un compuesto cristalino en estado puro, en la gráfica sólo deben aparecer los picos característicos de las fases cristalinas que presenta este compuesto, si en el resultado aparecen picos adicionales se considera que en la muestra existe la presencia de fases indeseadas que se conocen como fases espurias. Por ejemplo, en el trabajo de donde se tomó la imagen de la figura se pretendía obtener el compuesto NiFe_2O_4 y en el como resultado se obtuvieron todos los picos característicos de este compuesto, estos corresponden a los picos indexados con los índices de Miller (hkl) de los planos que generan la difracción en esos ángulos de incidencia. Sin embargo, en la gráfica también se presente un pico en $2\theta = 33^\circ$ aproximadamente, este pico no es característico del compuesto deseado y, por lo tanto, se ha identificado como fase espuria [47].

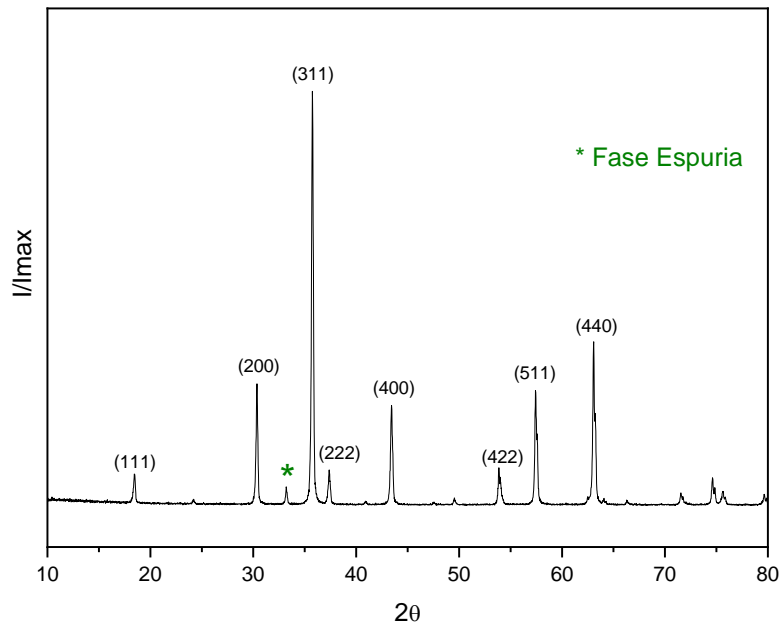


Figura 2-4 DRX de Fe-Ni sintetizado con pH 0. Fuente: [47]

Otro tipo de información que se puede obtener a partir de la DRX en polvos de material cristalino es el tamaño de cristalito, concepto que ya fue descrito en la sección 2.3.2 y que puede ser igual o menor al tamaño de las partículas. El tamaño de cristalito se puede obtener por el método de Scherrer, aplicando la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Donde:

- τ , corresponde al tamaño de cristalito.
- k , es un factor de forma de valor menor a la unidad. Si se considera que las partículas son esféricas generalmente se usa un valor de $k=0.9$.
- λ , es la longitud de onda de los rayos X usados.
- β , es el ancho del pico de difracción más intenso a la altura media que debe estar expresado en radianes.
- θ , corresponde al ángulo de incidencia dónde se presenta el pico de difracción más intenso.

Generalmente, se considera que una muestra es más cristalina cuando el tamaño de cristalito es grande y en este caso en el perfil de difracción los picos correspondientes a la

fase deseada son muy finos (β es pequeño). Por otro lado, cuando los cristalitos son muy pequeños, en el orden de unos pocos nm, los picos son muy anchos. En este caso, cuando los picos característicos están en un pequeño rango de valores de 2θ , se puede presentar traslapamiento entre ellos. En otras palabras, cuando los cristalitos de una muestra son muy pequeños, un pico del perfil obtenido podría contener varios picos de la fase deseada o inclusive picos de fases espurias.

2.5.2 Microscopia óptica

La microscopia óptica utiliza una serie de lentes e iluminación para estudiar la microestructura de materiales. El microscopio posee una óptica doble (objetivo y ocular) y su resolución máxima está dada por los fenómenos de difracción en el borde del objetivo, esto implica la distinción de objetos de tamaño de una micra. Además, es útil para determinar propiedades macroscópicas tales como, fracturas, texturas y tamaño de poro, aunque se puede analizar cualquier tipo de material, esta técnica se ve limitada por su resolución lateral(0,1 mm) [48]. El conocimiento de la microestructura permite al investigador determinar el historial del material de acuerdo a con las especificaciones iniciales[49].

2.5.3 Microscopia electrónica

En el área de los materiales existen dimensiones inferiores a las micras y por tanto para su caracterización es necesario utilizar microscopios con mayor poder resolutivo que los ópticos, aparecen instrumentos que utilizan otras radiaciones diferentes a la luz visible para crear la imagen [50], dos de los microscopios más utilizados en el análisis de propiedades de muestras son el microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio electrónico de transmisión (TEM). En la tabla 2-3 se relacionan las ventajas y limitaciones de estos instrumentos.

Tabla 2-4 Comparación técnicas de microscopia electrónica (MEB- TEM)

Instrumento	Resolución	Funcionamiento	Ventajas	Desventajas
Microscopio electrónico de barrido (MEB)(Scanning Electron Microscope, en inglés, SEM)	1 nm	Los electrones son emitidos por un cátodo de tungsteno a través de un tubo de vacío. El haz de electrones es colimado por una serie de lentes electromagnéticas y se desplaza sobre la superficie de la muestra, obteniendo una imagen a partir de las señales emitidas por el material[50].	Fácil manejo. Elevada profundidad de campo.	Las muestras deben ser sólidas, metálicas o bañadas en oro. Puede afectar la muestra. Alto costo. Imágenes a blanco y negro.
Microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscope, en inglés, TEM)	0,1 nm	Funciona como un MEB, sin embargo, para formar la imagen se toma la señal proveniente de los electrones transmitidos a través de la muestra[48].	Aumento más potente. Imágenes de alta calidad y detalladas. Fácil manejo.	Alto costo Las muestras se limitan a aquellas que son transparentes a los electrones. Imágenes a blanco y negro. Preparación laboriosa de la muestra.

3. Metodología

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados para el desarrollo de este proyecto de grado, la cual se dividió en cuatro partes. La primera y segunda parte, consistieron en la obtención del precursor de la hidroxiapatita. La tercera parte consiste en la molienda mecánica, relaciona modelamiento cinemático para la energía entregada durante la colisión de los materiales y el proceso de molienda en el molino planetario. La cuarta y última parte comprendió la caracterización de las muestras pulverizadas por medio de la difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

3.1 Materiales

En la tabla 3-1 se relacionan los materiales utilizados en la obtención del precursor de la hidroxiapatita, así como en los procesos de molienda mecánica para la formación de polvos de hidroxiapatita a partir de hueso de cerdo.

Tabla 3-1 Reactivos e instrumentación utilizados para la producción de hidroxiapatita de origen animal

Reactivos	Instrumentos
Hueso de cerdo (Fémur)	Olla de presión
Acetona	Mufla
Agua destilada	Mortero
	Molino planetario de bolas

En la presente investigación, se obtuvo el precursor de hidroxiapatita a partir de hueso cerdo por el protocolo indicado por [3] y, posteriormente la muestra fue sintetizada por el método de molienda mecánica con parámetros establecidos experimentalmente. En la Figura 3-1 se relacionan los pasos utilizados para la producción de HA biológica.

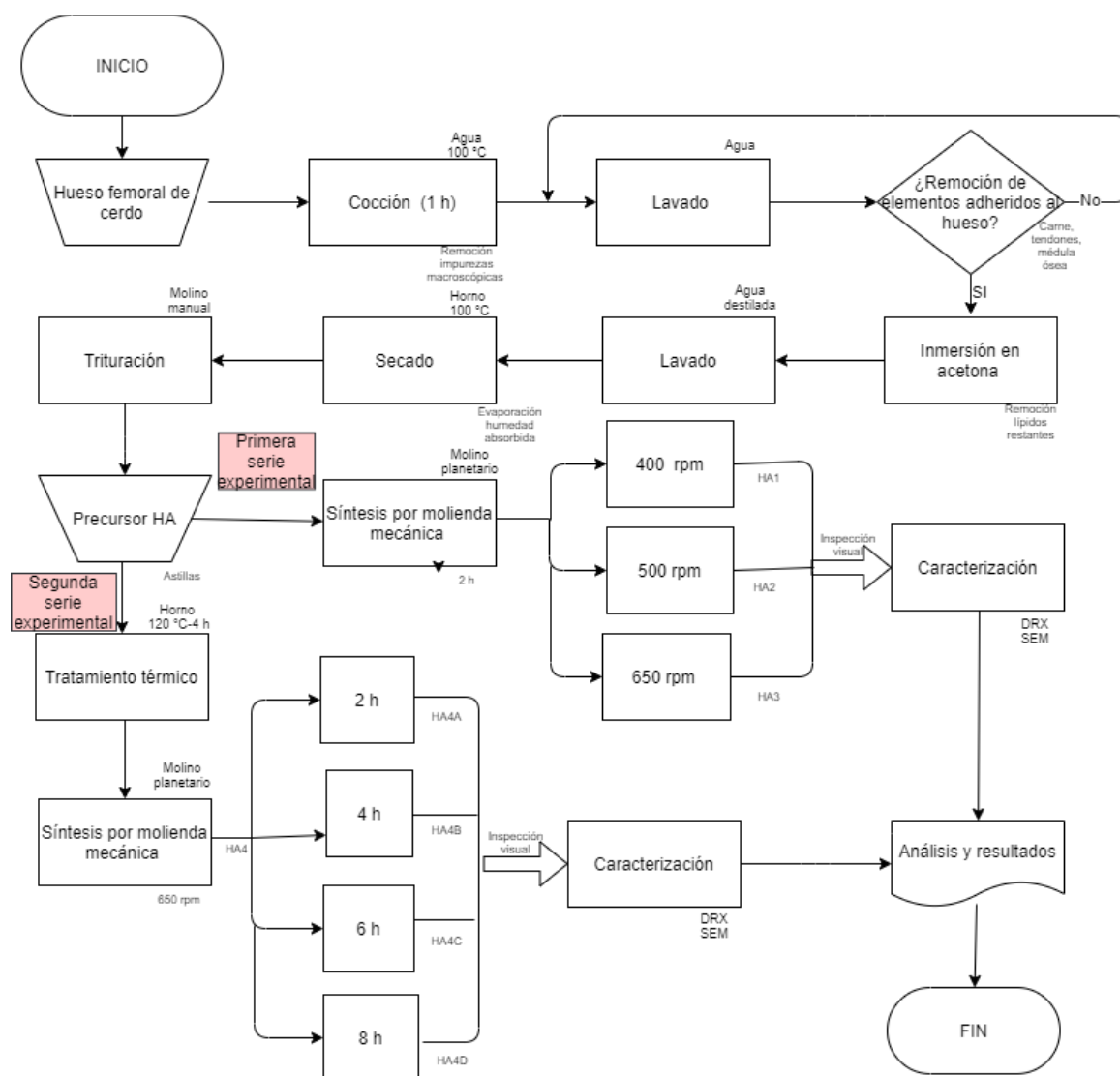


Figura 3-1 Diagrama de flujo para el proceso de elaboración de hidroxapatita biológica

3.2 Preparación del precursor para molienda mecánica

En la primera etapa de obtención de HA se utilizaron huesos femorales de cerdo como materia prima, los cuales fueron obtenidos en una carnicería local. Inicialmente, los huesos fueron sometidos a un proceso de cocción en agua durante 1 h, con el propósito de remover impurezas macroscópicas. Terminado este proceso, se desecharon las rotulas, la medula espinal, los tendones y demás tejidos blandos. Posteriormente, los huesos fueron sometidos a un lavado convencional con agua, hasta eliminar los elementos adheridos.



Figura 3-2 Dos imágenes de hueso femoral de cerdo sometido a proceso de cocción por 1 h y lavado convencional.

El anterior proceso no garantizó la eliminación total de sus componentes orgánicos y lipídicos, por lo que fue necesario sumergirlo en acetona durante 1 h. La acetona es un compuesto químico que facilita la eliminación de grasas e impurezas de materiales. Una vez transcurrida 1 h se lavó con agua destilada con la intención de completar el proceso de eliminación de posibles contaminantes de los componentes óseos. Terminadas las etapas de lavado se realizó una etapa de secado en un horno tipo mufla durante 1 h a 100 °C. Una vez eliminada la fase orgánica del hueso, se conservan las diáfisis, que corresponden a los segmentos cilíndricos localizados entre los extremos de los huesos largos y que tienen alto contenido mineral.



Figura 3-3 Huesos posterior a su inmersión en acetona, lavado (agua destilada) y secado en mufla durante 1 h a 100 °C

Las diáfisis conservadas son sometidas a un proceso de trituración con herramientas manuales de corte y fracturación con el objetivo de reducir el tamaño de los fragmentos del precursor, con el fin de facilitar procesos posteriores de molienda mecánica en el molino planetario de bolas.

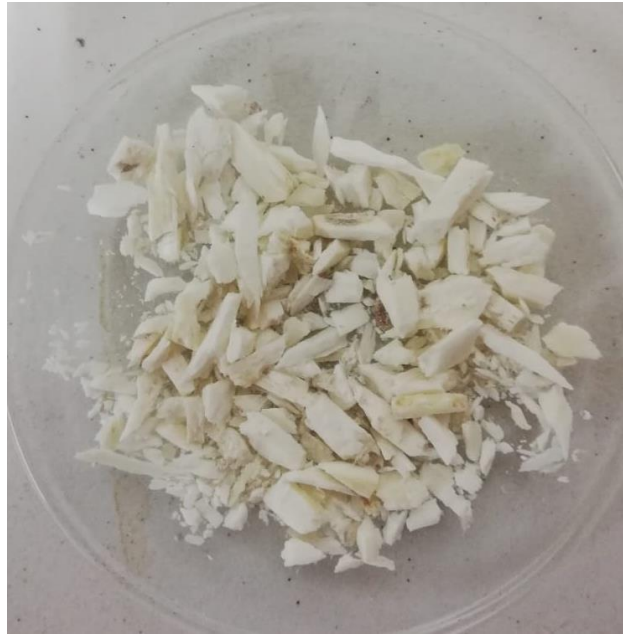


Figura 3-4 Astillas de hueso de cerdo sometidas a un proceso de trituración

3.3 Molienda mecánica

Para la obtención de polvo de hidroxiapatita, los precursores conseguidos previamente fueron sometidos a molienda mecánica usando un molino planetario Fritsch Pulverisette 6 existente en la Universidad Antonio Nariño sede Tunja. El molino incluye bolas de 10 mm de diámetro y jarros de acero inoxidable.

Es importante resaltar que la información reportada en la literatura acerca de la ruta de obtención de polvos de hidroxiapatita usando un molino planetario es limitada, por lo tanto, los parámetros usados en el proceso de molienda son desconocidos y se requiere determinarlos experimentalmente. Considerando que las condiciones de molienda están ligadas a las propiedades de los materiales en polvos molidos, este trabajo busca controlar variables tales como, el número de bolas, velocidad de rotación del disco y tiempo de molienda.

3.3.1 Modelamiento cinemático

La molienda mecánica es un método que depende de muchos parámetros experimentales, su principal dificultad consiste en establecer valores exactos de experimentación que faciliten la formación de nuevas fases cristalinas. Sin embargo, el aporte de los modelos teóricos existentes facilita la búsqueda y verificación de la mejor forma de obtención de polvos, de acuerdo con la energía entregada por los parámetros establecidos en cada uno de los procesos.

Para el estudio del comportamiento de la energía total transferida a la muestra pulverizada en su síntesis por molienda mecánica en relación con las variables configuradas en el molino planetario, se hace necesario el uso de Matlab como software de simulación para diferentes parámetros, tales como las velocidades de giro del disco, tiempo de molienda y valores fijos del molino.

En la simulación, se asume el modelo cinemático para calcular la energía cinética transferida por colisión (E_k) propuesto por Abdellaoui y Gaffet, allí se considera que el movimiento de la bola es lineal y uniforme, durante su trayectoria, la velocidad se mantiene constante y la energía cinética transferida es calculada a partir de las velocidades angulares y la geometría del jarro y las bolas (ver Ecuación (2.1)).

$$E_k = \frac{1}{2} m_b \{ [-r_p w_p + (r_v - r_b) w_v \text{sen} \alpha_d]^2 + [(r_v - r_b) w_v \text{cos} \alpha_d]^2 \} \quad (3.1)$$

Donde m_b es la masa de la bola, r_p y r_v son los radios del jarro y del disco respectivamente, w_p y w_v son las velocidades de giro del jarro y del disco, r_b es el radio de la bola y α_d representa el ángulo de desprendimiento de la bola y equivale a $-0,350403179$ rad para un molino planetario Fritsch Pulverissite.

Para calcular la potencia transferida (P) al material por colisión, además de la energía cinética transferida, se tiene en cuenta el número de bolas involucradas (N_b), la frecuencia de colisión (f_1) y un factor de corrección k (ver Ecuación (2.2))

$$P = E_k (N_b f_1) k \quad (3.2)$$

La energía acumulativa (E_{cum}) es la energía total transferida al material y se obtiene a partir de la ecuación 2.3.

$$E_{cum} = \frac{Pt}{M_p} \quad (3.3)$$

Donde t es el tiempo total de molienda y M_p es la cantidad del material utilizado en el proceso [42].

Se utilizan las ecuaciones mencionadas anteriormente en Matlab, en función del tiempo de molienda, la relación masa bola: masa polvo ($M_b:M_p$) y la velocidad angular del disco. Para su simulación, el radio y masa de cada bola fue 0.006 m y 0.0067 kg respectivamente y se mantuvo una relación $M_b:M_p$ 20:1. Las velocidades angulares del disco evaluadas fueron desde 150 hasta 650 rpm y los tiempos establecidos fueron 2, 4, 6, 8 y 10 h. Los valores relacionados anteriormente, fueron estimados según el rango de velocidades que permite trabajar el molino planetario, buscando un tiempo óptimo en la obtención de hidroxiapatita natural.

Dicha simulación permitió conocer el rango de energía y potencia entregada a la muestra por los diferentes parámetros configurados durante el proceso de molienda mecánica. La tasa de transferencia de energía por colisión dentro de los jarros al material tiene un efecto importante en la composición de la muestra, como se discutirá más adelante. De allí, la importancia de conocer los factores involucrados en las variables del molino planetario, tales w_v , $M_b:M_p$ y t .

3.3.2 Proceso de Molienda

Para la síntesis de hidroxiapatita, HA, por molienda mecánica en el molino planetario, se establece una relación $m_b:m_p$ 20:1. Para 4 gr de polvo se necesitan 80 g de bolas, teniendo en cuenta que cada una pesa 4 g, entonces, para mantener la relación 20:1 se utilizan 20 bolas.

Se establece tres velocidades de giro de acuerdo con las simulaciones entregadas por el modelamiento cinemático (ver sección 2.3.1) 400, 500 y 650 rpm con un tiempo constante de 2 horas.

Inicialmente, se incorporaron 4 g de hueso triturado y las 20 bolas en el jarro. El jarro se situó en el molino planetario asegurándose de montarlo adecuadamente y equilibrando el peso dentro del sistema. Finalmente, se configura una velocidad de 400 rpm por 2 horas, sin reversa. Una vez transcurridas las 2 horas se extrajo el polvo, además se esterilizó el jarro y las bolas con acetona para evitar que las partículas en su interior contaminen los

trabajos posteriores, este proceso se hace necesario en cada una de las etapas de la molienda para las diferentes muestras.



Figura 3-5 Mecanosíntesis de precursor para la obtención de HA. a) Astillas de hueso de cerdo y 20 bolas de acero inoxidable, b) Jarro sellado y c) Jarro posicionado en el molino planetario.

Nuevamente, se incorporan 4 g de hueso triturado en el jarro del molino, se configuran 2 horas de molienda, sin reversa, sin embargo, esta vez la velocidad angular del disco se ajusta a 500 rpm. Finalmente, la última muestra se configuró a una velocidad de giro de 650 rpm, manteniendo las mismas condiciones de tiempo y dirección de giro.

Como el objetivo de esta investigación es estudiar la influencia que tiene la molienda mecánica en la formación de polvos de hidroxiapatita para diferentes parámetros experimentales, se propone un segundo conjunto de variables del molino planetario, se establece: $w_p=650$ rpm, $m_p:m_b= 20:1$ y $0 < t < 8$ h.

Se situó 4 gr del precursor de HA en el jarro, junto a 20 bolas a 650 rpm por 2 horas, sin reversa y una vez transcurrido el tiempo, se extrajo 1 g del polvo. Entonces, para 3 g de polvo, se extrajeron 5 bolas, manteniendo la condición 20:1 y se continúa el proceso de molienda por otras 2 horas. El proceso se repite hasta completar 8 horas, teniendo en cuenta la extracción de muestra (1 g) cada 2 horas, conservando la relación masa bola: masa polvo.

Tabla 3-2 Parámetros de molienda: segunda serie experimental (muestra HA4), se mantiene la misma relación $m_b:m_p= 20:1$ para todos los procesos

Muestra HA4			
Muestra	Tiempo (h)	Masa muestra (g)	Número de bolas
HA4A	2	4	20
HA4B	4	3	15
HA4C	6	2	10
HA4D	8	1	5

La Tabla 3-2 contiene las condiciones experimentales para la muestra HA4 sometida a síntesis por molienda mecánica, indicadas a una velocidad constante de giro del disco de 650 rpm.

Considerando que el proceso previamente descrito es una técnica en seco, se tienen en cuenta factores como la humedad y posibles contaminantes por lo que las muestras se conservaron en un recipiente esterilizado y con cierre hermético.

3.4 Caracterización de los polvos obtenidos

A continuación, se describen las técnicas y equipos utilizados para caracterizar los polvos sometidos a síntesis mecánica en el molino planetario.

3.4.1 Difracción de Rayos X

Se realizó la caracterización por DRX para determinar las fases presentes y el tamaño del cristalito de los polvos obtenidos por molienda mecánica.

Las muestras de HA1, HA2, HA3 Y HA4D se caracterizaron en el difractómetro Bruker D4 Endeavor – Detector LYNXEYE existente en el laboratorio geología, geoquímica y geofísica (Gmas) en Bogotá, en las siguientes condiciones: tubo de rayos X Cu (K Alpha $\lambda = 1,5406$), filtro de Niquel, con 2θ : 5-70°, tamaño del paso 0,015 y velocidad de barrido: 1 segundo por paso.

Para la identificación de los picos característicos de HA en cada polvo, fue necesario comparar los difractogramas obtenidos con las hojas de datos estándar de la base de datos ICSD.

3.4.2 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Se analizaron características como la morfología y tamaño de partícula en un Microscopio Electrónico de Barrido JMS-6010LA existente en el Centro de Materiales y Ensayos – SENA, usando un bombardeo de electrones con 16 kV. Las micrografías MEB de las muestras pulverizadas se obtuvieron a magnificaciones de 500, 2000 y 5000x.

4. Resultados y discusiones

En este capítulo se presentarán y discutirán los resultados del desarrollo de este trabajo de grado. Se abarcarán cuatro apartados principales que reflejan el orden cronológico del desarrollo de la parte experimental del proyecto.

4.1 Simulación modelamiento cinemático

A partir de modelamiento cinemático descrito en la sección 3.3.1, se obtienen las simulaciones de la transferencia energía total a los polvos en función de la velocidad angular del disco y del tiempo de molienda establecidos empíricamente, manteniendo una relación $m_b:m_p$ 20 :1, para las dos series experimentales.

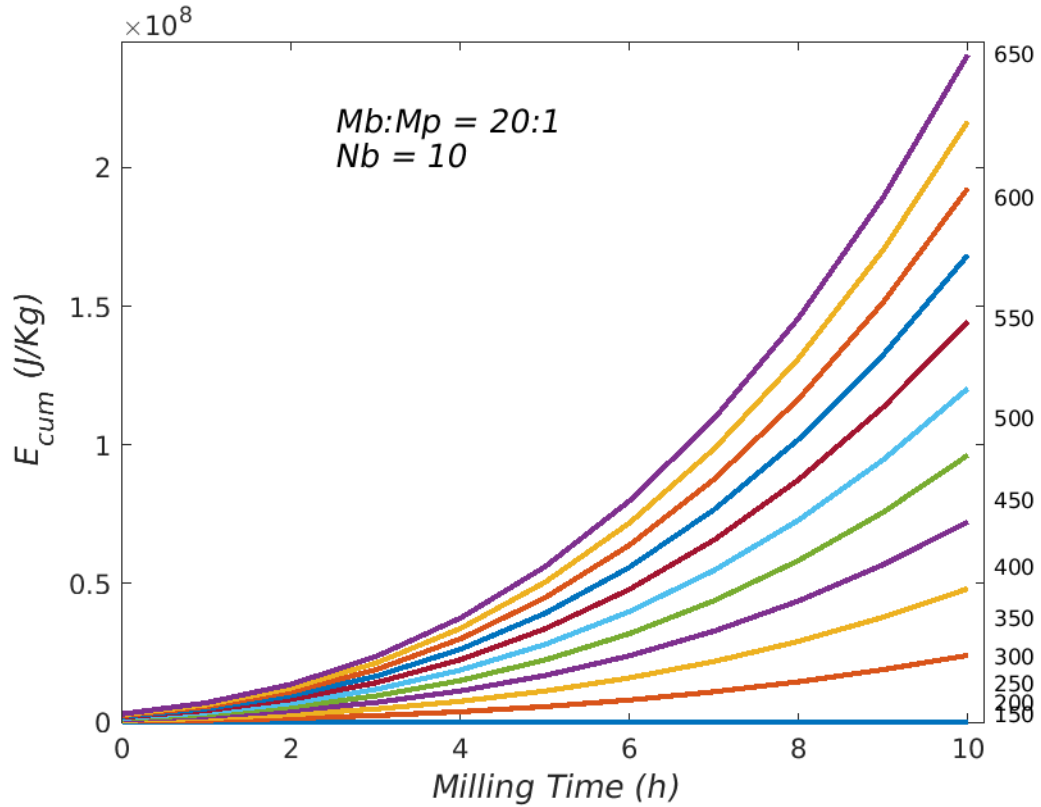


Figura 4-1 Efecto del tiempo de molienda en la energía acumulativa para diferentes velocidades angulares del disco (Indicadas a la derecha de la figura).

La Figura 4-1 hace referencia a la dependencia de la energía acumulativa respecto al tiempo de molienda y a la velocidad de giro del disco, se observa el aumento de la energía transferida con el incremento de los parámetros evaluados.

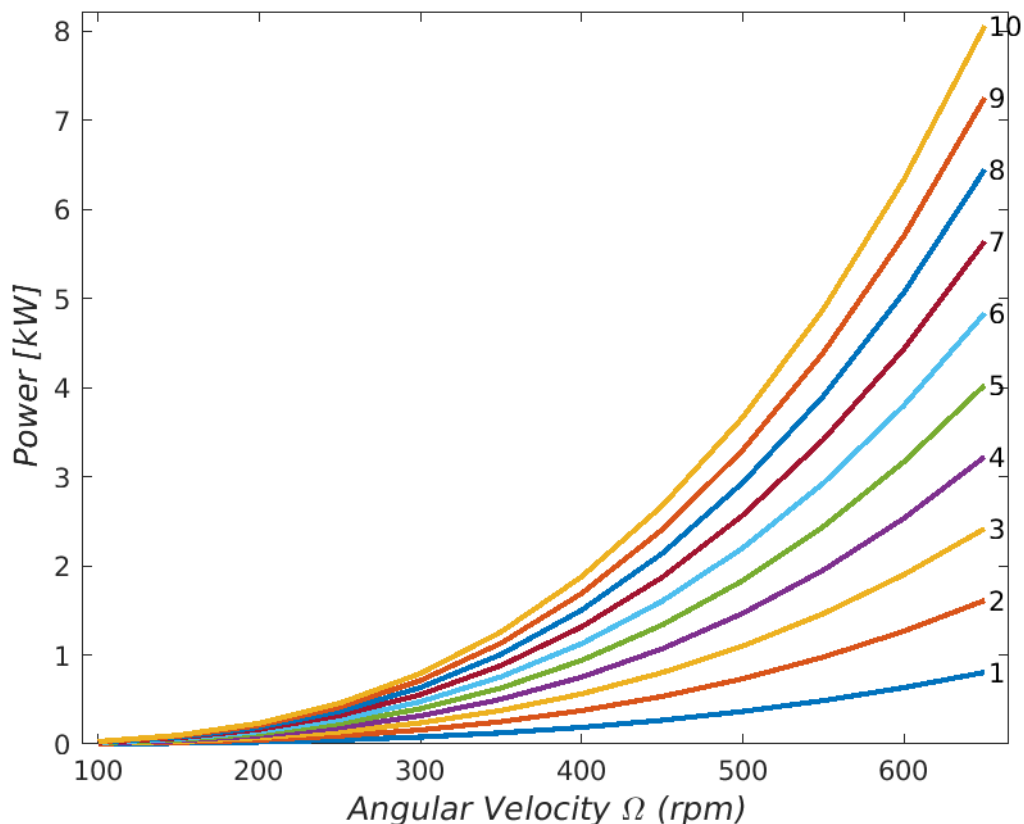


Figura 4-2 Potencia transferida al material durante la mecano-síntesis en función de la velocidad angular del disco y el número de bolas (indicadas a la derecha de la figura).

En la Figura 4-2 se observa la potencia transferida al material en función de la velocidad de giro del disco, en la simulación se consideran 10 bolas, la potencia aumenta de acuerdo con el incremento de la velocidad angular del disco, a su vez, el número de bolas implica un aumento en la transferencia de la potencia.

4.2 Molienda mecánica

4.2.1 Primera serie experimental

Se evaluó por medio de inspección visual directa las muestras sometidas a molienda mecánica usando el primer conjunto de parámetros configurables en el molino ($w_p= 400$, 500 y 650 rpm, $m_b:m_p=20:1$, $N_b=20$ y $t=2$ h) con el objetivo de verificar la calidad del polvo obtenido.



Figura 4-3 Primera serie experimental, a) HA1, b)HA2 y c)HA3 con condiciones de molienda: $w_p = 400, 500$ y 650 rpm respectivamente, $m_b:m_p = 20:1$ ($N_b = 20$ bolas) y $t = 2$ h. En la figura 4-3 se observan las muestras correspondientes a HA1, HA2 Y HA3, que fueron sometidas a diferentes velocidades de giro del disco. A partir de principio de la molienda como método de síntesis y la maleabilidad de los polvos obtenidos, es posible deducir que, a mayor energía entregada, las partículas sufren un proceso de cohesión y aglomeración.



Figura 4-4 Efectos del incremento de la velocidad de giro del disco en la muestra (a), bolas (b) y jarro (c y d)

Como consecuencia, al aumentar la velocidad de giro, los polvos sufrieron un proceso abrasión (ver Figura 4-4). El jarro y las bolas involucradas en el proceso de síntesis también se vieron afectados durante la colisión de los mismos, considerando que el material implicado en el diseño de los elementos (acero inoxidable) es adecuado para muestras semiduras. Hay un aumento de energía durante la colisión de los elementos y, en consecuencia, hay una pérdida considerable de muestra, que es atrapada en la superficie del jarro y de las bolas.

La abrasión como mecanismo de fractura, genera fricción entre las superficies de las bolas, el jarro y la muestra, genera polvos más finos por la disipación de calor. No obstante, el calor entregado a los polvos es excesivo a 600 rpm, generando que estos se calcinen completamente.

Tabla 4-1 Cantidad de las muestras recolectadas de acuerdo con la velocidad angular configurada. HA1= 400 rpm, HA2=500 rpm y 7 HA=650 rpm.

Muestra	HA1	HA2	HA3
Peso del polvo recuperado (g)	2,1	1,4	0,77

En cuanto a la cantidad de muestra recuperada en cada uno de los procesos (Tabla 4-1), la velocidad angular más adecuada del disco hasta el momento parece ser 400 rpm. Considerando que la muestra inicial en cada uno de los procesos es de 4 g, de la muestra HA1 se recupera 2,1 g y sin presencia de astillas, aparentemente se obtiene un polvo maleable. La muestra perdida en cada uno de los procesos no fue posible recuperarla, pues se incrustaron en las bolas y paredes del jarro.

4.2.2 Segunda serie experimental

A partir de lo observado en la primera serie experimental, se plantea un tratamiento térmico previo a la mecano-síntesis a 120 °C durante 4 horas en un horno tipo mufla.



Figura 4-5 Segunda serie experimental, condiciones de molienda: $w_p=650$ rpm, $m_p:m_b= 20:1$ y $0 < t < 8$ h.

En el segundo grupo experimental, se evalúa una sola muestra en un periodo de 8 horas a 650 rpm, en la Figura 4-5 se observa la evolución de la muestra HA4 en el tiempo. Inicialmente, a las 2 horas, las astillas no parecen tener cambios significativos, a excepción de algunas fracturas (a). A 4 y 8 horas las partículas parecen soldarse (b y c) como se indican en las etapas de síntesis por molienda mecánica (ver sección 2.4), sin embargo, no es posible asegurar dicha afirmación, también podría deberse a que las astillas involucradas en el proceso no eran lo suficientemente pequeñas, lo que dificultó el proceso de fractura. Eventualmente, a las 8 horas se obtuvo la muestra pulverizada como se observa en la imagen d, sin embargo, aún se aprecian fragmentos grandes de hueso.

A diferencia de la primera serie experimental, los jarros y bolas no sufren ningún cambio durante la colisión con la muestra. Lo que indica que, si bien el proceso no afecta la composición de tales elementos y, por lo tanto, no hay pérdida de la muestra. No se logra obtener polvos completamente maleables, esto, posiblemente ocurra debido a la naturaleza del hueso y procesos involucrados mencionados anteriormente.

4.3 Difracción de Rayos X

Los estudios de DRX de los polvos sintetizados a diferentes condiciones de molienda mecánica son ilustrados en las figuras 4-6 y 4-7. La interacción que acontece en el material se lleva a cabo como se muestra en los patrones de DRX, donde se muestra los planos que presentan interferencia para el Θ representado.

Los perfiles muestran picos que no están bien definidos, sin embargo, es posible que los picos característicos de la estructura cristalina de la hidroxiapatita estén traslapados debido a la presencia de cristales muy pequeños, como se describe en la sección 2.5.1, dando lugar a la forma de los perfiles obtenidos en los difractogramas.

La figura 4-6 presenta los resultados de DRX para los polvos sometidos a un proceso de molienda con un tiempo de 2 horas y con velocidades de giro de 400, 500 y 650 rpm. Se observa que la velocidad angular del disco no tiene incidencia marcada sobre la cristalinidad del polvo resultante, se mantiene el mismo comportamiento en cada una de las muestras. Basados en la ecuación de Scherrer, se dice que la cristalinidad de la muestra depende del grosor de los picos de difracción, por lo que, al ser inversamente proporcional al tamaño del cristalito, es posible respaldar el análisis de traslapamiento de picos. A partir del patrón de referencia de hidroxiapatita HA ICSD 082289, se compara los picos de los resultados obtenidos por DRX, evaluando el ancho del pico más intenso, se entiende que los cristalitos presentes en la muestra son tan pequeños, que ocasiona que tal pico rodee a los picos característicos que deberían aparecer.

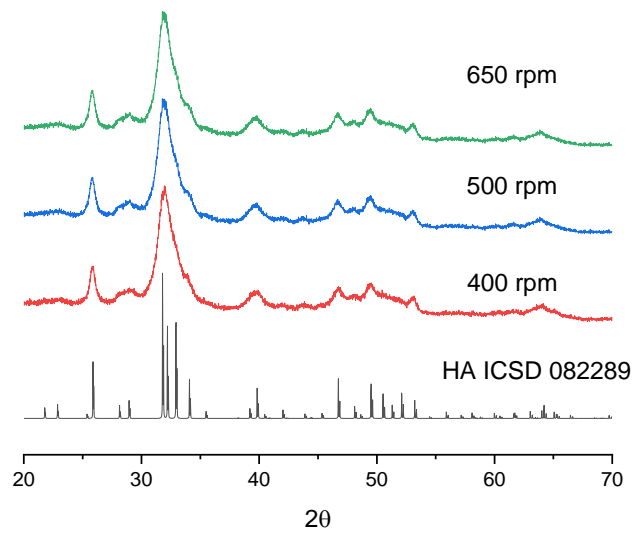


Figura 4-6 Perfil DRX de los polvos de HA1, HA2 y HA3 obtenidos por procesos de mecano-síntesis con un tiempo de 2 h y a tres diferentes velocidades de giro: 400, 500 y 650 rpm comparadas con el patrón de referencia HA ICSD 082289.

La figura 4-7 contiene el perfil de difracción de rayos X para la muestra HA4D de la segunda serie experimental sometida a 650 rpm por 8 horas, pues fue la única muestra que cumplió con los requerimientos del estudio.

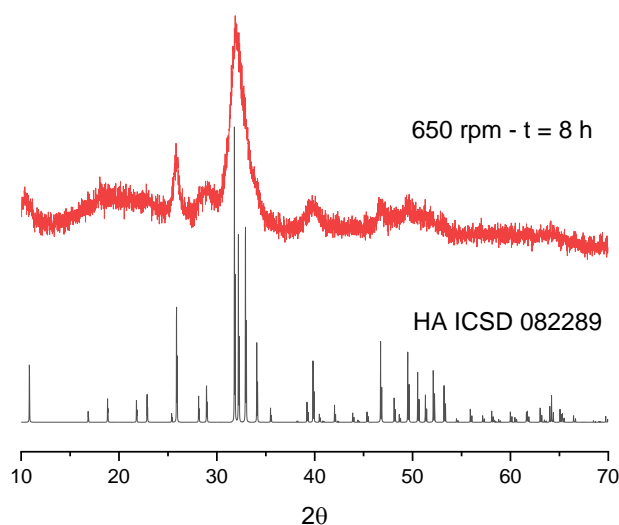


Figura 4-7 Perfil DRX de la muestra HA4D obtenida por procesos de mecano-síntesis por 8 horas a 650 rpm, compara con el patrón de referencia HA ICSD 082289.

Los patrones de difracción son similares, aunque la muestra HA4 molida por 8 horas evidencia un aleo amorfo, se considera la naturaleza del hueso y a la transferencia de energía al material por las colisiones de los elementos dentro del jarro como principales causas. Si bien las astillas de hueso trituradas fueron tomadas del mismo grupo de la primera serie experimental, tratadas en condiciones ambientales iguales de obtención y almacenamiento, la naturaleza del hueso puede diferir en la influencia que tuvo las muestras a tratadas 120 °C y posible contaminación cruzada que hubo en el proceso. Por otro lado, basados en la simulación de los parámetros de molienda y lo observado en el patrón HA4D, la energía entregada al material por la colisión en el molino planetario tiene un aumento lineal de acuerdo al tiempo de molienda, por lo que, a 650 rpm por 8 horas, se

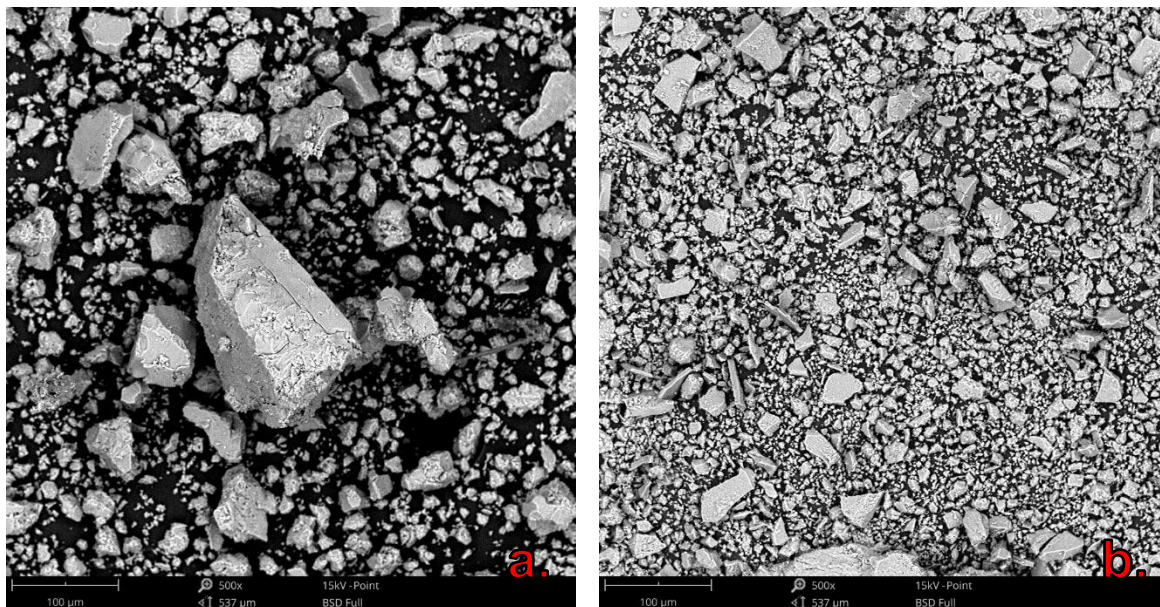
considera un parámetro excesivo para la obtención de HA cristalina. De la misma forma, hay presencia de picos formados en los polvos HA3 que no aparecen en la muestra HA4D.

El material no debe ser sometido a temperaturas previas a su síntesis por molienda mecánica, en trabajos futuros se debe estudiar que tratamientos se debe realizar a los polvos posterior a la molienda, con el objetivo de optimizar su cristalinidad.

Apoiados en el trabajo reportado por Giraldo-Betancur et. al, quienes obtuvieron resultados similares (Ver figura 2-3) para el caso de la difracción de la muestra “desgrasar”, se puede entender que la presencia de fase orgánica en las astillas ocasiona porcentajes de cristalinidad más bajos.

4.4 Microscopia Electrónica de Barrido

Las figuras 4-8, 4-9 y 4-10 muestran los resultados de la microscopia electrónica de barrido de muestras pulverizadas de hueso de cerdo a diferentes aumentos (500, 2000 y 5000x), obtenidos con: velocidades de giro de disco de 400 rpm (HA1), 500 rpm (HA2) y 650 rpm (HA3), y con un tiempo de molienda de 2 horas, y finalmente, la imagen d corresponde a la muestra HAD4 con tratamiento térmico previo molida a 650 rpm por 8 horas.



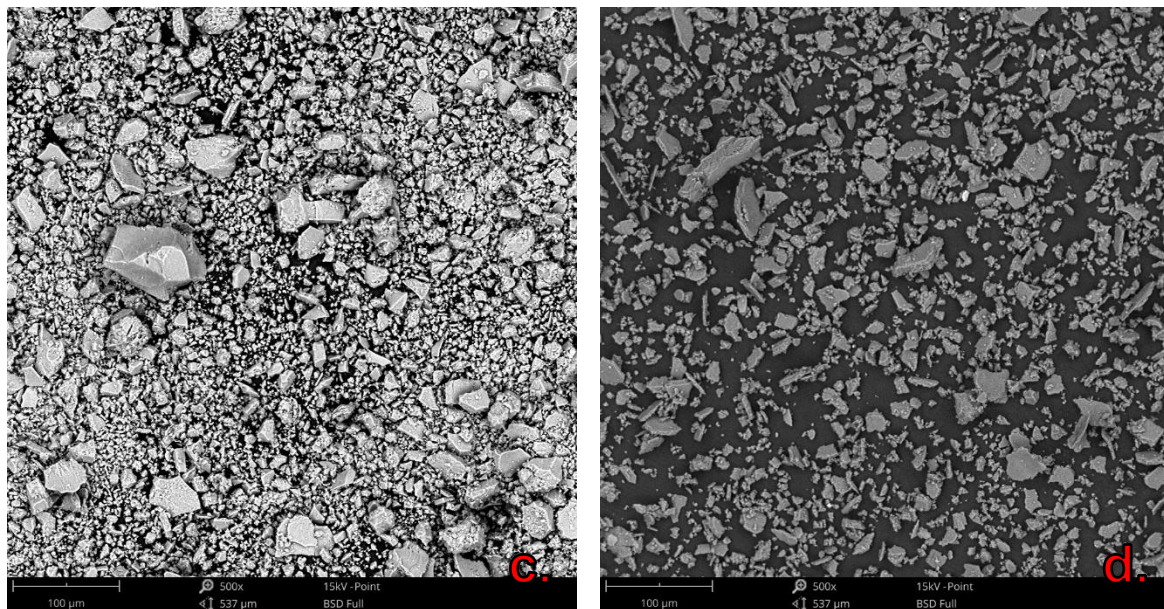


Figura 4-8 MEB de polvos sintetizados por molienda mecánica, tres de ellas molidas por 2 horas a: a) 400 rpm, b) 500 rpm y c) 650 rpm. La imagen d corresponde a la muestra sometida a tratamiento térmico previo (120 °C) y molida por 8 h a 650 rpm. 500x

Las figuras 4-8 presenta las imágenes de microscopía electrónica de barrido con aumento de 500x de las muestras pulverizadas de hueso de cerdo, siendo que las figuras a, b y c corresponden a las muestras obtenidas con tiempo de molienda de 2 h y con velocidades de giro de disco de 400 rpm (HA1), 500 rpm (HA2) y 650 rpm (HA3), respectivamente, y la figura d corresponde a la muestra HAD4 con tratamiento térmico previo molida a 650 rpm por 8 horas. Se pueda apreciar que las muestras obtenidas con tiempo de molienda por 2 h a 400 rpm es la que presenta fragmentos de mayor tamaño y en la que se presenta menor reducción de tamaño de las partículas. Por otro lado, la muestra obtenida con tiempo de molienda por 2 h a 500 rpm es la que presenta mayor homogeneidad en cuanto a la distribución de tamaños de partícula y en la que se puede apreciar mayor reducción del tamaño de partícula. La muestra obtenida con tiempo de molienda de 2h a 650 rpm, presenta algunos fragmentos de material con tamaño superior a los obtenidos en la muestra molida a 500 rpm, esto se podría ser indicativo de que en estas condiciones empiezan a aparecer los procesos de soldadura entre partículas típicos de los procesos de molienda y que concuerdan con lo descrito en la sección 4.2.1 donde se mencionó que las muestras obtenidas en estas condiciones presentaron adherencia a las bolas y el frasco usados para la molienda. Las muestras obtenidas con tratamiento térmico previo a la molienda y molidas durante 8 h a 650 rpm presentan una distribución de partículas

semejante a las por molienda durante 2h a 500 rpm, sin embargo, en estas muestras se percibe que la cantidad de partículas pequeñas es levemente menor.

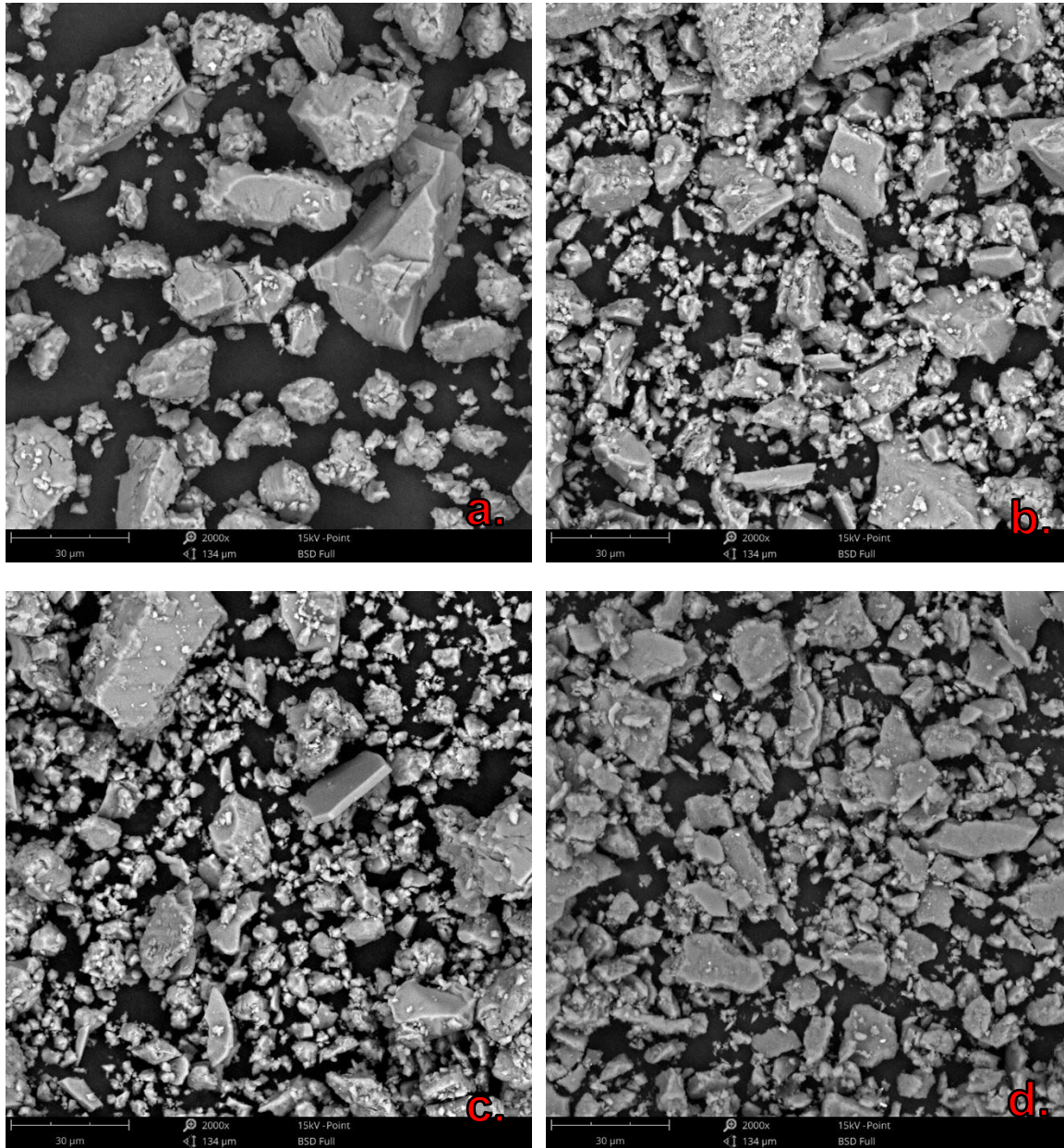


Figura 4-9 MEB de polvos sintetizados por molienda mecánica, tres de ellas molidas por 2 horas a: a) 400 rpm, b) 500 rpm y c) 650 rpm. La imagen d corresponde a la muestra sometida a tratamiento térmico previo (120 °C) y molida por 8 h a 650 rpm. 2000x

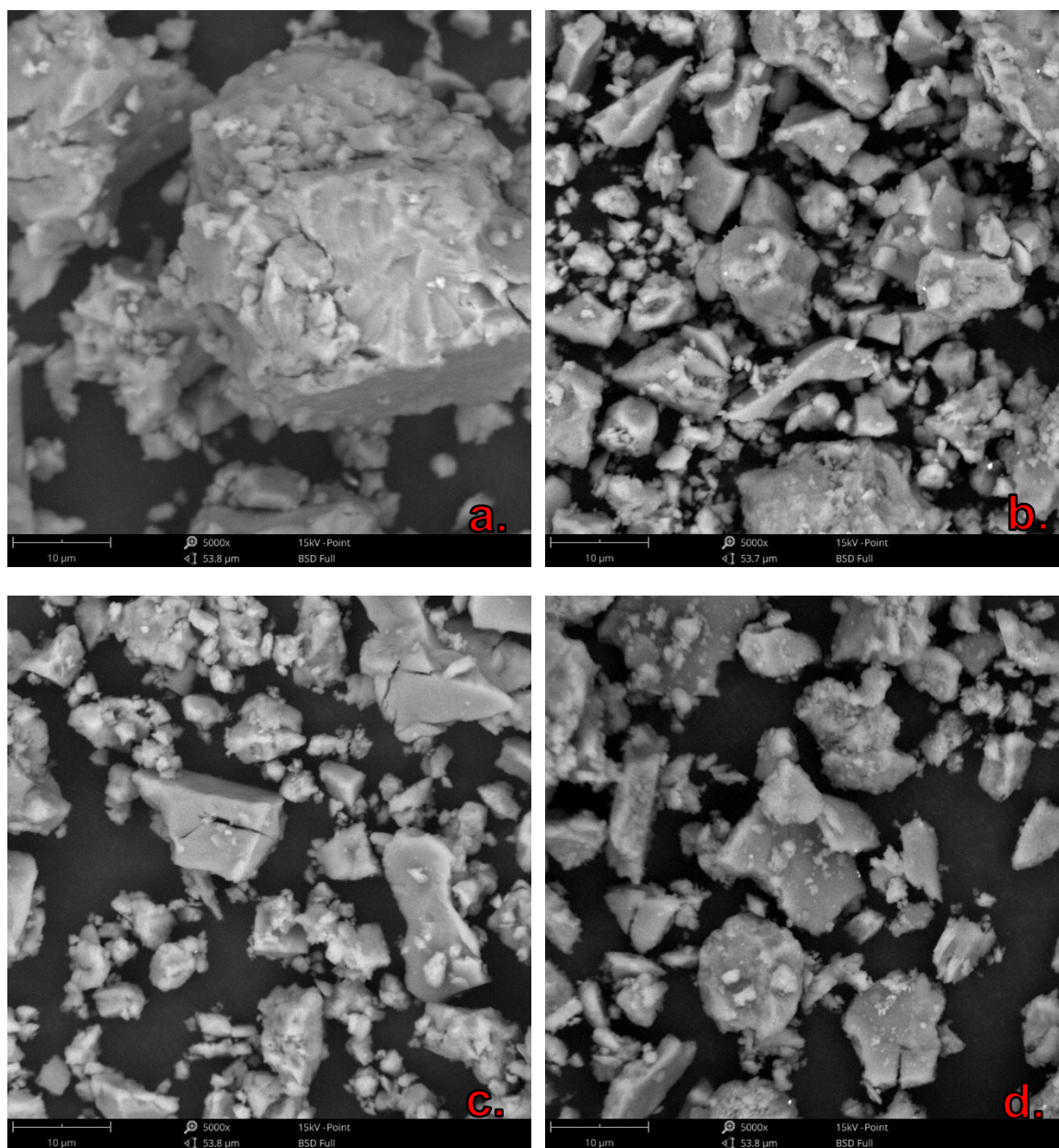


Figura 4-10 MEB de polvos sintetizados por molienda mecánica, tres de ellas molidas por 2 horas a: a) 400 rpm, b) 500 rpm y c) 650 rpm. La imagen d corresponde a la muestra sometida a tratamiento térmico previo (120 °C) y molida por 8 h a 650 rpm. 5000x.

Las figuras 4-9 y 4-10 presenta las imágenes de microscopía electrónica de barrido con aumentos de 2000x y 5000x de las muestras pulverizadas de hueso de cerdo, siendo que las figuras a, b y c corresponden a las muestras obtenidas con tiempo de molienda de 2 h y con velocidades de giro de disco de 400 rpm (HA1), 500 rpm (HA2) y 650 rpm (HA3),

respectivamente, y la figura d corresponde a la muestra HAD4 con tratamiento térmico previo molida a 650 rpm por 8 horas. En estas imágenes se puede comprobar que las muestras que presentan menor tamaño de partícula son aquellas obtenidas moliendo por 2 h a 500 rpm y 650 rpm, presentándose partículas con tamaño inferior a 1 μm y siendo estas también las muestras que presentan mayor cantidad de partículas con tamaño dentro de este rango.

A partir de las imágenes digitalizadas de MEB y de la técnica lineal de los interceptos se calcularon la media y desviación estándar de los tamaños de grano presentes en la muestra y se relacionan en las Tablas 4-2 y 4-3. Debido a la variedad de tamaño de grano en cada una de las muestras, se implementó la distribución bimodal de los valores, por lo que fueron escogidos aleatoriamente 20 partículas y se establecen dos grupos (Mayor y menor tamaño).

Tabla 4-2 Primer grupo: tamaño medio y desviación estándar de los granos más grandes de HA para cada una de las series experimentales.

Partículas de mayor tamaño				
Magnificación: 500x				
Número datos: 10				
Muestra	HA1	HA2	HA3	HA4D
Media (μm)	65,5	44	41,5	34,5
Desviación estándar (μm)	31,309388	10,4880885	15,6436	8,31664997

Tabla 4-3 Segundo grupo: tamaño medio y desviación estándar de los granos más grandes de HA para cada una de las series experimentales.

Partículas de menor tamaño				
Magnificación: 2000x				
Número datos:10				
Muestra	HA1	HA2	HA3	HA4D
Media (μm)	6,7	3,7	2,95	3,45
Desviación estándar (μm)	3,77270902	1,70293864	1,8922356	1,34989712

Estos resultados muestran que las astillas tratadas a 500 rpm presentan menor tamaño de partícula, así como la evolución que tiene las muestras en la mecano-síntesis debido al aumento de la velocidad angular del disco.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

A través de la desproteínización de los huesos femorales de cerdo se pudo obtener el precursor adecuado para ser sometido a molienda, de acuerdo a los protocolos seguidos en el desarrollo de esta investigación.

En vista de los resultados, se puede concluir que la energía entregada por la colisión de los elementos involucrados en el proceso, dadas las condiciones experimentales, tiene una influencia en la distribución de partícula. En efecto, al aumentar la velocidad de giro de la plataforma, incrementaba la energía de colisión.

Los perfiles de difracción no muestran cambios relevantes para las series experimentales, aunque, la muestra HA4D que fue sometida a 650 rpm por 8 horas evidencia la formación de aleo amorfos. Además, de factores como la composición del hueso y el tratamiento térmico previo al que fue sometido, el tiempo de molienda tiene un efecto negativo en la formación de fases cristalina en los polvos.

Las muestras sometidas a 500 y 650 rpm evidencia una distribución de partícula más adecuada, sin embargo, a energías muy altas el material sufría un proceso de abrasión y adherencia a los elementos del molino y como consecuencia, resulta en una pérdida considerable de producto. Por lo que, al tratar de optimizar los parámetros de molienda, se consideró la muestra sometida a 500 rpm como la más apropiada en posteriores estudios. Asimismo, los resultados obtenidos en Microscopia Electrónica de Barrido, presentó la influencia que tiene la velocidad angular del disco en la distribución y tamaños de partícula de HA, se evidenció la disminución del tamaño del cristal de acuerdo al incremento de la velocidad configurada en el molino planetario. A partir de los tamaños de partícula promedio obtenido y de los valores reportados en [22], se observó que la muestra HA3

tiene rangos cercanos a la obtenida por procesos de calcinación a 1250 °C, esta última se encuentra en el orden de las micras.

La molienda mecánica como método de síntesis es adecuado para la obtención de hidroxiapatita a partir de fuentes naturales, es un proceso que no requiere reactantes para su activación mecánica, por lo que está abierto a investigaciones que busquen obtener HA con propiedades similares a los fosfatos de calcio encontradas en el tejido óseo humano.

5.2 Recomendaciones

A partir de lo observado durante la investigación, se sugiere:

- Realizar dos repeticiones de cocción en agua a 100 °C durante 1 h respectivamente, con el propósito de remover la mayor cantidad de materia orgánica del hueso y garantizar un proceso más natural.
- Para la eliminación total de lípidos, se recomienda el uso de la acetona, que es un compuesto que se evapora fácilmente.
- Previo a la incorporación de las astillas en los jarros, es necesario triturar lo mayormente posible, dado que la energía entregada por la colisión de las bolas a veces no es suficiente para fracturar los elementos.
- En cada uno de los procesos, es importante no descuidar el equipo, pues al no acomodar adecuadamente los jarros y a la alta velocidad configurada, podrían eventualmente, ocasionar pérdidas de material y reactivo.
- Velocidades mayores de 500 rpm no son adecuadas para la síntesis de muestras puras.
- Para el almacenamiento y transporte de los polvos se recomienda el uso de recipientes con cierre hermético y de preferencia que sea un material vítreo. Pues, los frascos usados eran de plástico y una pequeña cantidad del polvo se adhería a la superficie.
- Se debe garantizar un adecuado uso de la manipulación de la muestra, para evitar contaminación cruzada.

5.3 Trabajos futuros

En investigaciones futuras, se debe garantizar la obtención de un tamaño de partícula controlado, por lo que se plantea realizar el estudio de la influencia del tiempo de molienda usando una velocidad de giro de 500 rpm con el propósito de mejorar los resultados en cuanto tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula para posteriormente buscar el tratamiento térmico adecuado que permita obtener hidroxiapatita natural con mayor cristalinidad.

La búsqueda el control del tamaño de partícula de la hidroxiapatita natural, teniendo en cuenta los oligoelementos presentes en el tejido óseo, puede contribuir en el estudio de la interacción con proteínas presentes en el cuerpo humano, en cuanto a la regeneración ósea.

A. Anexo: Código en Matlab para la simulación de energía entregada en la molienda mecánica

```
R = 0.132;
r = 0.035;
mb = 0.0067;
alfa_d= -0.350403179;
Nb = 10;
k = 1;
rb = 0.006;
OMG = 150:50:650;
OMG = OMG';
t = 0:1:10;
omg = 1.25*OMG;
Mp = mb/20;
f1 = (omg-OMG)/(2*pi);

Ek = 0.5*mb*((-R*OMG+(r-rb)*omg*sin(alfa_d)).^2+((r-rb)*omg*cos(alfa_d)).^2);
P = Ek.*f1*Nb*k;
Ecum = P*t/Mp;

plot(t,Ecum,'LineWidth',2)
axis([0 10.2 0 1.02*max(Ecum(:,end))])
for i=1:length(omg)
    text(10.3,max(Ecum(i,:)),int2str(OMG(i)),'FontSize',8)
end
text(2.5,0.9*max(Ecum(:,end)),'Mb:Mp =
20:1','FontSize',12,'FontAngle','italic')
text(2.5,0.85*max(Ecum(:,end)),'Nb = 10','FontSize',12,'FontAngle','italic')
xlabel('Milling Time (h)','FontAngle','italic','FontSize',12)
ylabel('E_{cum} (J/Kg)','FontAngle','italic','FontSize',12)
```


B. Anexo: Código en Matlab para la simulación de la potencia entregada en la molienda mecánica

```
R = 0.132; %Radio del disco
r = 0.035; %Radio del jarro
mb = 0.0067;%Masa de la bola
alfa_d= -0.350403179;%Ángulo de desprendimiento de la bola
Nb = 1:10;
k = 1;
rb = 0.006;%Radio de la bola
OMG = 100:50:650;
OMG = OMG';
t = 0:10:50;
omg = 1.25*OMG;
Mp = mb/20;
f1 = (omg-OMG)/(2*pi);

Ek = 0.5*mb*((-R*OMG+(r-rb)*omg*sin(alfa_d)).^2+((r-rb)*omg*cos(alfa_d)).^2);
P = Ek.*f1*Nb*k;

plot(OMG,1e-3*P,'LineWidth',2)
axis([90 665 0 1.02*max(1e-3*P(end,:))])
for i=1:length(Nb)
    text(652,max(1e-3*P(:,i)),int2str(Nb(i)))
end
xlabel('Angular Velocity \Omega (rpm)','FontAngle','italic','FontSize',12)
ylabel('Power [kW]','FontAngle','italic','FontSize',12)
```


Bibliografía

- [1] A. M. Castillo-Paz, L. Tirado-Mejía, and M. E. Rodríguez-García, "Caracterización de hueso porcino sometido a tratamiento hidrotérmico," *Rev. Divulg. Cient. y Tecnológica*, pp. 57–66, 2017.
- [2] E. P. T. Ochoa, "Biomateriales," *Solidar. y Gob. Corp. la Empres.*, vol. 17, pp. 27–28, 2019, doi: 10.2307/j.ctvrzh014.4.
- [3] J. K. Odusote, Y. Danyuo, A. D. Baruwa, and A. A. Azeez, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite from bovine bone for production of dental implants," *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, vol. 17, no. 2, 2019, doi: 10.1177/2280800019836829.
- [4] A. Villani, A. Millán, and G. González, "Caracterización físico-química y cerámica de hidroxiapatitas producidas por distintos métodos de síntesis: Parte II: Efectos del tratamiento térmico TT - Physico-chemical and ceramic characterization of Hydroxyapatite obtained by different synthesis meth," *Rev. la Fac. Ing. Univ. Cent. Venez.*, vol. 30, no. 1, pp. 201–210, 2015, [Online]. Available: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652015000100020&lang=pt.
- [5] S. C. Wu, H. C. Hsu, S. K. Hsu, C. P. Tseng, and W. F. Ho, "Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders," *Adv. Powder Technol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1154–1158, 2017, doi: 10.1016/j.appt.2017.02.001.
- [6] A. L. Giraldo-Betancur *et al.*, "Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 13, no. 7, pp. 1383–1390, 2013, doi: 10.1016/j.cap.2013.04.019.
- [7] N. Demirkol, F. N. Oktar, and E. S. Kayali, "Production and mechanical properties of commercial synthetic hydroxyapatite (CSHA) composites," *Key Eng. Mater.*, vol. 587, pp. 147–153, 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.587.147.
- [8] T. Mandal, B. K. Mishra, A. Garg, and D. Chaira, "Optimization of milling

- parameters for the mechanosynthesis of nanocrystalline hydroxyapatite,” *Powder Technol.*, vol. 253, pp. 650–656, 2014, doi: 10.1016/j.powtec.2013.12.026.
- [9] B. C. Vaquero, “Síntesis y caracterización de los sistemas Eu₂O₃ y Gd₂O₃ por molienda mecánica,” Universidad Carlos III de Madrid, 2011.
- [10] M. Chesley, R. Kennard, S. Roozbahani, S. M. Kim, K. Kukk, and M. Mason, “One-step hydrothermal synthesis with in situ milling of biologically relevant hydroxyapatite,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 113, no. March, p. 110962, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110962.
- [11] C. Suryanarayana, “Mechanical alloying and milling,” in *Progress in Materials Science*, vol. 46, no. 1–2, 2001, pp. 1–184.
- [12] I. M. Torres, “Síntesis y caracterización de biocerámicos con base a hidroxiapatita,” Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2019.
- [13] J. Orozco, I. M. Zuluaga, P. Forero, J. A. Arango, and E. R. Parra, “Síntesis y caracterización de la hidroxiapatita natural obtenida del hueso de cerdo,” *Rev. Colomb. Mater.*, vol. 5, pp. 165–171, 2013.
- [14] W. Khoo, F. M. Nor, H. Ardhyanta, and D. Kurniawan, “Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures,” *Procedia Manuf.*, vol. 2, no. February, pp. 196–201, 2015, doi: 10.1016/j.promfg.2015.07.034.
- [15] A. Ruksudjarit, K. Pengpat, G. Rujijanagul, and T. Tunkasiri, “Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 8, no. 3–4, pp. 270–272, 2008, doi: 10.1016/j.cap.2007.10.076.
- [16] M. K. Herliansyah, D. A. Nasution, M. H. Bin Abdul Shukor, A. Ide-Ektessabi, M. W. Wildan, and A. E. Tontowi, “Preparation and Characterization of Natural Hydroxyapatite: A Comparative Study of Bovine Bone Hydroxyapatite and Hydroxyapatite from Calcite,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 561–565, no. October, pp. 1441–1444, 2007, doi: 10.4028/www.scientific.net/msf.561-565.1441.
- [17] B. Nasiri-Tabrizi, A. Fahami, and R. Ebrahimi-Kahrizsangi, “A comparative study of hydroxyapatite nanostructures produced under different milling conditions and thermal treatment of bovine bone,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 245–258, 2014, doi: 10.1016/j.jiec.2013.03.041.
- [18] C. F. Burmeister and A. Kwade, “Process engineering with planetary ball mills,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 18, pp. 7660–7667, 2013, doi: 10.1039/c3cs35455e.
- [19] H. X. Kho, S. Bae, S. Bae, B.-W. Kim, and J. S. Kim, “Planetary Ball Mill Process in

- Aspect of Milling Energy,” *J. Korean Powder Metall. Inst.*, vol. 21, no. 2, pp. 155–164, 2014, doi: 10.4150/kpmi.2014.21.2.155.
- [20] G. Kakuk, I. Zsoldos, A. Csanády, and I. Oldal, “Contributions to the Modelling of the milling process in a planetary ball mill,” *Rom. J. Phys.*, vol. 14, no. January, pp. 11–20, 2002, doi: 10.1007/978-3-7091-2552-6_4.
- [21] M. Abdellaoui and E. Gaffet, “The physics of mechanical alloying in a planetary ball mill: mathematical treatment,” *Acta Met. mater.*, vol. 43, no. 3, pp. 1087–1098, 1995.
- [22] M. Rana, N. Akhtar, S. Rahman, M. Jamil, and S. Asaduzzaman, “Extraction of Hydroxyapatite from Bovine and Human Cortical Bone by Thermal Decomposition and Effect of Gamma Radiation: A Comparative Study,” *Int. J. Complement. Altern. Med.*, vol. 8, no. 3, 2017, doi: 10.15406/ijcam.2017.08.00263.
- [23] G. Tortora and B. Derrickson, *Principios de anatomía y fisiología*, 13th ed. Madrid, 2006.
- [24] P. Muñoz, “Síntesis y caracterización de un material a base de hidroxiapatita con propiedades similares a las del tejido óseo natural,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- [25] D. Mingzu, C. Jingdi, and L. Kaihua, “Recent advances in biomedical engineering of Nano-Hydroxyapatite including dentistry, cancer treatment and bone repair,” *Sci. Total Environ.*, p. 135907, 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2021.108790.
- [26] A. C. Paz, C. Estrada, and L. E. Lopez, “Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas,” *Rev. EIA*, vol. 3, pp. 93–100, 2006.
- [27] H. Kausar and R. Naga Kishore, “Bone tissue engineering,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 30–32, 2013, doi: 10.1016/b978-0-12-818422-6.00083-6.
- [28] D. Mainard, “Sustitutos óseos,” *EMC - Apar. Locomot.*, vol. 47, no. 2, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1016/s1286-935x(14)67558-4.
- [29] R. Budynas and A. Sadegh, “Biomaterials,” in *Roark’s Formulas for Stress and Strain*, no. 9, McGraw-Hill, Ed. 2020.
- [30] J. B. Park and J. D. Bronzino, *Biomaterials principles and applications*. 2000.
- [31] V. S. Kattimani, S. Kondaka, and K. P. Lingamaneni, “Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration,” *Bone Tissue Regen. Insights*, vol. 7, p. BTRI.S36138, 2016, doi: 10.4137/btri.s36138.
- [32] M. Bohner, “Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium

- phosphate cements,” *Injury*, vol. 31, no. SUPPL. 4, 2000, doi: 10.1016/S0020-1383(00)80022-4.
- [33] N. A. M. Barakat, M. S. Khil, A. M. Omran, F. A. Sheikh, and H. Y. Kim, “Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 209, no. 7, pp. 3408–3415, 2009, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040.
- [34] S. M. Zakaria, S. H. Sharif Zein, M. R. Othman, F. Yang, and J. A. Jansen, “Nanophase Hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: A review,” *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 19, no. 5, pp. 431–441, 2013, doi: 10.1089/ten.teb.2012.0624.
- [35] L. G. Sequeda, J. M. Díaz, S. J. Gutiérrez, and S. J. Perdomo, “Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo,” vol. 41, no. 1, pp. 50–66, 2012.
- [36] M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [37] M. Akram, R. Ahmed, I. Shakir, W. A. W. Ibrahim, and R. Hussain, “Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources,” *J. Mater. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 1461–1475, 2014, doi: 10.1007/s10853-013-7864-x.
- [38] D. Sands, *Introducción a la cristalografía*. 1993.
- [39] W. Smith, *Fundamentos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales*, 3rd ed. .
- [40] W. Callister, *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*, Reverté, S. 1987.
- [41] L. Pawloswski and P. Blanchart, “Synthesis, properties and applications of hydroxyapatite,” in *Industrial Chemistry of oxides for Emerging Applications*, 1st ed., 2018, pp. 311–352.
- [42] H. Salazar, “Propiedades magnéticas, morfológicas y estructurales del material NiFe₂O₄ obtenido por molienda mecánica y reacción en estado sólido,” Universidad de Antioquia, 2016.
- [43] K. Datum, “Instrucciones de servicio monomolino planetario Pulverisette classic line,” no. 262067. pp. 1–8, 2020.
- [44] A. Buisine, “Efecto de las variables de procesamiento sobre las propiedades de un cemento de fosfato de calcio,” Universitat Politècnica de Catalunya, 2006.
- [45] F. Sima, C. Ristoscu, L. Duta, O. Gallet, K. Anselme, and I. N. Mihailescu, “Laser

- thin films deposition and characterization for biomedical applications,” in *Laser Surface Modification of Biomaterials: Techniques and Applications*, Elsevier Ltd, 2016, pp. 77–125.
- [46] V. Vishwakarma and S. Uthaman, “Environmental impact of sustainable green concrete,” in *Smart Nanoconcretes and Cement-Based Materials: Properties, Modelling and Applications*, Elsevier Inc., 2019, pp. 241–255.
- [47] J. Muñoz, “Síntese, Sinterização em Forno de Micro-ondas e Caracterização da Fe-Ni, PZT e do Sistema Multifuncional Magnetoelétrico PZT/Fe-Ni,” Universidade Federal de São Carlos, 2012.
- [48] J. a. Martin Gago, “La microscopía para el estudio de materiales y láminas delgadas,” in *Láminas delgadas y recubrimientos: Preparación, propiedades y aplicaciones*, 2003, pp. 519–540.
- [49] S. Ebnesajjad, “Surface and Material Characterization Techniques,” in *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding*, 2014, pp. 39–75.
- [50] M. Ipohorski and P. B. Bozzano, “Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales,” *Cienc. Invest.*, vol. 63, no. 3, pp. 43–53, 2013.