

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

**Caracterización del efecto del tratamiento térmico y electroquímico de la
hidroxiapatita para aplicaciones médicas**

Milena Cerdas Víquez

Proyecto de graduación presentado ante la Escuela de Ingeniería Química como requisito
final para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Química

San José, 2008

“Tú eres el que diseña tu destino. Eres el autor. Escribes la historia. La pluma está en tu mano y el resultado es el que elijas”

Lisa Nichols

Proyecto de graduación presentado ante
la Escuela de Ingeniería Química
de la Universidad de Costa Rica

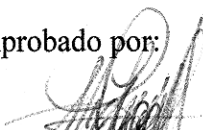
Como requisito final para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería Química.

**Caracterización del efecto del tratamiento térmico y electroquímico de la
hidroxiapatita para aplicaciones médicas**

Sustentante:


Milena Cerdas Víquez

Aprobado por:




Dr. Michael Chacón
Profesor
Escuela de Ingeniería Química

Presidente



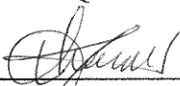
Ing. Cindy Torres
Profesora
Escuela de Ingeniería Química

Directora del proyecto



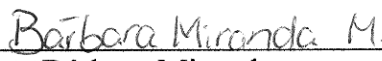
Dr. Mavis Montero
Profesora
Escuela de Química

Miembro Lector



M.Sc. Gerardo Chacón
Profesor
Escuela de Ingeniería Química

Miembro Lector



Ing. Bárbara Miranda
Profesora
Escuela de Ingeniería Química

Miembro Invitado

Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”

DEDICATORIA

A mis padres:

Víctor Julio Cerdas y María del Carmen Víquez, quienes han sido mis guías, consejeros, y motivadores, a quienes agradezco infinitamente, pues ellos han sido los facilitadores en el alcance de mis metas.

A mi hermana:

Carolina Cerdas, por todo tu apoyo y tus consejos, y por ser siempre participe de mis proyectos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mavis Montero, por ser la impulsadora del proyecto, y por su gran espíritu, entrega y dedicación al mismo.

A la Ing.Cindy Torres, por su innegable apoyo y su valiosa colaboración para la consecución del proyecto.

A Juan Diego Arias y Rocío Solano, por su apoyo y toda la ayuda brindada en el desarrollo del proyecto.

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación es caracterizar el efecto del tratamiento térmico y electroquímico sobre la hidroxiapatita extraída de hueso bovino, para así producir un material con propiedades que le permitan ser utilizado en alguna aplicación biomédica.

El proyecto comprende una investigación teórica así como también una parte experimental. Los primeros tres capítulos del proyecto, comprenden la investigación teórica. En estos capítulos se abarcan aspectos relacionados con biomateriales y sus métodos de caracterización en general; la definición de hidroxiapatita así como sus fuentes, aplicaciones y métodos de síntesis; y finalmente, se presentan algunos fundamentos de la electroquímica, la electrosíntesis de hidroxiapatita y los resultados de otras investigaciones en cuanto a ésta. En el cuarto capítulo se expone la metodología experimental. En este proyecto se tienen dos etapas experimentales, una de éstas corresponde al tratamiento electroquímico, y la otra, al tratamiento térmico.

El tratamiento electroquímico consiste en realizar una electrólisis de una disolución de EDTA-Hueso. En esta etapa experimental se evalúan diferentes tratamientos de densidad de corriente y velocidad de agitación, para determinar su influencia sobre el rendimiento y sobre la relación Ca/P. En cuanto al rendimiento, ambos factores son significativos; la transferencia de masa depende de la densidad de corriente, y ocurre en la superficie del electrodo, en la cual la difusión es determinante. De acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda para el sistema de reacción utilizado, trabajar con un pH inicial alrededor de 7, al nivel mayor de densidad de corriente y al nivel menor de velocidad de agitación.

El tratamiento térmico consiste en realizar una calcinación de los huesos. En esta etapa experimental se evalúan diferentes tratamientos de temperatura, tiempo de calcinación y concentración del etanol para lavado, para determinar su influencia sobre la morfología, eliminación de materia orgánica y sobre la relación Ca/P. De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda trabajar a 725°C, durante 2 horas, utilizando agua para el lavado del hueso.

INDICE GENERAL

APARTADO		PÁGINA
TRIBUNAL EXAMINADOR		iii
DEDICATORIA		iv
AGRADECIMIENTOS		v
RESUMEN		vi
CAPÍTULOS		
1	BIOMATERIALES	1
1.1	Definición	1
1.2	Métodos de caracterización de los biomateriales	1
1.2.1	Determinación de estructuras	1
1.2.2	Determinación de pesos moleculares	2
1.2.3	Evaluación de las propiedades térmicas	2
1.2.4	Caracterización de superficies de biomateriales	3
1.2.4.1	Métodos espectroscópicos	3
1.2.4.2	Métodos termodinámicos	4
1.2.4.3	Métodos microscópicos	4
1.3	Cerámicas	6
2	HIDROXIAPATITA	7
2.1	Definición	7
2.2	Fuentes de hidroxiapatita	8
2.2.1	Origen natural	8
2.2.2	Origen sintético	8
2.3	Aplicaciones de la hidroxiapatita	9
2.4	Métodos de síntesis de hidroxiapatita	9
2.4.1	Precipitación	9
2.4.2	Vía hidrotérmica	10
2.4.3	Métodos de estado sólido	10
2.5	Normas relacionadas con la producción de hidroxiapatita	12
2.5.1	Normas ASTM	12
2.5.2	Normas FDA	12
2.5.3	Normas ISO	13
3	PRODUCCIÓN DE HIDROXIAPATITA MEDIANTE ELECTROQUÍMICA	14
3.1	Fundamentos de electroquímica	14
3.2	Transferencia de masa en sistemas electroquímicos	16

APARTADO		PÁGINA
3.3	Factores condicionantes en la electroquímica	19
3.3.1	Disolvente	19
3.3.2	Especie electroactiva	20
3.3.3	Naturaleza del electrodo	20
3.3.4	Potencial de trabajo	21
3.3.5	Efecto de la temperatura	21
3.3.6	Efecto protónico	22
3.4	Aplicaciones de la electroquímica	22
3.5	Electrosíntesis de hidroxiapatita	24
4	MATERIALES, EQUIPO Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
4.1	Materiales	26
4.1.1	Materias primas	26
4.2	Reactivos	27
4.3	Equipo experimental	27
4.4	<i>Primera etapa experimental: electrólisis de la disolución de edta-hueso</i>	28
4.4.1	Objetivo experimental	28
4.4.2	Variables	28
4.4.3	Plano de la experimentación	30
4.4.4	Metodología	30
4.5	<i>Segunda etapa experimental: tratamiento térmico del hueso</i>	31
4.5.1	Objetivo experimental	31
4.5.2	Variables	32
4.5.3	Plano de la experimentación	33
4.5.4	Metodología	33
5	ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
7	REFERENCIAS	58
8	NOMENCLATURA	61
	APÉNDICES	
A	DATOS EXPERIMENTALES	63
B	RESULTADOS INTERMEDIOS	69
C	MUESTRA DE CÁLCULO	75
D	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	84

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
3.1	Correlaciones adimensionales para transferencia de masa	17
4.1	Características del hueso utilizado	26
4.2	Especificaciones de los reactivos utilizados durante la realización del proyecto	27
4.3	Especificaciones de los equipos utilizados durante la realización del proyecto	27
5.1	Diseño estadístico para el porcentaje de rendimiento de la etapa de electrólisis	40
5.2	Valor del estadístico F de los factores de estudio para el porcentaje de rendimiento de la electrólisis	40
5.3	Diseño estadístico para la relación Ca/P de la etapa de electrólisis	43
5.4	Valor del estadístico F de los factores de estudio para la relación Ca/P de la electrólisis	43
5.5	Diseño estadístico para la relación Ca/P en la etapa de tratamiento térmico	47
5.6	Valor del estadístico F de los factores de estudio para la relación Ca/P de la etapa de tratamiento térmico	47
5.7	Diseño estadístico para el porcentaje de materia orgánica removida en la etapa de tratamiento térmico	48
5.8	Valor del estadístico F de los factores de estudio para el porcentaje de materia orgánica removida de la etapa de tratamiento térmico	48
5.9	Resultados de análisis de trazas de metales y valores permitidos por la ASTM	53
5.10	Comparación entre las características de algunas marcas comerciales y de los productos obtenidos por electrólisis y por tratamiento térmico	55
A.1	Preparación de las disoluciones de NaOH empleadas en la etapa de limpieza del hueso	64
A.2	Masa retenida en el tamizado de los huesos limpios	64
A.3	Determinación de la densidad del hueso	64
A.4	Preparación de las disoluciones de EDTA-Hueso utilizadas en la electrólisis	65
A.5	Determinación del porcentaje de humedad en el hueso limpio	65
A.6	Determinación del porcentaje de materia orgánica en el hueso limpio	65

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
A.7	Resultados obtenidos en la determinación del tiempo de rendimiento máximo de electrólisis efectuadas a 108 mA/cm ² y 320 rpm	66
A.8	Orden de las corridas determinadas al azar para la electrólisis	66
A.9	Resultados obtenidos en la etapa de electrólisis	67
A.10	Resultados obtenidos mediante microanálisis EDS para una de las réplicas en la etapa de electrólisis	67
A.11	Dimensiones del electrodo utilizado para efectuar la electrólisis	68
A.12	Orden de las corridas determinadas al azar para el tratamiento térmico	68
A.13	Resultados obtenidos en la etapa de tratamiento térmico del hueso	68
A.14	Resultados obtenidos mediante microanálisis EDS de las muestras de hueso sometidas a tratamiento térmico	69
B.1	Densidad del hueso limpio	70
B.2	Porcentaje de humedad en el hueso limpio	70
B.3	Porcentaje de materia orgánica en el hueso limpio	70
B.4	Porcentajes de rendimiento obtenidos en la determinación del tiempo de rendimiento máximo de electrólisis efectuadas a 108mA/cm ² y 320 rpm	71
B.5	Porcentajes de rendimiento obtenidos en la etapa de electrólisis	71
B.6	Relación Calcio/Fósforo de las muestras de la etapa de electrólisis analizadas	72
B.7	Cálculo del volumen y el área superficial del electrodo utilizado en la electrólisis	72
B.8	Totales de cada densidad de corriente en cada replica para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis	72
B.9	Análisis de varianza de los porcentajes de rendimiento para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis	73
B.10	Medias de la relación Ca/P de cada densidad de corriente y cada velocidad de agitación, para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis	73
B.11	Análisis de varianza de la relación Ca/P para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis	73
B.12	Porcentaje de materia orgánica removida del hueso sometido a tratamiento térmico	74

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
B.13	Relación Calcio/Fósforo de las muestras de hueso sometidas a tratamiento térmico	74
B.14	Medias del porcentaje de materia orgánica removida, de cada temperatura, tiempo y concentración de disolvente, para el diseño de cuadrado latino de la etapa de tratamiento térmico	75
B.15	Medias del porcentaje de materia orgánica removida, de cada temperatura, tiempo y concentración de disolvente, para el diseño de cuadrado latino de la etapa de tratamiento térmico	75
B.16	Análisis de varianza de la relación Ca/P para el diseño de cuadrado latino de la etapa de tratamiento térmico	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
2.1	Diagrama de fases del sistema CaO-P ₂ O ₅ en presencia de 500 mm de Hg de presión de vapor de agua (Ca ₂ P=Ca ₂ P ₂ O ₇ , C ₃ P=Ca ₃ (PO ₄) ₂ , C ₄ P= Ca ₄ (PO ₄) ₂ ; Ap= hidroxiapatita)	11
3.1	Estructura molecular del EDTA	24
4.1	Equipo experimental para la etapa de electrólisis	31
5.1	Preparación de Disolución Hueso-EDTA (a) Disolución EDTA-Hueso, (b) Filtración al vacío de la disolución EDTA-Hueso, (c) Etapa inicial de electrólisis de la disolución EDTA-Hueso.	37
5.2	Avance de la electrólisis de una disolución de EDTA-Hueso	38
5.3	Espectro FTIR para el producto de la corrida No.14 de electrólisis efectuada a 103 mA/cm ² y 120 rpm.	38
5.4	Fotografía SEM del producto de la corrida No.9 de electrólisis efectuada a 93 mA/cm ² y 220 rpm.	39
5.5	Rendimiento de la electrólisis en función de la velocidad de agitación, para cada densidad de corriente.	41
5.6	Rendimiento de la electrólisis en función de la densidad de corriente, para cada velocidad de agitación.	42
5.7	Relación atómica Ca/P en función de la velocidad de agitación, para cada densidad de corriente.	44
5.8	Relación atómica Ca/P en función de la densidad de corriente, para cada velocidad de agitación.	45
5.9	Fotografía SEM de (a)hueso calcinado a 625°C, durante 2 horas, lavado con agua; (b) hueso calcinado a 725°C, durante 2 horas, lavado con etanol al 95%; y (c) hueso calcinado a 825°C durante 2 horas, lavado con etanol al 50%	50
5.10	Fotografía SEM panorámica de (a)hueso calcinado a 625°C, durante 2 horas, lavado con agua; (b) hueso calcinado a 725°C, durante 2 horas, lavado con etanol al 95%; y (c) hueso calcinado a 825°C durante 2 horas, lavado con etanol al 50%	50
5.11	Fotografía SEM de (a) hueso luego del lavado con agua, (b) hueso luego del lavado con etanol al 95%	51

CAPÍTULO 1

BIOMATERIALES

1.1 Definición

Se definen como biomateriales a aquellas sustancias que han sido diseñadas para interactuar con el tejido humano, monitorear el funcionamiento del cuerpo o para controlar condiciones patológicas del mismo [Sáenz *et al.* 2006].

El término biomateriales se emplea para una amplia gama de materiales con aplicación médica. Los compuestos basados en fosfatos de calcio son los biomateriales más populares en la actualidad, al menos en lo que respecta al incremento de artículos publicados, patentes y diseños presentados anualmente.

1.2 Métodos de caracterización de los biomateriales

Los biomateriales, tanto naturales como sintéticos, poseen características en masa y superficie que definen su biocompatibilidad y bioestabilidad, las cuales deben conocerse para así poder predecir el comportamiento del dispositivo durante el período de aplicación clínica. Algunos de los parámetros comúnmente evaluados son: temperatura de transición vítrea, puntos de fusión, capacidad calorífica, cristalinidad, coeficiente de dilatación, cinética de reacción, composición química, pureza, cantidad e identidad de aditivos, estabilidad y degradabilidad en presencia de diferentes medios, porosidad, rugosidad e hidrofiliidad [Abraham. *et al.* 2004].

1.2.1 Determinación de estructuras

La *Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)* y la de *Raman*, involucran el uso de radiación electromagnética en el ámbito infrarrojo, y de esta manera

permiten caracterizar los enlaces químicos, proporcionando información valiosa de la estructura química del material.

La técnica de *Difracción de Rayos X (XRD)*, proporciona información sobre la estructura química y cristalina de un material. Cada sólido cristalino posee un patrón característico de difracción que puede emplearse, como en FTIR, para su identificación. Mediante este método se puede determinar también el grado de cristalinidad del material.

La *Cromatografía Gaseosa (GC)*, es una técnica que permite separar compuestos orgánicos volátiles. Otras técnicas de cromatografía incluyen la *Cromatografía en Capa Fina (TLC)*, la *Cromatografía líquida de alta prestación (HPLC)*, entre otras.

La técnica de espectroscopia de *Resonancia Magnética Nuclear (NMR)*, permite determinar la estructura química, microestructura y estereoregularidad de polímeros o tacticidad, composición y secuencias copoliméricas y, relaciones de reactividad de monómeros.

1.2.2 Determinación de pesos moleculares

La *Cromatografía de Permeación de Geles (GPC)*, también conocida como *Cromatografía por Exclusión de Tamaños (SEC)*, permite la determinación de pesos moleculares y la distribución de pesos moleculares de polímeros. Los pesos moleculares obtenidos son relativos a los patrones empleados en la calibración, normalmente poliestireno, poli (óxido de etileno) o poli (metacrilato de metilo).

1.2.3 Evaluación de las propiedades térmicas

El *Análisis Térmico Diferencial (ATD)*, es una técnica en la cual la temperatura de la muestra es comparada con la de un material inerte de referencia a medida que avanza el programa de calentamiento o enfriamiento establecido. Las temperaturas de ambas permanecen iguales hasta que ocurre algún evento térmico como fusión o descomposición.

La *Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*, es una técnica similar al ATD, ya que tiene un material de referencia, pero la celda tiene un diseño diferente.

La *Termodilatometría (TD)*, corresponde a una técnica relacionada con los cambios dimensionales (longitud y volumen) en función de la temperatura, sin la aplicación de ninguna carga externa.

1.2.4 Caracterización de superficies de biomateriales

Existen dos enfoques empleados para la caracterización de superficies de biomateriales. El primer enfoque tiene por objetivo la determinación de los parámetros, propiedades, composición superficial y topografía del material. El segundo enfoque, se dirige al estudio de la respuesta biológica (biocompatibilidad, hemocompatibilidad, citotoxicidad, entre otros) en presencia de estas sustancias caracterizadas, analizando los elementos biológicos en superficie.

1.2.4.1 Métodos espectroscópicos

Los métodos de *Espectroscopía Vibracional*, en particular la espectroscopía infrarroja (FTIR), brinda información acerca de la estructura molecular. La *Reflectancia Total Interna Atenuada (ATR-FTIR)*, es la aplicación del anterior método a la observación de superficies acoplado con el fenómeno físico de reflexión total interna, para restringir el volumen de análisis a la región superficial de la muestra. Esto permite obtener información acerca de la estructura molecular del material, de interacciones inter e intra moleculares, cristalinidad, conformación y orientación de moléculas.

La *Espectroscopía Electrónica para Análisis Químico (ESCA)*, también llamada *Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)*, es utilizada para determinar la composición elemental de superficies sólidas. El principio de ESCA se basa en la emisión de electrones desde el material en respuesta a la irradiación de la superficie con un haz

monocromático de rayos X. la energía cinética de los fotoelectrones emitidos es única para los diferentes elementos y sensible al estado químico de los átomos.

La *Espectroscopía Electrónica Auger (AES)*, se utiliza para investigar morfología superficial, realizar análisis elemental y establecer perfiles de composición en profundidad.

La *Espectrometría de Masas de Iones Secundarios (SIMS)*, se puede utilizar para el análisis de superficies orgánicas e inorgánicas, identificando todos los elementos, así como también los iones atómicos y moleculares, y fragmentos de masa alta presente a concentraciones muy bajas.

1.2.4.2 Métodos termodinámicos

Los *Métodos de Angulo de Contacto* realizan una medida del ángulo que forma la tangente del perfil de una gota de líquido sobre una superficie sólida, considerando que la gota se encuentra en reposo y equilibrio con dicho sólido, lo cual brinda información de la energía superficial del sustrato. El ángulo de contacto a menudo se toma como parámetro indicativo de la “mojabilidad” de la superficie de un material.

1.2.4.3 Métodos microscópicos

La *Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)*, proporciona imágenes de gran resolución y profundidad de campo con una calidad tridimensional. El tipo de haz de electrones usado determina la resolución, la cual será mayor cuanto mayor sea el voltaje de aceleración utilizado.

El *Microscopio de Bajo Voltaje (LVSEM)*, usa filamentos de tungsteno y toma la señal de electrones de fondo para generar la imagen con lo que puede caracterizar muestras húmedas a 2-3 Torr. Los rayos X son señales importantes que proveen información sobre la

composición química de la muestra midiendo la energía generada por la acción del haz. Esta técnica se denomina *Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS)*.

Las aplicaciones de SEM y EDS en el campo de medicina incluyen: análisis de fallas, comparación de materiales, evaluación de procesos de tratamiento superficial, caracterización de defectos y control de calidad de recubrimientos, entre otros.

El *Microscopio de Efecto Túnel (STM)*, ofrece la imagen tridimensional directa de una superficie conductora con “resolución atómica” y este fue el predecesor de la *Microscopía de Sonda de Barrido (SPM)*, la cual permite estudiar las características de los cuerpos en detalle inasequible (escala atómica o molecular) para los microscopios ordinarios. Además de mostrar la topografía atómica de la superficie, el STM revela la composición atómica ya que la corriente túnel depende de la distancia y de la estructura electrónica de la superficie.

Una de las herramientas de mayor utilidad es el *Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)*, cuya imagen se obtiene a partir del registro de la deflexión de una punta metálica debido a la repulsión de la nube electrónica entre el átomo en la punta de la sonda y los átomos de la superficie. Este método puede brindar una imagen de la topografía de materiales no conductores y componentes biológicos, así como información acerca de la elasticidad, fricción, adhesión, densidad de cargas, estructura y heterogeneidad química superficial. La alta resolución que brinda el AFM se contrapone con el escaso contenido de los datos que se pueden extraer, los cuales son fundamentalmente de naturaleza mecánica y física.

La *Resonancia de Plasmón (SPR)* es una técnica útil para investigar las interacciones biológicas en superficies de biomateriales, ya que puede definir las velocidad y extensión de absorción de elementos en superficie, determinar propiedades dieléctricas, cinéticas de asociación/disociación, constantes de afinidad para una interacción ligando/ligado, entre otros.

1.3 Cerámicas

Las nuevas tecnologías han permitido desarrollar materiales cerámicos cuyas propiedades físicas, químicas y mecánicas, los convierten en materiales útiles para implantes dentales y ortopédicos. Algunas de las características que hacen que las cerámicas sean apropiadas para implantes, son [Sáenz *et al.* 2006]:

- Alta biocompatibilidad
- Alta resistencia a la corrosión
- Alta resistencia a la compresión
- Baja conductividad térmica y eléctrica

Existe además cierta preferencia por los biomateriales cerámicos basados en fosfatos de calcio; la principal razón técnica de tal preferencia, radica en el hecho de que el hueso está conformado principalmente por fosfatos de calcio, dentro de los cuales la hidroxiapatita ha recibido principal atención [Soto, 2003].

CAPÍTULO 2

HIDROXIAPATITA

2.1 Definición

Se conocen como *apatitas* a los compuestos químicos cuya fórmula es de la forma $M_{10}(XO_4)_6Z_2$, donde M^{2+} es un metal, con los aniones XO_4^{3-} y Z^- . La hidroxiapatita (HAP) tiene una estructura molecular tal que M es calcio (Ca^{2+}), X es fósforo (P^{5+}) y Z es el radical hidroxilo (OH). La HAP estequiométrica presenta una relación atómica entre el calcio y el fosfato (Ca/P) equivalente a 1,67. Generalmente cristaliza en el sistema hexagonal, aunque excepcionalmente lo hace en el sistema monocíclico [Sáenz *et al.* 2006].

Su carácter iónico lo convierte en una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor que 1500 °C, y le brinda la posibilidad de variar su composición mediante un proceso de intercambio iónico, lo cual le permite admitir un gran número de sustituciones que dejan sin cambio alguno su estructura cristalográfica [Londoño *et al.* 2006].

En la producción de HAP, la resistencia a la dilución y estabilidad de ésta dependerá del área superficial, la morfología y la porosidad. El granulado es siempre poroso, con una porosidad de 50 a 20% en general, y con un amplio ámbito de tamaño de poros [Soto, 2003].

Una HAP típica muestra bandas para un espectro FTIR en (3600, 3569, 3578, 3448, y 633) cm^{-1} correspondientes a grupos OH-; bandas en (474, 571, 601, 692, 1032≈1087, 1092, 1040) cm^{-1} correspondientes a grupos PO_4^{3-} y bandas entre (870, 1420 y 1480) cm^{-1} si la muestra contiene grupos CO_3 [De La Calle *et al.* 2006].

2.2 Fuentes de hidroxiapatita

La HAP puede ser de origen natural (bovina, coralina o ficógena) o sintética (cerámica o no cerámica) [Pizá *et al.* 2001].

2.2.1 Origen natural

La HAP es el principal constituyente mineral de los huesos de los mamíferos, constituyendo un 43% en peso de la composición del hueso. El *hueso bovino* es la fuente de HAP con mayor popularidad: Su estructura macroscópica es muy similar a la matriz mineral del hueso humano. El *coral* es otra fuente de HAP orgánica. El esqueleto de algunos corales, constituido por carbonato cálcico, se convierte en hidroxiapatita al provocarse un intercambio químico con fosfatos en un medio hídrico y en presencia de calor.

Existe otro tipo de hidroxiapatita natural microporosa y no reabsorbible derivada de las *algas (ficógena)*. Algunas algas presentan una superficie con arquitectura muy parecida a la del hueso, teniendo afinidad por las proteínas y los factores de crecimiento de la matriz ósea. Sus propiedades fisicoquímicas son casi idénticas a las del hueso, debido a su gran área superficial, al tamaño pequeño del cristal y a su contenido en carbono.

2.2.2 Origen sintético

La HAP sintética *no cerámica* equivale a la porción del hueso humano desde el punto de visto físico, químico y cristalográfico. Es un material que reabsorbe lentamente, actuando como matriz ósea sobre la que se va depositando el hueso neoformado.

La HAP sintética de origen *cerámico* está constituida por partículas esféricas de alta densidad y gran pureza. Es un material muy biocompatible, no reabsorbible, que permite la aposición directa del hueso.

2.3 Aplicaciones de la hidroxiapatita

Debido a su biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad, la HAP es un material con diversas aplicaciones en el campo médico.

La osteoconducción es una de las características más importantes debido a que esto significa que la HAP favorece el crecimiento de hueso hacia sí mismo, estableciendo un contacto directo entre ellos, lo cual la vuelve atractiva para su uso como cubierta de implantes metálicos, así como también para rellenar defectos óseos creados por quistes y tumores.

Desde hace más de 30 años la HAP es utilizada en numerosas especialidades médicas como la Cirugía Plástica, Urología y Uropediatria, Otorrinolaringología, Ortopedia y Odontología [BIOFORM Medical]. En el campo de la odontología la HAP se aplica para aumentar los rebordes alveolares atróficos, así como en la preservación de la reabsorción de éstos [Quintana, 1998].

Para cualquiera de las posibles aplicaciones de este material, es necesario controlar en el proceso de obtención su composición, impurezas, morfología, cristalinidad, tamaño del cristal y de las partículas, ya que pequeñas variaciones en éstas ocasionan diferentes propiedades en el material implantado, tanto en su bioactividad y ámbito de disolución como en su reabsorción [De La Calle *et al.* 2006].

2.4 Métodos de síntesis de hidroxiapatita

2.4.1 Precipitación

Se emplean disoluciones con varias fuentes de los grupos químicos fosfato y calcio. Por lo general, se producen pequeños cristales de HAP por precipitación. Su principal desventaja es la presencia de fases metaestables en el producto final de la reacción. Este es uno de los principales métodos utilizados a escala industrial [Sáenz *et al.* 2006].

La regla de Ostwald permite predecir los compuestos que se formarán en determinadas condiciones del proceso. Según esta regla, la primera fase que se forma será aquella de mayor solubilidad. Esa fase se transforma seguidamente por disolución y recristalización en las fases menos solubles [Martins *et al.* 1996]

2.4.2 Vía hidrotérmica

Este método consiste en promover la formación de HAP a partir de soluciones acuosas a temperaturas elevadas, en el ámbito de 140 a 500°C. Mediante esta vía se puede obtener HAP pura, estequiométrica y con pocos defectos en la red cristalina [Martins *et al.* 1996] Su principal desventaja es el pobre control de todas las variables y sobretodo, la limitación de que sólo se producen partículas relativamente grandes [Sáenz *et al.* 2006].

2.4.3 Métodos de estado sólido

Las reacciones en estado sólido generalmente son controladas por procesos difusivos sólido-sólido, los cuales se ven favorecidos a altas temperaturas debido a la movilidad atómica.

El procedimiento estándar se compone de las siguientes etapas: molienda conjunta de los sólidos reaccionantes, peletización y sinterización. La molienda puede realizarse por vía seca o húmeda, generalmente esta última es más efectiva. La peletización se puede lograr mediante prensado o aglutinación con algún agente. La sinterización se lleva a cabo a temperaturas superiores a los 900 °C.

Las hidroxiapatitas obtenidas mediante vía térmica se caracterizan por su alta cristalinidad, estequiometría regulable y baja solubilidad [Martins *et al.* 1996].

Pequeñas desviaciones de la relación atómica teórica de Ca/P (1,67) en la mezcla de reacción, conducen a la obtención de una mezcla de hidroxiapatita y otros compuestos, como indica el diagrama de fases del sistema CaO-P₂O₅ mostrado en la Figura 2.1.

La mayor desventaja es el consumo energético del proceso, así como también que estos métodos sólo producen con facilidad cristales relativamente grandes. No obstante, existe un descubrimiento reciente de que muchas reacciones de este tipo que producen HAP tienen como subproducto el CO₂, el cual podría explotarse convenientemente para controlar la porosidad del producto final [Sáenz *et al.* 2006].

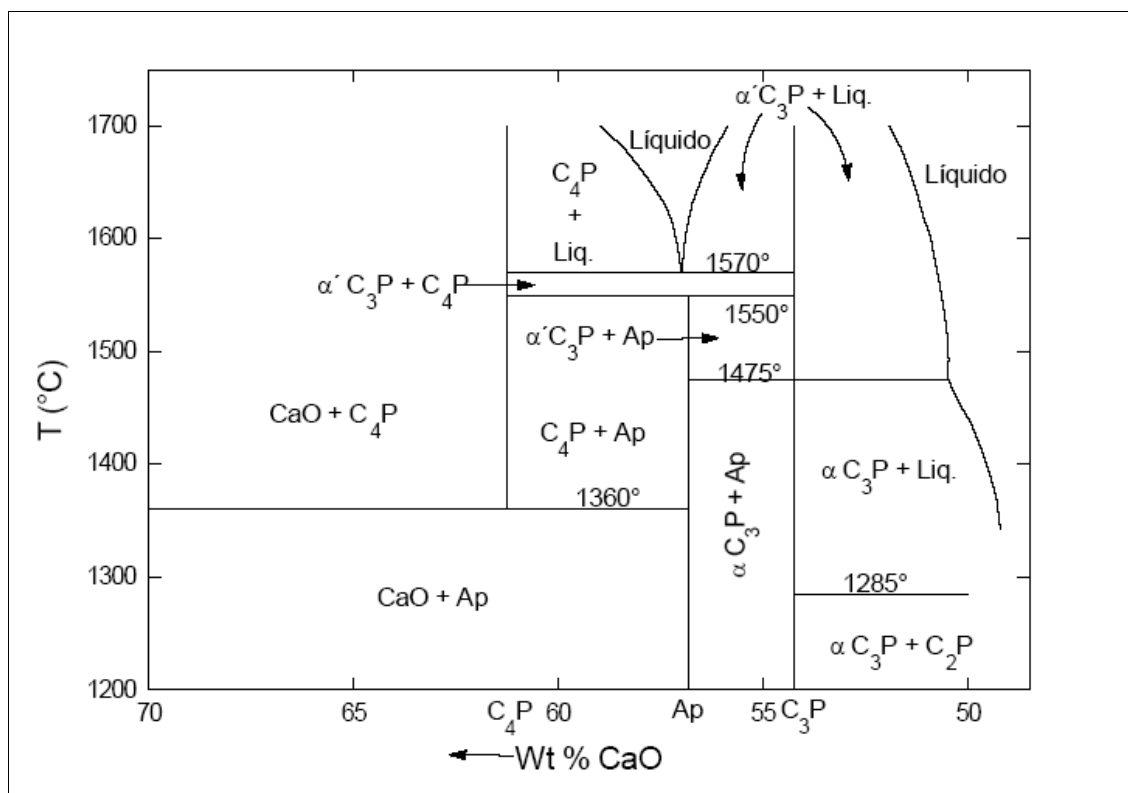


Figura 2.1 Diagrama de fases del sistema CaO-P₂O₅ en presencia de 500 mm de Hg de presión de vapor de agua (Ca₂P=Ca₂P₂O₇, C₃P=Ca₃(PO₄)₂, C₄P= Ca₄(PO₄)₂; Ap= hidroxiapatita) [Martins *et al* 1996.].

2.5 Normas relacionadas con la producción de hidroxiapatita

Los productos con hidroxiapatita que se encuentran actualmente en el mercado cumplen con determinados estándares. Las normas más utilizadas a nivel mundial son las brindadas por el “*American Society for Testing and Materials*” (ASTM), las del “*Food and Drug Association*” (FDA), y las del “*International Organization for Standardization*” (ISO).

La importancia de éstas radica en el hecho de que en conjunto, estas normas aseguran que el producto es seguro y favorable para la salud pública, asimismo le confiere mayor confiabilidad al producto, y facilitan el comercio tanto nacional como internacional.

2.5.1 Normas ASTM

La ASTM internacional es una de las más grandes organizaciones de estandarización voluntarias en el mundo, y proporciona normas técnicas para materiales, productos, sistemas y servicios.

Algunas de las normas ASTM relacionadas con la hidroxiapatita para aplicaciones médicas incluyen la F748, que se refiere a pruebas biológicas para materiales; la F981, que se refiere a la compatibilidad de biomateriales para implantes; la F1185, que se refiere a especificaciones de composición de HAP cerámica para implantes; la F1609, que se refiere a especificaciones para recubrimientos de materiales implantables, de fosfato de calcio; la F1088, que se refiere a especificaciones para el fosfato β -tricalcico para implantes; la F2024, que se refiere a la práctica de determinación de fases por Difracción de rayos X.

2.5.2 Normas FDA

La asociación FDA es responsable de la protección de la salud pública en Estados Unidos, asegurando la seguridad y eficacia de los fármacos tanto para humanos como veterinarios,

de los productos biológicos, de los dispositivos médicos, de los alimentos distribuidos en el país, de los cosméticos y de los productos que emiten radiación.

En el campo de productos de aplicación médica se encarga desde la aprobación de éstos, la verificación de los procesos de manufactura y el desempeño del mismo, hasta el monitoreo de los efectos secundarios adversos de dicho producto.

2.5.3 Normas ISO

La organización ISO es la más grande a nivel de estándares internacionales, en cuanto a desarrollo y publicación. Es una organización no gubernamental constituida por una red de instituciones de normalización de 157 países.

Algunas de las normas ISO relacionadas con la hidroxiapatita para aplicaciones médicas incluyen las ISO-9000, que certifican la calidad; las ISO-13485, que se refieren a dispositivos médicos; las ISO-13779; que se refieren a la HAP como material de implante; y las ISO-10993, que se refieren a la evaluación biológica de dispositivos médicos.

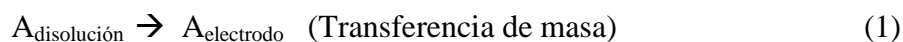
CAPÍTULO 3

PRODUCCIÓN DE HIDROXIPATITA MEDIANTE ELECTROQUÍMICA

3.1 Fundamentos de electroquímica

Los sistemas electroquímicos consisten en el intercambio de carga entre un electrodo y un donador o aceptador de electrones presente en una disolución, donde ocurre transferencia de carga entre dos electrodos, a través del disolvente [Wendt *et al.* 1993].

La transferencia de electrones sólo puede ocurrir en dimensiones moleculares, por lo tanto la oxidación/reducción del reactivo sólo será posible cuando se encuentre inmediatamente adyacente al electrodo. Un cambio químico significativo requiere la siguiente secuencia de pasos [Genders y Pletcher, 1990]:



El equilibrio es el estado donde no ocurre cambio químico neto, y éste puede ser expresado en términos de la corriente I , y las corrientes parciales de reducción I_{red} y oxidación I_{ox} :

$$I = I_{ox} + I_{red} = 0 \quad (4)$$

En la práctica, la magnitud de las densidades de corriente parciales en el potencial de equilibrio es una característica importante de la reacción del electrodo, llamada *densidad de corriente de intercambio*, I_0 ,

$$I_{ox} = -I_{red} = I_0 \quad (5)$$

Si un potencial E_e se suministra al electrodo de trabajo, éste buscará realizar el cambio químico necesario para restablecer el equilibrio; las concentraciones de equilibrio de la especie oxidada O, y la especie reducida R en el potencial E, serán de todas formas diferentes de aquellas preparadas para el experimento. Si $E > E_e$ se espera tener una densidad de corriente neta de oxidación, mientras que si $E < E_e$ se espera tener una densidad de corriente neta de reducción.

Experimentalmente, se ha determinado que las constantes de reacción tienen una dependencia exponencial del potencial:

$$k_{ox} = k' \exp \frac{\alpha n F E}{RT} \quad (6)$$

$$k_{red} = k'' \exp \frac{-(1-\alpha)nFE}{RT} \quad (7)$$

Donde α es el coeficiente de transferencia anódico; F y R provienen de la ecuación de Nernst, donde F es la constante de Faraday y R , la constante universal de los gases.

Por simplicidad, es mejor formular las expresiones cinéticas en términos de sobrepotenciales, en lugar de potenciales. El sobrepotencial se define por:

$$\eta = E - E_e \quad (8)$$

Por lo tanto, la densidad de corriente versus el sobrepotencial se define por la ecuación de *Butler Volmer*:

$$I = I_0 \left(\exp \frac{\alpha n F \eta}{RT} - \exp \frac{-(1-\alpha)nF\eta}{RT} \right) \quad (9)$$

Dicha densidad de corriente es la suma de las densidades de corriente parcial anódica y catódica, y la magnitud de cada una de éstas depende de la densidad de corriente de intercambio (I_0), el coeficiente de transferencia (α) y el sobrepotencial aplicado.

Para cada potencial, la densidad de corriente se puede estimar a partir de la primera ley de Fick:

$$I = nFD \frac{(C_R - C_R^\delta)}{\delta} \quad (10)$$

En donde D es el coeficiente de difusión de la sustancia reducida (R), y δ es el espesor equivalente de la capa limitante.

A sobrepotenciales altos, la concentración de la sustancia reducida en la superficie tiende a cero, y por lo tanto la densidad de corriente se vuelve independiente del potencial [Genders y Pletcher, 1990].

3.2 Transferencia de masa en sistemas electroquímicos

En los sistemas electroquímicos es necesario considerar tres maneras de transferencia de masa:

- *Difusión*: el movimiento de las especies ocurre debido a gradientes de concentración.
- *Convección*: el movimiento de especies ocurre debido a la aplicación de una fuerza mecánica externa.
- *Migración*: el movimiento de las especies cargadas ocurre debido a un gradiente de potencial. Es un fenómeno puramente electrostático, que para sistemas con altas concentraciones de electrolitos inertes no contribuye en forma significativa en el proceso de transferencia

Existe gran dependencia por parte del coeficiente de transferencia de masa k_m con respecto al número de Reynolds. Aún cuando la magnitud del número de Reynolds tiene ordenes altos como 10^5 , el coeficiente de transferencia de masa no excede los 10^{-2} cm/s.

La dependencia del coeficiente de transferencia de masa de las condiciones dinámicas del fluido es mejor representada de manera adimensional, que es independiente de la geometría del sistema y las propiedades del disolvente y soluto, sobre todo en lo que respecta a viscosidad del disolvente y difusividad del soluto. De esta manera, en lugar de relacionar el coeficiente de transferencia de masa con la velocidad lineal de flujo, o con el número de Grashof (Gr; convección libre), el número de Sherwood (Sh) es correlacionado con el número de Reynolds (Re).

$$Sh = k_m d/D \quad (11)$$

$$Re = u d/\nu \quad (12)$$

Donde d es la distancia entre electrodos, u es la velocidad de flujo linear y ν la viscosidad cinemática. Si lo anterior se expresa en términos de densidad de corriente limitada por la transferencia de masa:

$$Sh = \frac{I}{nFC^{x=\infty}} \frac{d}{D} \quad (13)$$

El Cuadro 3.1 presenta un resumen de correlaciones adimensionales importantes relacionadas con la transferencia de masa tanto para convección libre como forzada, para distintos arreglos de electrodos.

Cuadro 3.1 Correlaciones adimensionales para transferencia de masa

Sistema	Correlación	Longitud característica y velocidad usada para definir las cantidades adimensionales	Límites de validez
Convección forzada A través de celdas de placa paralelas	1) $Sh = 2.54(ReSc)^{1/3}(d/L)^{1/3}$	espacio entre electrodo y Longitud	1) $Re \leq 3000$, flujo laminar
	2) $Sh = 0.025Re^{0.8}Sc^{1/3}$		2) $Re > 3000$, flujo turbulento

Cuadro 3.1 (continuación) Correlaciones adimensionales para transferencia de masa

Sistema	Correlación	Longitud característica y velocidad usada para definir las cantidades adimensionales	Límites de validez
Convección libre a través placas verticales	$Sh = 0.66(ScGr)^{1/4}$	altura del electrodo	$500 < Sc < 80000$ $10^4 < Gr < 10^9$
Flujo laminar			$5 \times 10^6 < ScGr < 5 \times 10^{12}$
Flujo turbulento	$Sh = 0.31(ScGr)^{0.28}$	altura del electrodo	$4 \times 10^{13} < ScGr < 10^{15}$
Convección libre a través placas horizontales	$Sh = 0.19(ScGr)^{1/3}$	altura del electrodo	$10^8 < ScGr < 1.4 \times 10^{12}$ $2.1 \times 10^3 < Sc < 5.2 \times 10^4$
Convección libre entre electrodos verticales y Flujo diafragma A través de placa	$Sh = 0.0225(ScGr)^{0.85}(e/h)^2$	Distancia e electrodo-diafragma	$2 \times 10^6 < ScGr < 2 \times 10^8$ $0.005 < e/h < 5.48(ScGr)^{-0.3}$
Flujo axial a través de espacio Entre dos cilindros Coaxiales		altura del electrodo en dirección de flujo lineal velocidad de flujo diámetro equivalente velocidad de flujo	$Re < 3 \times 10^5 - 10^6$ $300 < Sc < 3000$
Flujo laminar	$Sh = 1.62 (Re Sc)^{1/3} \left(\frac{d_e}{L} \right)^{1/3}$		$300 < Re < 2100$
Flujo turbulento	$Sh = 0.023Re^{0.8}Sc^{1/3}$		$2100 < Re < 30000$
Cilindro rotatorio	$Sh = 0.079Sc^{0.356}Re^{0.7}$	diámetro del cilindro Velocidad	$1000 < Re < 100000$ $835 < Sc < 11490$
Cilindro rotatorio con Cilindro estacionario coaxial	$Sh = 0.079 Re^{0.7} Sc^{0.356} \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^{0.7}$	Circunferencial diámetro del electrodo velocidad circunferencial	$1000 < Re < 53000$ $0.22 < d_2/d_1 < 0.68$

* $Sh = j_1 L/Dc^{x=1}$; $Gr = g L^3 (\rho_0 - \rho_e) / \rho_0 \nu^2$; $Re = uL/\nu$; $Sc = \nu/D$; d = espacio entre electrodos; d_1 = diámetro del electrodo estacionario de trabajo; d_2 = diámetro del electrodo rotatorio; d_e = diámetro equivalente = $(d_2 - d_1)$; e = distancia electrodo-diafragma; h = altura del electrodo; L = longitud del electrodo [Wendt *et al.* 1993].

Existe cierta interacción entre la transferencia de electrones y la transferencia de masa, en este sentido, es posible que ocurran cuatro situaciones distintas [Genders y Pletcher, 1990]:

- a) En el potencial de equilibrio, la densidad de corriente es cero.
- b) A bajos sobrepotenciales, la razón de transferencia de electrones es el paso determinante en la reacción, por lo que la densidad de corriente es la misma bajo cualquier condición de transferencia de masa. En este ámbito, la concentración del reactivo no se desvía en forma significativa valor en el seno del fluido.
- c) Debido a que la razón de transferencia de electrones aumenta exponencialmente con el potencial, la razón de transferencia de electrones eventualmente será comparable con la razón de transferencia de masa. En este ámbito, la concentración del reactivo en la superficie es menor que la que se encuentra en el seno del fluido y por ello la densidad de corriente varía hasta cierto punto, con las condiciones de transferencia de masa.
- d) A mayores sobrepotenciales, la razón de transferencia de electrones se vuelve muy rápida y por ello la razón de transferencia de masa se convierte en el paso determinante en la reacción. La densidad de corriente depende fuertemente de las condiciones de transferencia de masa, pero no depende del potencial. La concentración del reactivo en la superficie se vuelve cero.

3.3 Factores condicionantes en la electroquímica

3.3.1 Disolvente

La baja solubilidad de compuestos orgánicos en agua (el disolvente más económico y menos contaminante), exige el uso de otros disolventes, para cuya selección hay que recurrir a las propiedades conductoras de electricidad y al intervalo de potencial útil, la reactividad y adsorción, así como la pureza, toxicidad y fácil manipulación.

La elección de un electrolito soporte también está condicionada por su intervalo útil de potencial, cuyo límite catódico depende del catión y el anódico del anión.

Algunos de los disolventes habitualmente empleados son: agua, acetonitrilo, carbonato de propileno, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, nitrometano y piridina [Mirífico, 2005].

3.3.2 Especie electroactiva

El sustrato puede experimentar modificaciones químicas previas a la transferencia electrónica, las cuales pueden afectar su comportamiento electroquímico, por esta razón, la especie electroactiva debe estar claramente identificada [Mirífico, 2005].

Algunas de las modificaciones de sustrato que ocurren comprenden las siguientes:

- a) Complejación π con un donador: los complejos de transferencia de carga se mantienen unidos por fuerzas de interacción muy débiles.
- b) Complejación con un ión metálico
- c) Reacciones ácido base (cambios de pH pueden modificar la respuesta voltamétrica)

3.3.3 Naturaleza del electrodo

La naturaleza del electrodo puede influir en el curso de las reacciones electroquímicas, hasta el punto de poder modificar los productos formados o su composición según el material del mismo.

En relación con el material y la superficie del electrodo también deben tenerse en cuenta los efectos de adsorción [Mirífico, 2005]. En relación con la geometría del electrodo, existe un límite de desempeño máximo alcanzable en cuanto a electrodos planos.

Los electrodos de geometría tridimensional además de proveer alta superficie de contacto, son promotores de la turbulencia en el sistema, con lo que se ven favorecidos los fenómenos de transferencia de masa. Sin embargo, estos electrodos presentan una compleja distribución de corriente y potencial. Adicionalmente, debido a una creciente caída de presión en la disolución al alejarse de la membrana, ocurre un incremento en la resistencia que la disolución ofrece, la cual varía con la distancia hacia la membrana y, con la creciente penetración de la reacción en la estructura del electrodo, la corriente total de la celda aumenta y por lo tanto, el voltaje de la disolución se incrementa. Como resultado de esto, la fuerza motriz de transferencia electrónica local, va a disminuir a través de la superficie del electrodo y la densidad de corriente local disminuirá también, hasta un límite en que la reacción no ocurrirá.

El problema de distribución de corriente se empeora al trabajar con altas densidades de corriente, baja conductividad de la disolución y estructuras tridimensionales gruesas. Por esta razón, los electrodos tridimensionales son más recomendables para sistemas con baja concentración de reactivos o reacciones que sólo pueden llevarse a cabo a bajas densidades de corriente [Genders y Pletcher, 1990].

3.3.4 Potencial de trabajo

Los procesos electroquímicos pueden ocurrir en varias etapas separadas, con la formación de intermediarios estables, cada uno de los cuales se origina a un valor de potencial determinado [Mirífico, 2005].

3.3.5 Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura en las reacciones electroquímicas no suele ser importante, pero puede cambiar el resultado final, ya sea por modificación de la velocidad de las reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de electrones, o por

complicación en la retención y detección de compuestos volátiles que intervienen en el mismo [Mirífico, 2005].

3.3.6 Efecto protónico

Una misma sustancia puede reaccionar electroquímicamente mediante diferentes mecanismos, según si el proceso se lleva a cabo en un disolvente prótico o aprótico.

El efecto de la concentración de protones aparece en numerosos procesos e inevitablemente en aquéllos en los que la especie electroactiva es un ácido o una base, situación en la que el pH de la disolución tiene una importancia fundamental [Mirífico, 2005].

3.4 Aplicaciones de la electroquímica

Los métodos electroquímicos son considerados como “amigables” con el ambiente, debido a que el reactivo es el electrón y hay ausencia de subproductos, lo cual lo convierte en un método atractivo para la síntesis de productos farmacéuticos, agroquímicos y productos naturales complejos [Mirífico, 2005].

La *electrosíntesis*, resulta muy atractiva en el sector de la industria química debido a sus ventajas técnicas, a la posibilidad de patentabilidad, así como la de innovar en los procesos de manufactura.

De acuerdo con Genders y Pletcher, la electrosíntesis es una tecnología útil cuando en una reacción se busca lo siguiente:

- Síntesis de moléculas determinadas con estructuras favorables
- Desarrollar nuevas transformaciones químicas
- Mejorar la selectividad de reacciones conocidas
- Reducir el número de etapas en una síntesis determinada

- Utilizar materias primas más baratas
- Evitar el uso de reactivos peligrosos y condiciones de operación peligrosas
- Reducir los desechos producidos por el proceso
- Reducir los costos del proceso

Algunas de las ventajas que tienen los métodos electroquímicos son las siguientes [Mirífico, 2005]:

- Empleo de equipos simples y poco costosos
- Los métodos electroquímicos son rápidos, de fácil control automático y tienen buenos rendimientos
- No se forman subproductos, con lo que se evitan otras operaciones de separación
- Mayor eficiencia que con reactivos químicos oxidantes o reductores convencionales
- Son métodos particularmente “verdes”.
- Se puede trabajar a temperatura ambiente para favorecer reacciones difíciles, variando su velocidad de reacción por modificación del potencial aplicado

Las desventajas que presenta el método se refieren más que todo al fenómeno de transferencia en sí, como lo es la existencia de una mala distribución de corriente en el electrodo, lo cual incrementa parcialmente las densidades de corriente locales incrementando con ellas el sobrepotencial. Un aumento en la resistencia específica del electrolito debido a la incorporación de burbujas de gas dispersadas puede causar bloqueo parcial de la superficie del electrodo. Asimismo, una separación excesiva entre los electrodos puede agregar excesiva resistencia eléctrica al sistema [Wendt *et al.* 1993].

3.5 Electrosíntesis de hidroxiapatita

La preparación de HAP con características controladas de morfología, estequiometría, cristalinidad y especialmente, tamaño de partícula en el ámbito nanométrico, es fundamental para la producción de diversos biomateriales [Montero *et al.* 2006].

Por medio de la electrólisis de una disolución homogénea de $\text{Ca}/\text{EDTA}/\text{PO}_4^{3-}$ se producen sólidos nanométricos de HAP, de forma controlada. El ácido etilendiaminetetraacético, cuya forma abreviada es EDTA por sus siglas en inglés, es un agente acomplejante. El uso de agentes acomplejantes, permite incrementar la concentración del ión en la disolución [Montero *et al.* 2006].

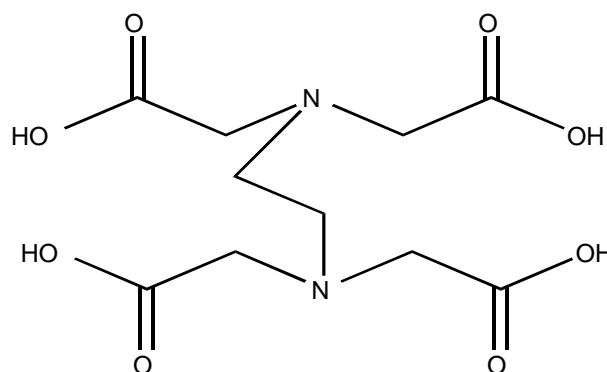
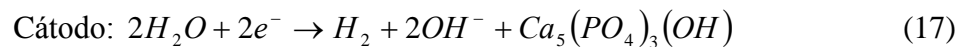


Figura 3.1 Estructura molecular del EDTA

El mecanismo de formación para esta reacción requiere de la liberación del calcio a través de la oxidación del EDTA y la generación de iones OH^- a través de la reducción del agua y la migración iónica hacia los electrodos.

En el transcurso de la reacción se va dando la oxidación del EDTA. En la electrólisis de este agente acomplejante en medio básico, el EDTA puede ser completamente oxidado hasta CO_2 [Pakalapati *et al.* 1996].

Las reacciones que ocurren en el cátodo y el ánodo del electrodo son las siguientes:



Todo el proceso ocurre en la superficie del cátodo. Estudios preliminares demuestran la posibilidad de controlar la morfología y cristalinidad de la HAP obtenida, cambiando la densidad de corriente aplicada. Asimismo, encontraron que el tamaño del cristal depende fuertemente del valor de pH inicial de la disolución, el cual decrece al aumentar el pH, pero siempre en el ámbito nanométrico [Montero *et al.* 2006].

En la electrólisis de una disolución Ca/EDTA/ PO_4^{3-} con una relación de concentración de 0.25/0.25/0.15M, se obtuvo el menor tamaño de cristal (entre 30 y 50 nm), utilizando un pH inicial de 9, una densidad de corriente de 137 mA/cm², y un electrodo rectangular de platino [Montero *et al.* 2006].

CAPÍTULO 4

MATERIALES, EQUIPO Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El objetivo general del presente proyecto es caracterizar el efecto del tratamiento electroquímico y térmico sobre la hidroxiapatita extraída de hueso bovino, para así producir un material con propiedades que le permitan ser utilizado en alguna aplicación biomédica.

En este capítulo se encuentra la metodología utilizada durante la ejecución del proyecto, incluyendo en éste los objetivos, procedimientos experimentales y diseños estadísticos de los mismos para las dos etapas de investigación desarrolladas.

4.1 MATERIALES

A continuación se presenta el detalle de los distintos materiales, reactivos y equipos utilizados para la ejecución del proyecto.

4.1.1 MATERIAS PRIMAS

Los huesos utilizados como materia prima son proporcionados por una industria de carnes. Las características de estos huesos se presentan en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1 Características del hueso utilizado.

Lote	Características
1	Todo tipo de hueso: costillas, fémur, pelvis, cartílago. Presencia de gran cantidad de carne y sangre adherida a varios de los huesos
2	Huesos más duros y blancos, no se incluyen costillas. Presencia de carne, piel y sangre adherida a varios de los huesos.
3	Solamente fémur cortado en trozos de aproximadamente 10 cm. No tiene carne ni sangre adherida, sólo contiene grasa en la parte central del hueso, fácilmente removible.

4.2 REACTIVOS

Los detalles de los reactivos utilizados durante las dos etapas experimentales se presentan en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2 Especificaciones de los reactivos utilizados durante la realización del proyecto.

Reactivo	Fabricante	Pureza	Calidad
Acido clorhídrico	GAMMA	37% molar	Grado ACS
Acido etilendiaminotetraacético	Merck	-	Titriplex II-Grado ACS
Etanol	UCR	95%	Proveeduría Escuela de Química (6-7-2007)
Hidróxido de Sodio	GAMMA	97%	Grado ACS

4.3 EQUIPO EXPERIMENTAL

El equipo experimental utilizado durante la realización del proyecto se detalla en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.3 Especificaciones de los equipos utilizados durante la realización del proyecto.

Equipo	Fabricante	Placa U.C.R.
Fuente de poder	Agilent E3644A	223357
Equipo de Agitación Magnética	CORNING PC-420D	-
Equipo de medición de pH	DAIGGER (Modelo 6005C)	242316
Agitador magnético	Scienceware-Bel Art Products	-
Electrodo cilíndrico concéntrico de platino	Arthur H.Thomas Company (1-4064 D15)	-
Molino de cuchillas	Proctor-Silex E160B	-
Equipo de Extracción Soxhlet	Kontes Glass Co.	-
Mufla	NEY (Modelo 2-160)	140476

4.4 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL: ELECTRÓLISIS DE LA DISOLUCIÓN DE EDTA-HUESO

4.4.1 OBJETIVO EXPERIMENTAL

Al aplicar corriente eléctrica a una disolución de EDTA-Hueso, se genera un potencial que propicia la generación de iones OH^- a través de la reducción del agua, así como la oxidación del EDTA, lo cual hace que se libere el calcio que se encuentra en disolución.

Hay varios factores que influyen en el porcentaje de liberación del calcio, es decir, en el rendimiento de la electrólisis. En esta etapa experimental se evalúan diferentes tratamientos de densidad de corriente y velocidad de agitación, con el objetivo de determinar si éstas tienen un efecto significativo sobre el rendimiento y sobre la relación Ca/P, la cual se utiliza para identificar la HAP.

4.4.2 VARIABLES

Parámetros fijos: antes de iniciar cada electrólisis las disoluciones se ajustan a un pH inicial de 7,2. Asimismo, el tiempo de electrólisis empleado en cada experimento es de 6 horas.

Factores de estudio: se emplearon como factores la densidad de corriente y la velocidad de agitación de la disolución.

Variables de respuesta: en esta etapa experimental se analizan dos variables de respuesta, las cuales son el porcentaje de rendimiento y la relación atómica Ca/P.

El valor de pH inicial utilizado, se eligió ya que de acuerdo con Montero *et al.* (2006), alrededor de este valor se obtiene HAP con el menor tamaño, nanométrico; lo cual le

confiere mejores propiedades a la HAP sobre todo en cuanto a bioactividad, dado que aumenta su área superficial.

El tiempo de electrólisis empleado, se eligió de manera que se tuviera un rendimiento aceptable, de acuerdo con las pruebas preliminares de rendimiento (Cuadro A.7), y que no fuera muy largo, debido a la disponibilidad limitada del equipo.

Los factores, que corresponden a las variables manipuladas, se seleccionaron considerando los resultados de experimentación de Montalbert (2008), de los cuales se observó que a densidades de corriente menores a 50 mA/cm^2 , la formación de HAP se desfavorece, formándose otras fases de apatitas, y que alrededor de 140 mA/cm^2 se obtiene HAP con la morfología más deseable, sobretodo en cuanto a tamaño (nanométrico). No obstante, debido al ámbito de trabajo de la fuente de poder, y la alta área superficial del electrodo utilizado, no se pudo trabajar a tan altas densidades de corriente. Se eligieron las densidades de corriente, de manera que se trabajara por encima del mínimo que asegurara la formación de HAP, y con el máximo disponible en el equipo. Con respecto a la velocidad de agitación, la cual es una variable que no se había estudiado antes, se elige como máximo el utilizado durante las pruebas de determinación del rendimiento máximo, ya que este presentaba un ligero vórtice, y el resto se eligen de manera que se mantenga proporcionalidad entre ellos.

El porcentaje de rendimiento, que corresponde a una variable de respuesta, se obtiene tomando como base la masa de hueso que se añade inicialmente a la disolución de EDTA-Hueso, con la corrección debido al porcentaje de humedad y materia orgánica del hueso limpio calculados (Cuadros B.1 y B.2). La relación atómica Ca/P, la cual es la otra variable de respuesta analizada, se obtiene de los porcentajes atómicos del calcio y el fósforo proporcionados en los resultados de microanálisis EDS.

4.4.3 PLANO DE LA EXPERIMENTACIÓN

Con el fin de evaluar los tratamientos dados según los factores de estudio, sobre el rendimiento de la electrólisis y la relación Ca/P del producto, se realizó una serie de 18 experimentos bajo las condiciones del diseño de bloques aleatorizados con repetición, con 3 niveles estudiados tanto en el caso del factor densidad de corriente como en el caso del factor velocidad de agitación (ver Cuadros 5.1 y 5.3).

4.4.4 METODOLOGÍA

Según el procedimiento detallado en el apéndice D, sección D.2, Lotes 1 y 2; se realiza la limpieza del hueso. Se preparan disoluciones de EDTA-Hueso según el procedimiento detallado en el apéndice D, sección D.6, de las cuales, la 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 se mezclan para ser utilizadas como disolución de partida para la electrólisis.

Para cada experimento se debe utilizar 500 mL de la disolución EDTA-Hueso, y ajustar el pH a 7,2, agregando NaOH. Se coloca el beaker con esta disolución y un agitador magnético en una tina neumática llena de agua, para controlar la generación de calor producto de la reacción. Se elige la velocidad de agitación de estudio, y se introducen en la disolución, completamente sumergidos, el medidor de pH y el electrodo concéntrico, este último conectado a la fuente de manera que el electrodo con mayor área (exterior), constituya el cátodo (salida negativa). En la fuente de poder se elige el límite máximo para el voltaje, en este caso 20 voltios, y luego el amperaje correspondiente a la densidad de corriente de estudio; una vez realizado esto se enciende la salida de la fuente y se deja durante 6 horas. Se registran tanto los valores iniciales como finales de pH y temperatura dentro del beaker.

Una vez finalizada la electrólisis se deja asentar un poco el precipitado y luego se filtra al vacío con papel filtro cualitativo No.5. El sólido se deja secando en la estufa durante un día, luego se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se pesa.



Figura 4.1 Equipo experimental para la etapa de electrólisis.

4.5 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL: TRATAMIENTO TÉRMICO DEL HUESO

4.5.1 OBJETIVO EXPERIMENTAL

Dado que las HAP obtenidas por vía térmica se caracterizan por tener alta cristalinidad, tamaños de cristal relativamente grandes y además, que la eliminación de la materia orgánica presente en algún sólido se puede lograr al aplicar temperaturas superiores a los 550 °C; se puede generar HAP con propiedades distintas a las obtenidas mediante electrólisis, a través de la calcinación del hueso molido (eliminando la etapa de disolución en EDTA realizada para la electrólisis).

Existen varios factores que influyen en la calcinación de sólidos. En esta etapa experimental se evalúan diferentes tratamientos de temperatura, tiempo de calcinación y

concentración del disolvente de lavado, en este caso etanol, con el fin de determinar cuáles de estas variables tienen un efecto significativo sobre la morfología, eliminación de materia orgánica y sobre la relación Ca/P.

4.5.2 VARIABLES

Parámetros fijos: para el lavado del hueso antes de la calcinación, se mantiene fijo el tiempo de lavado del hueso con etanol, que corresponde a 2 horas, a partir del comienzo de reflujo. Asimismo, se mantiene constante el porcentaje en el reóstato, en 70%.

Factores de estudio: se utilizan como factores, la temperatura y el tiempo de calcinación, así como la concentración de etanol utilizada para el lavado del hueso.

Variables de respuesta: la variable de respuesta analizada en esta etapa experimental fue la relación atómica Ca/P, así como también la morfología y eliminación de materia orgánica.

La prelimpieza con etanol, se realiza con un equipo de extracción Soxhlet, y el tiempo de lavado se elige de manera que se asegure el número de extracciones recomendadas para realizar un buen lavado, que es de 7. Asimismo, se mantiene el porcentaje en el reóstato constante, para mantener iguales condiciones en todos los lavados.

Las temperaturas se eligen luego de realizadas algunas pruebas preliminares, donde se encontró que a menos de 600°C el hueso quedaba con restos de carbón en la superficie (oscuro), por lo que se eligen temperaturas por encima de este valor, aunque siempre procurando evitar temperaturas muy elevadas. Asimismo, se seleccionan tiempos de calcinación lo menor posible, ya que cuanto mayor es la temperatura y el tiempo de calcinación, mayor es el costo energético del proceso. Las concentraciones de etanol se eligen de manera que se pueda evaluar los casos extremos; en este caso, el efecto de utilizar

una alta concentración de etanol, o el efecto de la ausencia de tal disolvente en el lavado del hueso.

La relación atómica Ca/P, la cual es una de las variables de respuesta analizadas, se obtiene de los porcentajes atómicos del calcio y el fósforo proporcionados en los resultados de microanálisis EDS. A través también de fotografías SEM, se analiza otra de las variables de respuesta, la cual es la morfología. Finalmente, la cantidad de materia orgánica eliminada del hueso, se obtiene de la diferencia de masa del hueso en una balanza analítica antes y después de la calcinación.

4.5.3 PLANO DE LA EXPERIMENTACIÓN

Con el objetivo de estudiar los efectos de la temperatura, el tiempo de calcinación, y la concentración del etanol en el lavado, sobre la relación Ca/P, la morfología, y la cantidad de materia orgánica eliminada del producto, se realizó una serie de 9 experimentos, bajo las condiciones del diseño de cuadrado latino de 3 niveles por factor (3x3) (ver Cuadros 5.5 y 5.7).

4.5.4 METODOLOGÍA

Según el procedimiento detallado en el apéndice D, sección D.2, Lote 3; se realiza la limpieza del hueso. Se toma una mezcla de las mallas No. 40, 50, 60, 80 y fondos para utilizar como hueso de partida para el lavado.

Se pesa aproximadamente 2 g de hueso, y se coloca en un pequeño cilindro hecho con papel filtro cualitativo No.3, el cual se introduce en el embudo del equipo de extracción soxhlet. Se llena el balón del equipo de extracción con aproximadamente 200 mL del disolvente con la concentración de estudio y se enciende el reóstato a un 70%. Una vez que inicia el reflujo se empieza el conteo de las 2 horas de lavado. Concluido el tiempo de

lavado, se coloca el hueso en la estufa durante al menos 30 minutos, para secar y eliminar restos del disolvente, luego se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

Se pesa en una balanza analítica el hueso lavado, sobre un crisol tarado a 600°C ¹. Se coloca el crisol con la muestra de hueso en una mufla a la temperatura de estudio, y se deja durante el tiempo de estudio, el cual se contabiliza a partir del momento en que se alcanza la temperatura deseada. Una vez concluido el tiempo de calcinación, se deja enfriando el crisol hasta temperatura ambiente sobre asbesto, y finalmente se pesa en la balanza analítica.

¹ Calentar el crisol en la mufla a 600°C durante una hora, dejar enfriar hasta temperatura ambiente sobre asbesto y pesar en la balanza analítica.

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los principales resultados experimentales del proyecto, así como sus análisis estadísticos. El capítulo se subdivide en tres análisis, de manera que se pueda evaluar por separado las dos etapas experimentales desarrolladas en el proyecto y posteriormente, realizar la comparación de los productos obtenidos con las normas y con un producto comercial.

La primera etapa comprende el análisis de resultados de la electrólisis de la disolución de EDTA-Hueso. Por medio de un diseño estadístico de bloques aleatorizados, utilizando tres niveles tanto para los bloques como para los tratamientos; se estudia el efecto de la densidad de corriente y el de la velocidad de agitación, sobre el porcentaje de rendimiento de la electrólisis para obtener HAP, y también, su efecto sobre la relación Ca/P de su producto.

La segunda etapa comprende el análisis de resultados del tratamiento térmico del hueso limpio. A través de un diseño estadístico del tipo cuadrado latino de tres niveles, se estudia el efecto de la temperatura de calcinación, el tiempo de calcinación y la concentración del etanol para lavado, sobre el porcentaje de materia orgánica removida del hueso, la relación Ca/P obtenida y la morfología del hueso.

La tercera etapa consiste en la comparación en cuanto a composición y morfología de los productos obtenidos en las dos etapas experimentales, con respecto a los parámetros establecidos por las normas FDA y los de algunas marcas comerciales.

PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL, ELECTRÓLISIS DE LA DISOLUCIÓN DE EDTA-HUESO

Como se mencionó con anterioridad en el marco teórico, a través de la electrólisis de una disolución homogénea de Ca/EDTA/PO_4^{3-} se producen sólidos nanométricos de HAP, de forma controlada. Para valores de pH mayores a 4,5 pero menores a 10,5, la HAP es el fosfato de calcio menos soluble, y con ello termodinámicamente más estable. Las condiciones del proceso no afectan solamente el porcentaje de rendimiento de éste, sino también propiedades del producto, como lo es la relación atómica Ca/P. La relación atómica Ca/P, es un parámetro importante, ya que permite confirmar la identidad del producto, en el caso de las HAP este valor varía entre 1,55 y 1,70 siendo 1,67 el valor estequiométrico.

Lo anterior ha sido comprobado experimentalmente por otros investigadores para HAP producida en forma sintética y los resultados de ésta constituyen los precedentes de esta nueva etapa experimental, en la cual se busca a través del mismo proceso obtener HAP a partir de hueso bovino. La materia prima de partida (hueso bovino limpio y molido), se caracterizó mediante IR a través del cual se identificaron las señales típicas de la HAP, en 3423, 1033 y 1420 cm^{-1} ; asimismo se realizó microanálisis EDS, mediante el cual se determinó que la relación atómica Ca/P del hueso molido de partida es de 1,51. El detalle de estos análisis, así como también las fotografías SEM se encuentra en los anexos.

En cuanto al procedimiento de preparación de la disolución de EDTA-Hueso, se tienen algunas observaciones importantes. Una de las complicaciones más importantes en la etapa de disolución lo constituye el alto contenido de materia orgánica remanente en el hueso utilizado como materia prima, lo cual hace que el proceso de disolución en sí sea muy lento, puesto que se requiere al menos 2 horas para que esto suceda. Aunque se brinde hasta un día de tiempo para la disolución, existe siempre la formación de una capa gelatinosa en la disolución, debida probablemente a la presencia de muchas proteínas, por lo cual siempre fue necesaria una filtración al vacío utilizando celite, dado que si ésta no se utilizaba el proceso de filtración podía tardar muchas horas.

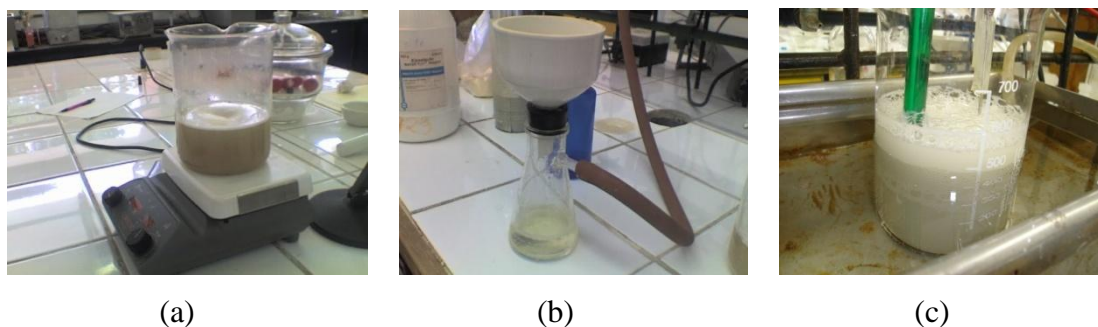


Figura 5.1 Preparación de Disolución Hueso-EDTA (a) Disolución EDTA-Hueso, (b) Filtración al vacío de la disolución EDTA-Hueso, (c) Etapa inicial de electrólisis de la disolución EDTA-Hueso.

En la Figura 5.1, se observa el color beige de la disolución EDTA-Hueso, debido a la materia orgánica remanente en el hueso, por lo cual se realiza una filtración, después de la cual la disolución presenta un color amarillento, como se ve en la Figura 5.1(b). No obstante, al haber formación de espuma durante la etapa inicial de la electrólisis, como se observa en la Figura 5.1(c), se evidencia que aún hay presencia de proteínas y restos de materia orgánica.

Por todo lo anterior, es claro que se debe depurar el procedimiento utilizado para la limpieza del hueso. Se realizaron algunas pruebas variando la concentración de NaOH utilizada para la limpieza. Se observó que al aumentar la concentración de la base, aunque aparentemente se elimina mayor cantidad de materia orgánica, se está generando una descalcificación del hueso, puesto que mediante análisis EDS antes y después del tratamiento con NaOH, se observaba una disminución considerable del valor del porcentaje en peso del calcio en el hueso, disminuía de un valor de 40% hasta un 28%.

Una vez preparada la disolución lo primero a realizar durante la investigación, es comprobar que se logra la extracción de la HAP del hueso bovino a través de la electrólisis, para posteriormente realizar el estudio de los factores.



Figura 5.2 Avance de la electrólisis de una disolución de EDTA-Hueso.

Para confirmar la identidad del producto obtenido en las electrólisis, se analizaron todos los productos mediante espectroscopía infrarroja (FTIR).

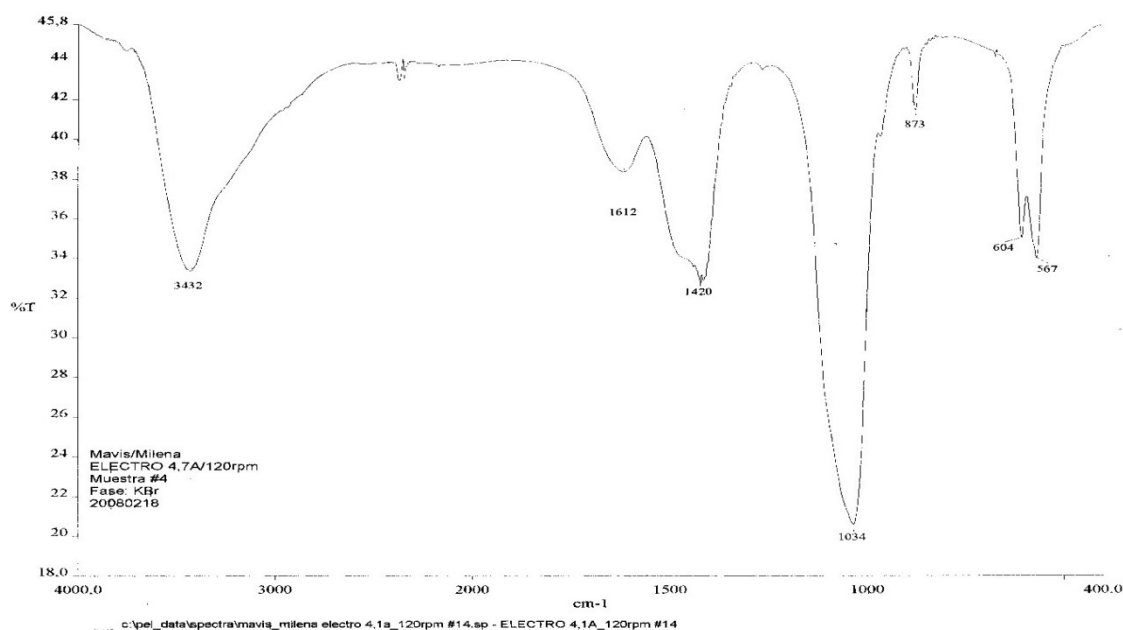


Figura 5.3 Espectro FTIR para el producto de la corrida No.14 de electrólisis efectuada a 103 mA/cm^2 y 120 rpm.

En el espectro mostrado en la Figura 5.3, correspondiente a una de las electrólisis efectuada a 103 mA/cm^2 y 120 rpm, se observa la señal característica del grupo OH, en este caso en 3432 cm^{-1} ; asimismo, se encuentran las señales características del grupo fosfato en 1034 , 604 y 567 cm^{-1} .

Las anteriores son las señales más importantes que presenta la HAP mediante espectroscopía FTIR. Las señales que se encuentran en 873 y 1420 cm^{-1} , se deben a grupos

carbonato, que son comunes también en las hidroxiapatitas, sobre todo si trata de HAP extraída de hueso animal. La presencia de grupos carbonato puede ocasionar una disminución en el valor de la relación atómica Ca/P.

Los espectros FTIR realizados para el resto de los productos de las electrólisis, los cuales se encuentran en los anexos; presentan estas mismas señales con muy ligeras variaciones en los valores o intensidades. Esto permite confirmar que el producto obtenido en cada una de las electrólisis efectivamente corresponde a HAP.

Adicionalmente, se obtuvo una fotografía de uno de los productos de electrólisis, utilizando la metodología SEM, para determinar la morfología de la HAP obtenida.

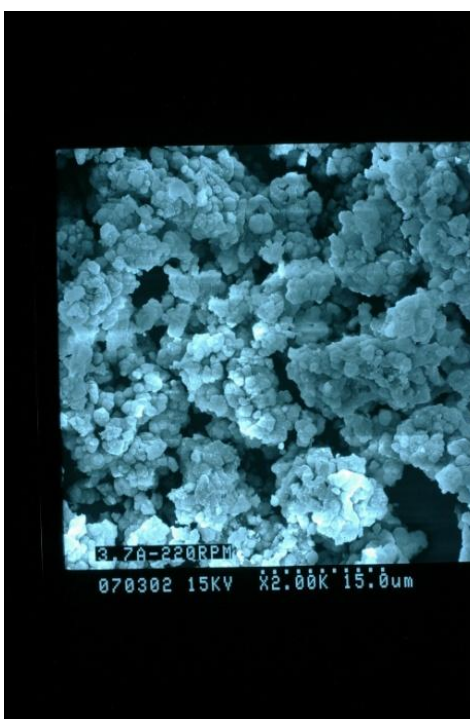


Figura 5.4 Fotografía SEM del producto de la corrida No.9 de electrólisis efectuada a 93 mA/cm² y 220 rpm.

En la Figura 5.4 se observa que de la electrólisis efectuada a 93 mA/cm² y 220 rpm, se han obtenido cristales amorfos de HAP, de superficies redondeadas.

En cuanto al análisis de los resultados de la electrólisis, por medio de un diseño de bloques aleatorizados con tres niveles tanto para bloques como para tratamientos, se analizan los efectos e interacciones de las variables estudiadas, sobre el porcentaje de rendimiento y sobre la relación atómica Ca/P.

Las variables estudiadas, sus niveles y los resultados obtenidos en cuanto a porcentaje de rendimiento, se presentan en el Cuadro 5.1.

Cuadro 5.1 Diseño estadístico para el porcentaje de rendimiento de la etapa de electrólisis.

		Velocidad de Agitación (rpm)		
		120	220	320
Densidad de Corriente (mA/cm ²)	81	52,54	48,97	39,50
	93	50,04	44,68	40,03
		59,24	51,29	50,66
	103	54,95	54,86	47,98
		61,74	54,69	54,06
		66,75	56,29	54,15

Mediante un análisis del diseño estadístico, cuyos resultados se presentan en el Cuadro B.9; se determina la relación de cuadrados medios, es decir, el estadístico F, para la densidad de corriente, la velocidad de agitación y la interacción.

Cuadro 5.2 Valor del estadístico F de los factores de estudio para el porcentaje de rendimiento de la electrólisis.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F0,05</i>
Densidad de corriente	43,24	2,42E-05	4,26
Velocidad de agitación	28,87	1,21E-04	4,26
Interacción	1,22	3,66E-01	3,63

De acuerdo con los valores del estadístico F, se observa que al nivel 0,05 tanto la densidad de corriente como la velocidad de agitación generan diferencias significativas en la media

de los rendimientos obtenidos en la electrólisis. Asimismo, se observa que no hay diferencias significativas generadas en la media debido a la interacción entre los factores de estudio.

A partir de los resultados presentados en el cuadro del diseño estadístico, se observa que el rendimiento es mayor para cualquiera de las tres densidades de corriente, cuando se trabaja a las velocidades de agitación menores, con diferencias de hasta un 10% en el porcentaje de rendimiento. Estas tendencias se observan con mayor claridad en el gráfico presentado en la Figura 5.5.

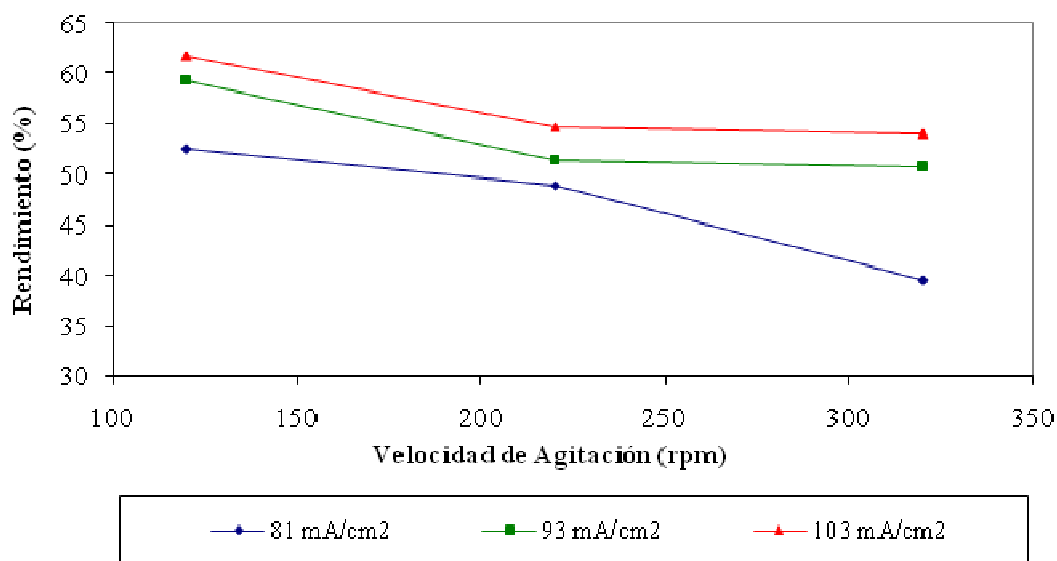


Figura 5.5 Rendimiento de la electrólisis en función de la velocidad de agitación, para cada densidad de corriente.

En los procesos de electrólisis, la difusión y la convección son las formas predominantes de transferencia de masa [Genders y Pletcher, 1990]. En la ecuación de Nernst, se define una capa límite en la superficie del electrodo, en la cual la disolución se considera estancada y la difusión es la única forma de transferencia de masa. En el seno de la disolución, la concentración del reactivo se mantiene en su valor global por convección. La importancia de la capa límite radica en que es ésta la que mantiene el flux de reactivo hacia la superficie

igual al de su condición hidrodinámica. En las electrólisis efectuadas, cuánto menor velocidad de agitación se utilizaba, mayor era el rendimiento obtenido. De manera que si se tienen regímenes de agitación muy altos, el espesor de esta capa se reduce, afectando los patrones de difusión de masa en el proceso.

Por otra parte, el porcentaje de rendimiento aumenta con una tendencia lineal, conforme aumenta la densidad de corriente, como se observa en la Figura 5.6.

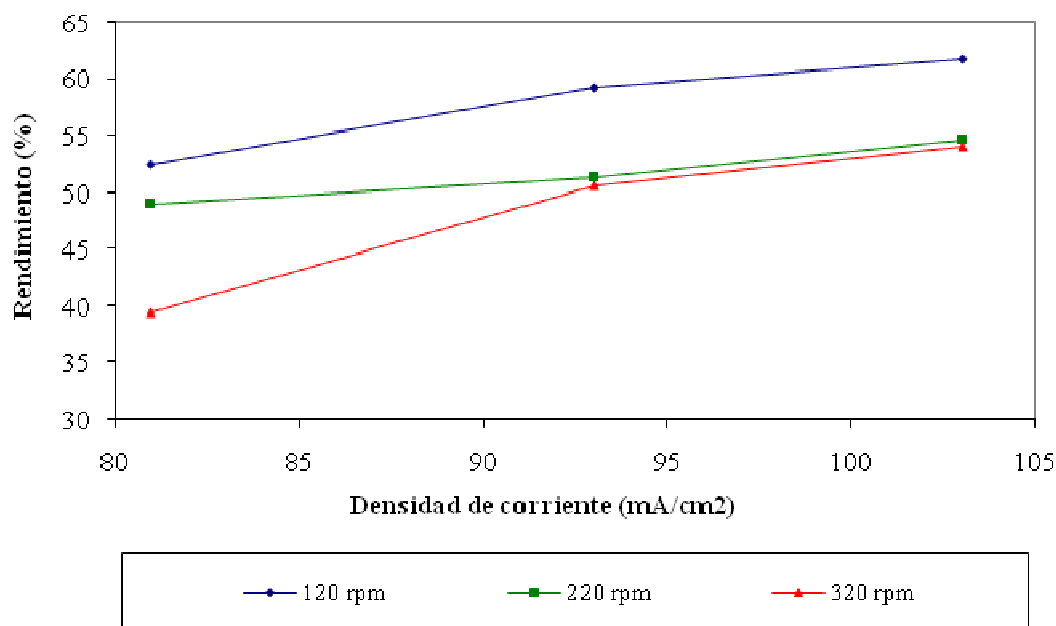


Figura 5.6 Rendimiento de la electrólisis en función de la densidad de corriente, para cada velocidad de agitación.

Debido a que la transferencia de electrones en la electrólisis ocurre como producto de un gradiente de potencial local, las tasas de oxidación y reducción son funciones del potencial aplicado al electrodo. Este potencial se puede expresar en términos de la densidad de corriente, mediante la ecuación de *Butler Volmer*, la cual depende directamente de la densidad de corriente de intercambio, del coeficiente de transferencia y del sobrepotencial aplicado [Genders y Pletcher, 1990]. Por lo anterior, es de esperar que cuanto mayor sea la densidad de corriente, mayor sea el porcentaje de rendimiento. No obstante, con la

variación de la densidad de corriente, se puede propiciar la formación de otras fases que no correspondan a la de interés. De ahí la importancia de incorporar un análisis de la relación atómica Ca/P de los productos, que permita comprobar que se obtiene HAP en las electrólisis realizadas.

Para el análisis de la relación atómica Ca/P, debido a la limitada disponibilidad del equipo, se realiza el análisis EDS solamente para una de las réplicas. Con los resultados de este análisis, los cuales se detallan en el Cuadro A.10, se calcula la relación atómica Ca/P para cada ensayo (Cuadro B.6). Este diseño estadístico se presenta en el Cuadro 5.3.

Cuadro 5.3 Diseño estadístico para la relación Ca/P de la etapa de electrólisis.

		Velocidad de Agitación (rpm)		
		120	220	320
Densidad de	81	1,47	1,59	1,56
Corriente	93	1,57	1,66	1,71
(mA/cm²)	103	1,54	1,59	1,82

Al realizar el análisis estadístico de los datos de relación Ca/P, cuyos resultados se presentan en el Cuadro B.11, se determina el valor el estadístico F para la densidad de corriente y la velocidad de agitación.

Cuadro 5.4 Valor del estadístico F de los factores de estudio para la relación Ca/P de la electrólisis.

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F0,05
Densidad de corriente	2,46	0,20	6,94
Velocidad de agitación	4,54	0,09	6,94

Del Cuadro 5.4 se observa que al nivel 0,05, ninguno de los dos factores de estudio, genera una diferencia significativa en la media de la relación atómica Ca/P del producto de la electrólisis.

No obstante, para dos de las tres densidades de corrientes, se observa que cuanto menor es la velocidad de agitación, menor es la relación atómica Ca/P, y según sea la densidad de corriente utilizada, se puede generar HAP muy deficientes en calcio. De acuerdo con Montero *et al.* (2006), un ámbito deseable para la relación Ca/P puede ubicarse entre 1,55 y 1,70.

En los organismos vivos la HAP no es estequiométrica, por lo general la relación Ca/P es menor a 1,67. Aunque la HAP sea más estable cuando esta relación atómica se acerca a 1,67, también se tiene que entre menor sea esta relación, mayor es la bioactividad.

Se observa claramente en la Figura 5.9, que dentro de los valores obtenidos experimentalmente, para la densidad de corriente intermedia (93 mA/cm^2), se obtienen valores de Ca/P que se ubican dentro del ámbito deseable.

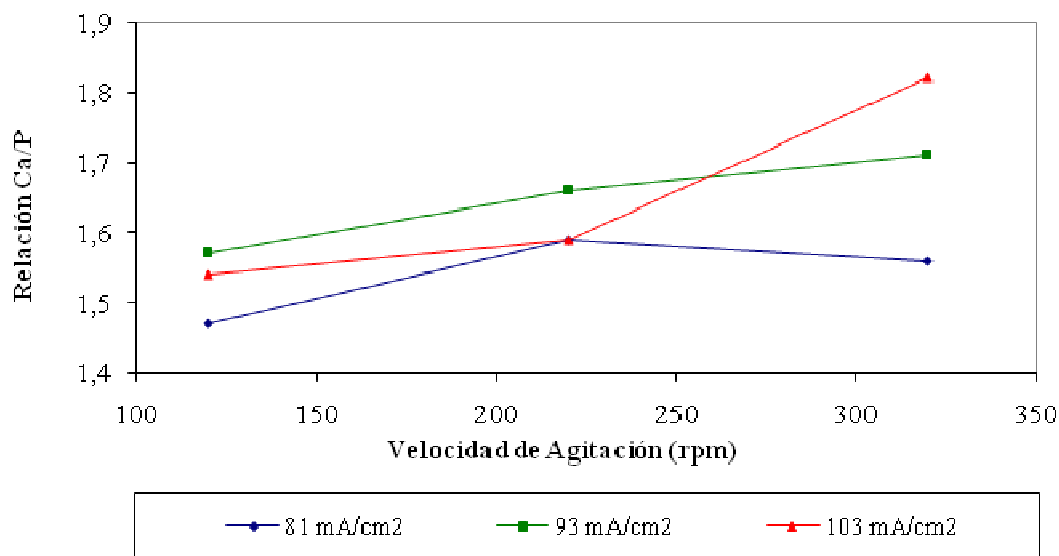


Figura 5.7 Relación atómica Ca/P en función de la velocidad de agitación, para cada densidad de corriente.

En cuanto, a la variación de la relación Ca/P con respecto a la densidad de corriente, no existe una tendencia definida.

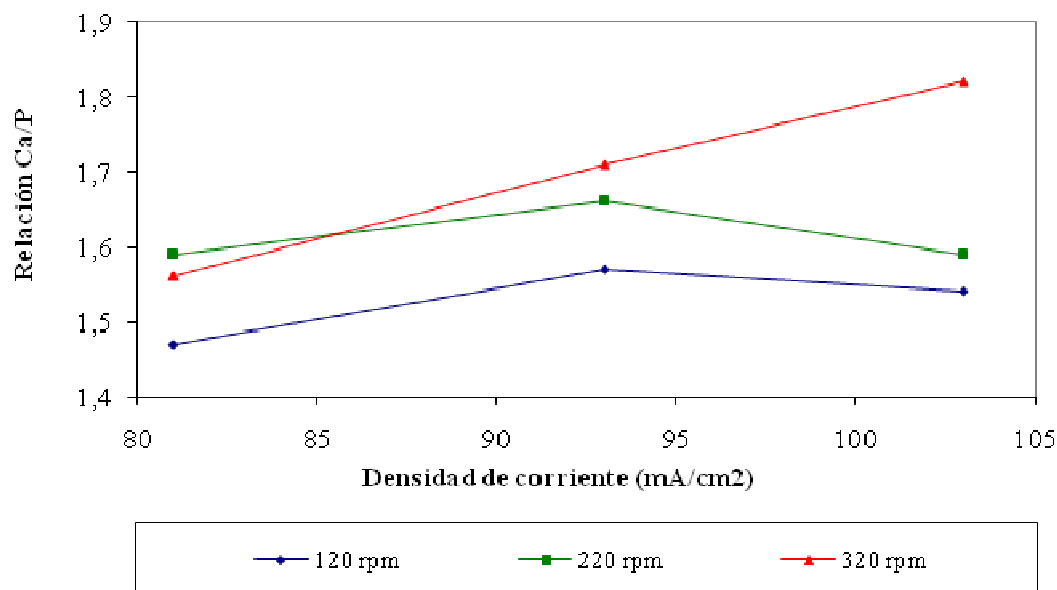


Figura 5.8 Relación atómica Ca/P en función de la densidad de corriente, para cada velocidad de agitación.

Con respecto a la densidad de corriente, este resultado era de esperar, de acuerdo con la ley de Fick, ya que sus niveles se eligieron de manera que se asegurara la formación de HAP, y por lo tanto que se tuvieran valores de Ca/P que estuvieran alrededor de 1,67, utilizando valores de densidad de corriente muy cercanos entre sí.

En cuanto a la velocidad de agitación, no hay prueba de que genere una diferencia significativa sobre la relación Ca/P, pero sí sobre el rendimiento.

Es importante aclarar, que por la forma en que se realiza el análisis EDS, existe una mayor incertidumbre asociada con los valores de la relación Ca/P, debido a la variabilidad que pueda existir entre los granos de una misma muestra. Es por esto, que los resultados de la relación Ca/P se deben utilizar más como un indicador, y no como un factor determinante.

En general, de acuerdo con el diseño estadístico del Cuadro 5.1, el mejor rendimiento se obtiene para la mayor densidad de corriente, 103 mA/cm^2 , y la menor velocidad de agitación, 120 rpm; sin embargo, de acuerdo con el diseño estadístico del Cuadro 5.3, la relación Ca/P más deseable se obtiene para la densidad de corriente intermedia, 93 mA/cm^2 , y la velocidad de agitación intermedia, 220 rpm.

En lo que respecta a la determinación del tiempo de rendimiento máximo, debido a que la cinética de reacción en esta electrólisis es de orden cero, el tiempo de rendimiento dependerá solamente de la densidad de corriente aplicada. No obstante, se realizaron ensayos a diferentes tiempos de electrólisis efectuados a 108 mA/cm^2 y 320 rpm. Para el mayor tiempo que se realizó (ver Cuadros A.7 y B.4), que es de 11 horas, se obtienen 10,71 g de HAP, correspondiente a un 95,7%. Para poder recomendar un tiempo de electrólisis, se debe estudiar la diferencia de costos en cuanto a consumo energético, por ejemplo el tiempo de un rendimiento intermedio con el del tiempo del máximo rendimiento obtenido.

De acuerdo con la hoja técnica de la fuente de poder, el consumo de potencia de éste es de 80 W. Así por ejemplo, la energía eléctrica consumida en 30 días por la fuente de poder operando a 6 horas por día, es de 14,4 kWh; y operando a 12 horas por día, es de 28,8 kWh. De acuerdo con la Compañía Nacional de Fuerza y Luz, el costo del kWh es de 36 colones (tarifa residencial del año 2008 para los primeros 200 kWh), con lo cual el costo mensual de operación es de 518 colones, si el tiempo de electrólisis es de 6 horas diarias; y de 1037 colones, si el tiempo de electrólisis es de 12 horas diarias.

SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL, TRATAMIENTO TÉRMICO DEL HUESO

La evaluación del tratamiento térmico del hueso se plantea como una alternativa para producir HAP a través de un procedimiento que requiera un menor número de pasos, así como un menor número de reactivos o bien, reactivos más baratos, en comparación con la electrólisis y además, para mitigar el impacto ambiental del proceso. Al igual que para la

electrólisis, el detalle de los análisis IR, EDS y SEM para la caracterización del hueso molido de partida se encuentra en los anexos. La relación Ca/P de ésta es de 1,42.

En una calcinación el factor más importante lo constituye la temperatura, y además de ésta, el tiempo puede ser un factor influyente [Martins *et al.* 2006]; por esta razón, éstos constituyen dos de los tres factores de estudio. El tercer factor de estudio, corresponde a uno referente a la etapa de limpieza del hueso, específicamente, la etapa de lavado del hueso con etanol, a través de la cual lo que se busca es eliminar parte de la materia orgánica y con ello disminuir las condiciones de trabajo de los otros factores de estudio. Con respecto al disolvente elegido, es importante destacar que no se eligió uno más afín con la materia orgánica, como por ejemplo hexano, debido a que el objetivo del tratamiento es entre otras cosas, obtener un producto que pueda tener alguna aplicación biomédica, y por lo tanto, se procura evitar el uso de reactivos con alta toxicidad.

A diferencia de la electrólisis, el tratamiento térmico de la HAP, es una etapa con pocos precedentes experimentales, por lo que el objetivo de la investigación en esta etapa es el de determinar algunas tendencias. Para esto se realiza un análisis por medio de un diseño estadístico tipo cuadrado latino con 3 niveles por factor (3x3).

A partir de los resultados del análisis EDS, los cuales se detallan en el Cuadro A.14, y por medio de los cuales se calculan los valores de la relación atómica Ca/P presentados en el Cuadro B.13. El diseño estadístico para la relación Ca/P se presenta en el Cuadro 5.5, en el cual los porcentajes que se encuentran a la izquierda de cada valor corresponden a la concentración del etanol utilizada durante el lavado para ese ensayo. El análisis estadístico se presenta en el Cuadro 5.6 (los resultados se encuentran en el Cuadro B.16).

Cuadro 5.5 Diseño estadístico para la relación Ca/P en la etapa de tratamiento térmico.

		Tiempo (horas)					
		2		3		4	
Temperatura (°C)	625	0%	1,41	50%	1,45	95%	1,81
	725	95%	1,47	0%	1,55	50%	1,36
	825	50%	1,41	95%	1,46	0%	1,47

Cuadro 5.6 Valor del estadístico F de los factores de estudio para la relación Ca/P de la etapa de tratamiento térmico.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F0,05</i>	<i>Valor crítico para F0,01</i>
Temperatura	0,42	19	99
Tiempo	0,40	19	99
Concentración de etanol	0,89	19	99

Para todos los factores, de acuerdo con el estadístico F crítico, se observa que no hay prueba de una diferencia significativa en la media de la relación Ca/P obtenida mediante tratamiento térmico.

Adicionalmente, debido a que la etapa de lavado con etanol, se incluye más bien, con el objetivo de disminuir la cantidad de materia orgánica en el hueso de partida para el tratamiento térmico, se analiza el porcentaje de materia orgánica removida al final de cada ensayo de tratamiento térmico.

Cuadro 5.7 Diseño estadístico para el porcentaje de materia orgánica removida en la etapa de tratamiento térmico.

		Tiempo (horas)					
		2		3		4	
Temperatura (°C)	625	0%	28,25	50%	27,51	95%	28,52
	725	95%	27,36	0%	28,03	50%	26,60
	825	50%	27,61	95%	27,68	0%	28,10

Mediante el análisis estadístico, cuyos resultados se presentan en el Cuadro B.15, se calcula el valor de F para la temperatura, el tiempo y la concentración de etanol.

Cuadro 5.8 Valor del estadístico F de los factores de estudio para el porcentaje de materia orgánica removida de la etapa de tratamiento térmico.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F0,05</i>	<i>Valor crítico para F0,01</i>
Temperatura	1,32	19	99
Tiempo	3,92	19	99
Concentración de etanol	19,12	19	99

Como se observa en el Cuadro 5.8, en cuanto al porcentaje de materia orgánica removida, se evidencia la existencia de una tendencia con respecto al factor concentración de etanol, y en este sentido, los porcentajes de remoción más altos ocurren en los ensayos en que la concentración de etanol está al 0%, es decir que se utiliza sólo agua, para realizar los lavados. En lo que respecta a la temperatura y el tiempo de tratamiento, no hay evidencia de tendencias sobre esta variable de respuesta.

No obstante, es de suma importancia realizar también un análisis cualitativo de los productos obtenidos durante esta etapa, debido a que los efectos de un tratamiento térmico ocurren principalmente sobre las propiedades cualitativas de la muestra, como lo es por ejemplo la morfología.

En la Figura 5.9(a), la cual corresponde a la calcinación a 625°C, se observan granos bien definidos y separados. Conforme aumenta la temperatura, empieza a ocurrir la interdifusión atómica, lo cual se observa claramente comparando la Figura 5.9(b), correspondiente a la calcinación a 725°C, con la 5.9(a). A 725°C, se observa cómo los granos han empezado a aglomerarse y posteriormente a los 825°C, Figura 5.9(c), se tiene una mayor aglomeración.

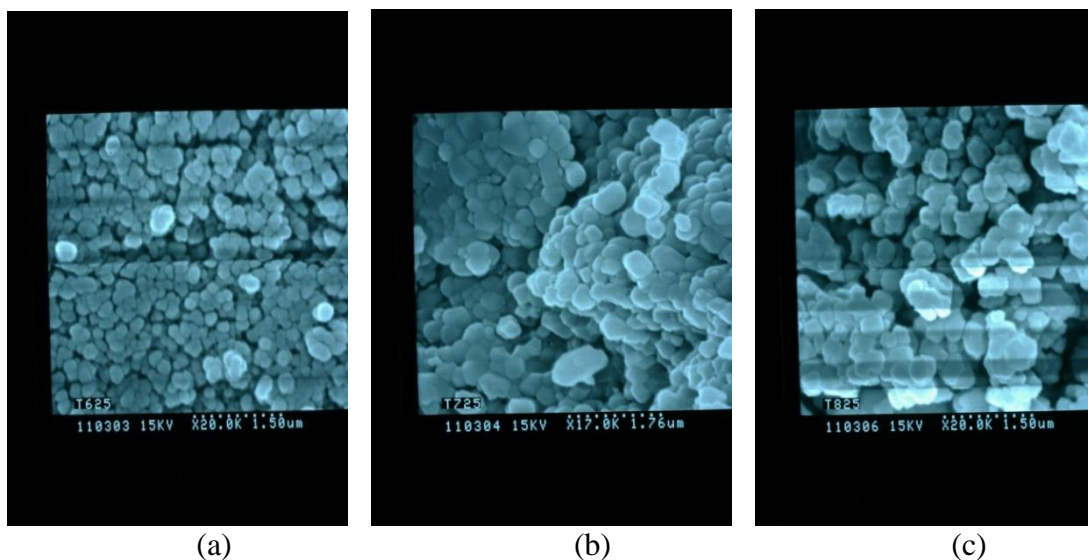


Figura 5.9 Fotografía SEM de (a)hueso calcinado a 625°C, durante 2 horas, lavado con agua; (b) hueso calcinado a 725°C, durante 2 horas, lavado con etanol al 95%; y (c) hueso calcinado a 825°C durante 2 horas, lavado con etanol al 50%.

Mediante una fotografía SEM panorámica de las muestras, se puede observar el tamaño promedio de partícula.

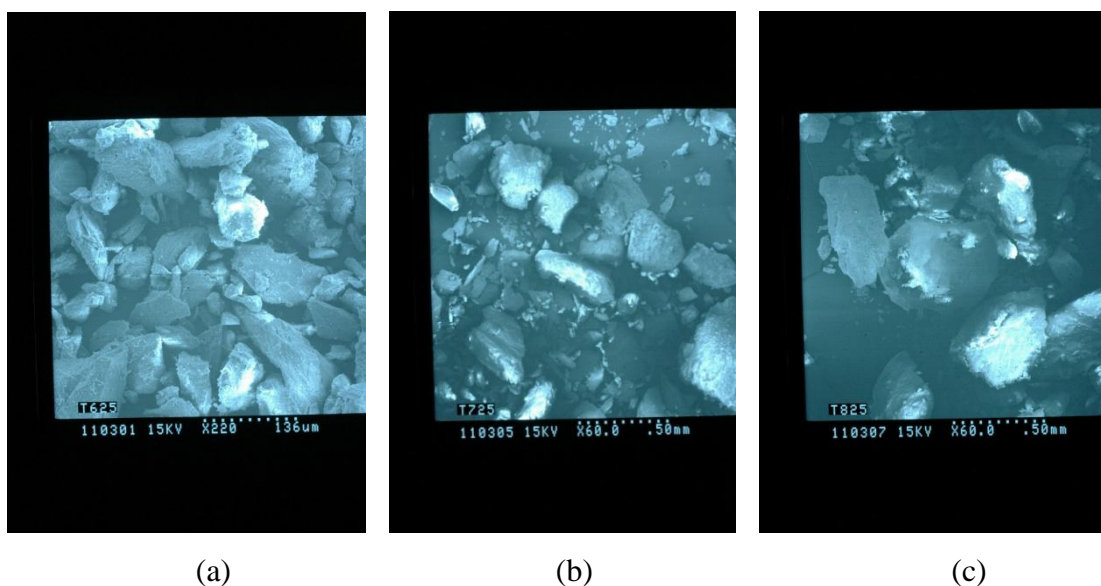


Figura 5.10 Fotografía SEM panorámica de (a)hueso calcinado a 625°C, durante 2 horas, lavado con agua; (b) hueso calcinado a 725°C, durante 2 horas, lavado con etanol al 95%; y (c) hueso calcinado a 825°C durante 2 horas, lavado con etanol al 50%.

En la figura anterior se observa cómo existen diferentes tamaños de partícula que varían entre aproximadamente 15 μm , hasta 50 μm , esto porque se parte de una mezcla de huesos de distintas mallas (No.40, 50, 60 y 80). Se observa también que no existe variación considerable en el tamaño de partícula para las diferentes temperaturas de tratamiento.

Para analizar con mayor profundidad el efecto de la etapa de lavado en cuanto a la concentración de etanol, se obtienen también fotografías mediante análisis SEM, para los casos extremos, es decir, lavado con etanol al 0% (agua) y lavado con etanol al 95%.

Se observa en la Figura 5.11, cómo en cuanto a morfología, no existe mucha diferencia entre el lavado con el disolvente a su máxima concentración, y el lavado con agua solamente. De manera que, de acuerdo con la relación Ca/P y la morfología, no hay mayores diferencias entre el uso de agua o el uso de etanol para realizar los lavados.

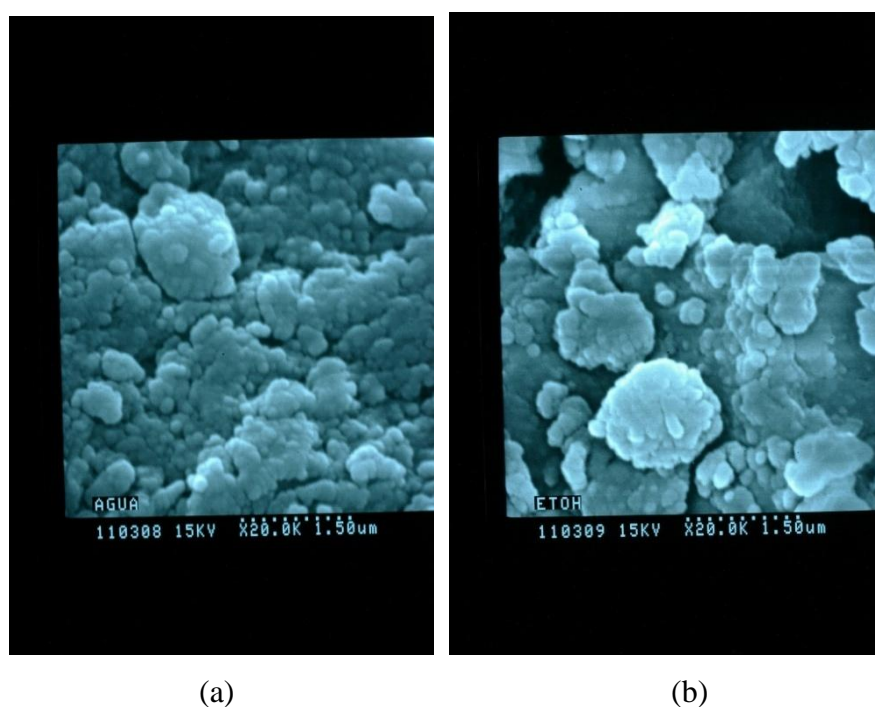


Figura 5.11 Fotografía SEM de (a) hueso luego del lavado con agua, (b) hueso luego del lavado con etanol al 95%.

De acuerdo con los valores promedios para cada concentración de etanol (ver Cuadro B.14), en los ensayos en que se realizó el lavado con agua, se genera una mayor remoción de materia orgánica, y como ya se observó, en las otras variables de respuesta, no hay diferencia entre utilizar agua o etanol muy concentrado.

En cuanto a la superficie de los productos obtenidos, existen ligeras variaciones tanto entre temperaturas como entre tiempos de tratamiento. En el caso del producto de calcinación a 625°C, 2 horas y lavado con agua, se observa la permanencia de carbono sobre ella, ya que éste presenta un color grisáceo. Esta tonalidad se va perdiendo conforme aumenta el tiempo de calcinación para esta misma temperatura; sin embargo, aún para el tiempo de 4 horas, el producto presenta algunos granos grisáceos. Esto indica que todavía quedan restos de materia orgánica en el producto, y por tanto que el tratamiento a esta temperatura no es satisfactorio. Los productos obtenidos para las otras dos temperaturas, presentan una superficie blanca, sin presencia aparente de materia orgánica, y aunque todos los productos a 725°C y 825°C son blancos, la blancura es ligeramente mayor conforme aumenta el tiempo de calcinación.

COMPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS CON LAS NORMAS FDA Y ALGUNAS MARCAS COMERCIALES

Entre las aplicaciones más importantes de la HAP en Costa Rica, está el uso para productos de implante dental, el uso para productos de rellenos óseos y el uso para productos de implante subdérmico en personas que sufren de lipoatrofia facial.

En las normas FDA, estos productos se encuentran dentro de la clasificación *Clase II*, para el cual se tiene un documento de guía denominado *Class II Special Controls Guidance Document*. Para el caso de implantes dentales la guía se encuentran bajo el nombre de “*Dental Bone Grafting Material Devices*”, y para el caso de rellenos óseos, se encuentra bajo el nombre de “*Resorbable Calcium Salt Bone Void Filler Device*”.

En las guías proporcionadas por la FDA para este tipo de productos, en lo que respecta a la caracterización del producto, hacen referencia a las normas ASTM F1185-88, ASTM F1581-99, y ASTM F1088.

De acuerdo con estas normas, se debe utilizar un método adecuado de análisis elemental para determinar que los valores de calcio y fósforo son consistentes de acuerdo con el valor estequiométrico. En este caso se utilizó el análisis EDS.

En el caso de HAP obtenida de fuentes naturales como en este caso, se debe determinar trazas de arsénico, cadmio, mercurio, y plomo, cuyas concentraciones no deben superar los 3, 5, 5 y 30 ppm respectivamente. Asimismo, el valor máximo permitido de metales pesados es de 50 ppm.

Se realizó un análisis químico de una de las muestras de hidroxiapatita obtenidas mediante electrólisis, de acuerdo con los métodos del *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (20th ed. 1998.APHA-AWWA-WEF)*, cuyos resultados se presentan a continuación junto con los valores de la Norma ASTM.

Cuadro 5.9 Resultados de análisis de trazas de metales y valores permitidos por la ASTM

Elemento	Muestra No.13 Electrólisis	Máximo permitido según Norma ASTM
Calcio (mg/L)	(5,32 ±0,25)	-
Cadmio (mg/L)	< 0,03	5
Plomo (mg/L)	< 0,14	30
Sodio (g/L)	--	-
Fósforo (mg/L)	(7,33 ± 0,80)	-
Arsénico (mg/L)	< 5	3

Como se observa en el cuadro, la hidroxiapatita obtenida mediante electrólisis cumple con valores máximos permitidos por la norma ASTM.

Adicionalmente, al tratarse de HAP extraída de hueso bovino, debe cumplir con las especificaciones del FDA dentro de su guía denominada “*Medical Devices Containing Materials Derived from Animal Sources*”. En esta guía, en lo que respecta a aquellos materiales de origen bovino a utilizar en dispositivos médicos, lo fundamental es asegurar que el material no provenga de ganado de algún país donde ha sido diagnosticado el BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), que es una enfermedad degenerativa que afecta el sistema nervioso central del ganado.

La lista de países donde el BSE ha sido diagnosticado es mantenida por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, y codificada en la norma en 9CFR 94.18. Los países hasta ahora identificados, incluyen todos los países europeos, no así, a Costa Rica, por lo que en este sentido, de acuerdo con las normas, la fuente bovina utilizada en esta investigación es apta para ser utilizada en dispositivos médicos.

Al valorar la posibilidad de fabricación de un dispositivo de aplicación biomédica a través de las metodologías de electrólisis y tratamiento térmico de hueso bovino, los productos obtenidos en esta investigación, se encuentran en una etapa intermedia del proceso productivo y por ello, la comparación de sus características con las de algunas marcas comerciales, se utiliza solamente como una referencia inicial.

Con respecto a las características de algunas de las marcas comerciales de productos hechos a base de HAP, a continuación se presenta un cuadro resumen, en el que se presenta además las características de uno de los productos de tratamiento térmico y uno de los productos de electrólisis.

Cuadro 5.10 Comparación entre las características de algunas marcas comerciales y de los productos obtenidos por electrólisis y por tratamiento térmico

Producto	Tipo producto	Tamaño Cristal	Composición	Porosidad	Tamaño poro
4BONE®	Inyectable sustituto del hueso	<1 μm	Relación HAP/ β -Fosfato Tricálcico, 60:40	70%	Macroporosidad: 300-600 μm , Microporosidad: <10 μm
BIO-OSS®	Inyectable sustituto del hueso	Gránulos pequeños: 0.25-1mm, Gránulos largos: 1-2mm	Parte mineral de hueso bovino	Idéntica a la del tejido óseo natural	-
KASIOS®	Inyectable sustituto del hueso	-	Contiene fosfato tricálcico, fosfato dicálcico dihidratado y zirconia	40%	<5 μm
RADIESSE®	Inyectable para aumentar y mejorar el tejido blando	25 a 45 μm	HAP suspendida en gel de carboximetilcelulosa de sodio, glicerina y agua	-	-
HAP obtenida mediante electrólisis	-	-	Relación Ca/P de entre 1,5 y 1,8	-	-
HAP obtenida mediante tratamiento térmico	-	<0.5 mm	Relación Ca/P de entre 1,4 y 1,8	-	<2 μm

En el cuadro anterior se observa que la HAP obtenida en la investigación tanto mediante electrólisis como mediante tratamiento térmico, posee características similares a las de las marcas comerciales investigadas, en cuanto al tamaño de partícula y composición.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el proceso de preparación de las disoluciones de EDTA-Hueso, se evidencia la presencia de materia orgánica en los huesos utilizados como materia prima, y con ello, la necesidad de realizar evaluaciones más profundas, en las que se analicen otras opciones por ejemplo, de reactivo y concentración, debido lo agresivo que es el tratamiento con NaOH a las condiciones trabajadas . No obstante, en cuanto a esta etapa se tienen algunas conclusiones importantes. Se obtienen mejores resultados si se utiliza solamente las extremidades del animal, puesto que además de ser una de las partes más ricas en calcio, son más fáciles de manejar. Además, es recomendable colocar los huesos en agua hirviendo durante unas horas, antes de realizar el quebrado, así como también, realizar la molienda de éstos antes de tratarlos con el reactivo de limpieza, para que éste pueda penetrar con mayor facilidad en ellos.

En cuanto a la etapa de electrólisis, se concluye que efectivamente se logra la extracción de HAP, a través de la electrólisis de una disolución de EDTA-Hueso. Asimismo, para el sistema de reacción utilizado en esta etapa, se puede concluir que tanto para la densidad de corriente como para la velocidad de agitación, así como sus condiciones, las cuales se detallan en los Cuadro 5.1 y 5.3, hay evidencia de una diferencia significativa en cuanto a rendimiento; pero no hay evidencia de una diferencia significativa en cuanto a la relación atómica Ca/P. Se obtiene mayor rendimiento al trabajar con una mayor densidad de corriente y menor velocidad de agitación; a partir de este resultado, se concluye que la transferencia de masa ocurre en la superficie del electrodo, y el proceso de difusión es determinante.

Del análisis de consumo energético se observa que la diferencia de costo en cuanto a consumo de la fuente de poder entre un tiempo de 6 horas y uno de 12 horas, no es significativa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, y dado que la relación Ca/P se utiliza sobre todo como un indicador, se recomienda para el sistema de reacción utilizado, trabajar al nivel mayor de densidad de corriente (103 mA/cm^2), y al nivel menor de velocidad de agitación (120 rpm), con un pH inicial alrededor de 7 y durante aproximadamente 11 horas.

En cuanto a la etapa de tratamiento térmico, para tomar mejores decisiones lo ideal sería complementar las observaciones con un análisis TGA, para así tener un respaldo medible en cuánto a presencia de materia orgánica remanente en la superficie de los productos, sin embargo, este análisis no pudo realizarse debido a que no había disponibilidad del equipo.

El análisis TGA permitiría la identificación de otras fases presentes en el producto. En el caso del tratamiento térmico debido a los bajos valores de la relación atómica Ca/P obtenidos, se puede sospechar de la presencia de fosfato tricálcico (TCP), otra fase mineral presente en el hueso, ya que la relación Ca/P típica para los TCP es de 1,5, y por lo general, éstos se obtienen mediante tratamiento térmico.

De los análisis estadísticos del tratamiento térmico del hueso, se concluye para la temperatura, el tiempo y la concentración de etanol, así como sus condiciones, las cuales se detallan en los Cuadros 5.5 y 5.7, que no hay tendencias en cuanto a la relación atómica Ca/P. En lo que respecta al porcentaje de materia orgánica removida, no hay prueba de que hayan tendencias debidas a los factores temperatura y tiempo, pero sí la hay, debida a la concentración de etanol en el lavado del hueso. Con respecto al factor concentración de etanol, los mayores porcentajes de remoción de materia orgánica se obtuvieron al utilizar etanol al 0%, es decir agua, como disolvente de lavado.

De acuerdo con los resultados obtenidos para el tratamiento térmico, se recomienda trabajar a 725°C , durante 2 horas, utilizando agua para el lavado del hueso.

La HAP obtenida a partir de las dos metodologías estudiadas en esta investigación, a pesar de no encontrarse en su condición de producto terminado, cumple con las especificaciones de las normas FDA en lo que respecta a la composición en productos de implantes dentales

y rellenos óseos. Asimismo, la HAP obtenida por ambas metodologías presenta características similares a las de algunas marcas comerciales de sustitutos de hueso producidos a base de HAP. Por lo tanto, se recomienda valorar el estudio de las etapas posteriores que permitan obtener un producto que pueda comercializarse como sustituto del hueso.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

Abraham, G.A; Cuadrado, T.R (2004). *Métodos de Caracterización de Biomateriales*. Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales, Argentina. Tomado de la página web <http://www3.fi.mdp.edu.ar/biomat/Caracterizacion%20Biomateriales.pdf>, consultada el 10/04/07.

Banerjee, A.; Bandyopadhyay, A.; Bosc, S (2006). *Hydroxyapatite nanopowders: síntesis, densificación and cell materials interaction*. W.M.Keck Biomedical Materials Research Laboratory, School of Mechanical and Materials Engineering, Washington State University, United States. Artículo tomado de Science Direct, consultado el 08/03/07.

De La Calle, F.; Echavarría, A.; Londoño, M (2006). *Características cristaloquímicas de la Hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas*. Artículo de la Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 5 p.109-118. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín; Colombia.. Artículo tomado de la página web: <http://revista.eia.edu.co/articulos5/art95.pdf>, consultada el 05/02/07.

Genders, J.D; Pletcher, D (1990). *ELECTROSYNTHESIS: from laboratory, to pilot, to production*. The Electrosynthesis Company Inc. New York, USA.

Joseph, R.; Tanner, K.E (2004). *Effect of Morphological features and Surface Area of Hydroxyapatite on the Fatigue Behavior of Hydroxyapatite-Polyethylene Composites*. IRC in Biomedical Materials, Queen Mary University of London, United Kingdom. Artículo tomado del ACS, consultado el 08/03/07.

Kankan, S.; Lemos, A.F.; Ferreira, J.M.F (2005). *Synthesis and Mechanical Performance of Biological-like Hydroxyapatites*. Department of Ceramics and Glass Engineering, University of Aveiro, CICECO; 3810-193, Portugal. Artículo tomado del ACS, consultado el 08/03/07.

Koutsopoulos, S (2001). *Kinetic Study on the Crystal Growth of Hydroxyapatite*. Department of Chemistry, University of Patras. Greece. Artículo tomado del ACS, consultado el 08/03/07.

Kothapalli, C.; Wei, M.; Vasiliev, A.; Shaw, M.T (2004). *Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hidroxyapatite*. Department of Metallurgy and Materials Engineering, Institute of Materials Science. University of Connecticut, United States. Artículo tomado de Science Direct, consultado el 08/03/07.

Mafé, S.; Manzanares, J.A, Reiss, H.; Thomaun, J.M.; Gramain, P (1991). *Model for the dissolution of Calcium Hydroxyapatite Powder*. Department of Chemistry, University of California, Los Angeles, United States. Artículo tomado del ACS, consultado el 08/03/07.

Martins, M.; García, R.; Derenzo, S.; Giuliatti, M.; Rodríguez, R (1996). *Técnicas de obtención de hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio*. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidad Armando Salles Oliveira, Sao Paulo, SP, Brasil. Artículo tomado de la página http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/estadosolido/QES/laboratorios/web_labques_ha/documents/T%C9CNICAS%20DE%20OBTENCI%D3N%20DE%20HIDROXIAPATITA%20Y%20TROS%20FOSFATOS%20DE%20CALCIO.pdf, consultada el 07/05/07.

Mirífico, M.V (2005). *Electroquímica y química verde*. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Mobasherpour,I.; Soulati Heshajin, M.; Kazemzadch,A.; Zakeri, M (2006). *Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method*. Ceramics Department, Materials and Energy Research Center, Tehran, Iran. Artículo tomado de Science Direct, consultado el 08/03/07.

Montalbert-Smith, R (2008). *Estudio y síntesis de fosfatos y óxidos por métodos electrolíticos: Nueva metodología en la generación de materiales nanoestructurados*. Tesis de maestría por presentarse. Escuela de Química, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Montero, M.L; Sáenz, A; Rodríguez, J.G; Arenas, J.; Castaño, V.M (2006). *Electrochemical synthesis of nanosized hydroxyapatite*. Escuela de Química, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Moustafa, N (2004). *Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes*. Chemistry Department, Faculty of Science, Suez Canal University, Ismailia 41522, Egypt. Artículo tomado de Science Direct, consultado el 08/03/07.

Onuma, K.; Ito, Atsuo (1998). *Cluster Growth Model for Hydroxyapatite*. National Institute for Advanced Interdisciplinary Research and National Institute of Materials and Chemical Research, 1-1-4 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan. Artículo tomado del ACS, consultado el 08/03/07.

Pizá G (2001). *Clavos de fijación externa recubiertos de hidroxiapatita. Estudio Clínico en alargamientos de extremidades*. Universidad Autónoma de Barcelona. Tomado de la página web http://www.tesisenred.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1030103-174623//gpv1de3.pdf (consultada el 21/05/07)

Quintana, J (1998). *“Utilización de la hidroxiapatita en cirugía maxilofacial”*. Artículo de la Revista Cubana Estomatol; 35(1):16-20. Artículo tomado de la página web

http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75071998000100003&script=sci_arttext, consultada el 05/02/07.

Rhee, S.H (2000). *Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment*. Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, South Korea. Artículo tomado de Science Direct, consultado el 08/03/07.

Sáenz, A.; Rivera, E.; Brostow, W.; Castaño V.M (2006). *Ceramic Biomaterials: an introductory overview*. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Schnettler, R.; Alt, V.; Dingeldein, E.; Pfefferle, H.J.; kilian, O.; Meyer, C.; Heiss, C.; Wenisch, S (2003). *Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants*. Department of Trauma Surgery, University Giessen, Germany. Artículo tomado de Science Direct, consultado el 08/03/07.

Soto, A (2003). *Introducción a los Biominerales y Biomateriales*. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. Artículo tomado de la página web: <http://cabierta.uchile.cl/revista/22/articulos/pdf/edu1.pdf>, consultado el 05/02/07.

Wendt, H. *et al.* (2003). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (en línea)*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Germany. Consultada el 09/10/07.

Internet:

Sitio web de TEKNIMED

<http://www.teknimed.com/es/pageLibre0001066c.htm> (Consultada el 10/03/07)

http://www.idegis.org/Electrosintesis_front.htm. (Consultada el 05/06/07)

CAPÍTULO 8

NOMENCLATURA

AES	Espectroscopia Electrónica Auger
AFM	Microscopio de Fuerza Atómica
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATD	Análisis Térmico Diferencial
ATR-FTIR	Reflectancia Total Interna Atenuada
D	Coefficiente de difusión
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
<i>E</i>	Potencial
EDS	Espectroscopia de Energía Dispersiva
ESCA	Espectroscopia Electrónica para Análisis Químico
F	Estadístico F
FDA	Food and Drug Association
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
GC	Cromatografía Gaseosa
GPC	Cromatografía de Permeación de Geles
Gr	Número de Grashof
HAP	Hidroxiapatita
HPLC	Cromatografía líquida de alta prestación
<i>I</i>	Densidad de corriente
ISO	Internatonal Organization for Standardization
LVSEM	Microscopio de Bajo Voltaje
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
O	Especie oxidada
R	Especie reducida
Re	Número de Reynolds
S,	Suma de cuadrados
Sc	Número de Schmidt
SEC	Cromatografía por Exclusión de Tamaños
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
Sh	Número de Sherwood
SIMS	Espectrometría de Masas de Iones Secundarios
SPM	Microscopía de Sonda de Barrido
SPR	Resonancia de Plasmón
STM	Microscopio de Efecto Túnel
TD	Termodilatometría
TLC	Cromatografía en Capa Fina
XPS	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X
XRD	Difracción de Rayos X

c	Concentración
d	Distancia entre electrodos
j	Número de réplicas
k	Constante de reacción
k	Número de columnas
n	Número de filas
s	Varianza ó cuadrado medio
y	Variable aleatoria
\bar{y}	Valor promedio de la variable
ν	Grados de libertad
η	Sobrepotencial
u	Velocidad de flujo linear
ν	Viscosidad cinemática
δ	Espesor equivalente de la capa limitante

Subíndices

c	se refiere a las columnas
e	se refiere a equilibrio
f	se refiere a las filas
g	se refiere al tratamiento <i>g-ésimo</i>
i	se refiere a la fila <i>i-ésima</i>
i	se refiere a la interacción fila-columna
ox	se refiere a oxidación
red	se refiere a reducción
s	se refiere a subtotal
t	se refiere a la columna <i>t-ésima</i> ó a los tratamientos.
u	se refiere a la réplica <i>u-ésima</i>
M	se refiere a media
O	se refiere a intercambio
R	se refiere al error residual

APENDICE A
DATOS EXPERIMENTALES

Cuadro A.1 Preparación de las disoluciones de NaOH empleadas en la etapa de limpieza del hueso.

Disolución	Volumen de Agua (mL)	Masa de NaOH (g)	Concentración (g/mL)
A	4000	120	0,03
B	4000	400	0,1
C	1500	6	0,004

Cuadro A.2 Masa retenida en el tamizado de los huesos limpios.

Lote	Masa retenida en cada malla						Fondos (g)
	No.25 (g)	No.30 (g)	No.40 (g)	No.50 (g)	No.60 (g)	No.80 (g)	
1	15,60	-	32,80	77,20	20,50	51,50	36,20
2	23,68	6,33	9,11	9,91	4,48	6,73	18,06

Cuadro A.3 Determinación de la densidad del hueso.

Hueso	Masa (g)	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)	Volumen (mL)
1	9,627	70	75	5
2	7,917	70	74	4
3	6,107	40	43	3
4	11,804	33	39	6
5	5,489	26	29	3

Cuadro A.4 Preparación de las disoluciones de EDTA-Hueso utilizadas en la electrólisis.

Disolución	Masa de EDTA (g)	Masa de Hueso (g)	Volumen Disolución (mL)	Masa de NaOH (g)
1	36,55	12,55	500	10,50
2	73,10	25,15	1000	23,08
3	146,12	50,22	2000	40,21
4	73,12	25,11	1000	20,42
5	146,10	50,19	2000	41,40
6	146,12	50,11	2000	40,78
7	73,13	25,12	1000	20,48
8	146,13	50,19	2000	41,60
9	73,12	25,10	1000	22,40
10	43,97	14,88	600	14,67

Cuadro A.5 Determinación del porcentaje de humedad en el hueso limpio.

Muestra	Masa beaker (g)	Masa beaker+hueso Antes de Desecar (g)	Masa hueso (g)	Masa beaker+hueso Después de Desecar (g)	Masa Humedad (g)
1	31,8052	33,815	2,0098	33,7412	0,0738
2	28,3688	30,372	2,0032	30,2926	0,0794
3	27,8411	29,8475	2,0064	29,7709	0,0766

Cuadro A.6 Determinación del porcentaje de materia orgánica en el hueso limpio.

Muestra	Masa crisol (g)	Masa crisol+hueso Antes de Calcinar (g)	Masa hueso (g)	Masa crisol+hueso Después de calcinar (g)	Diferencia de masa (g)
1	10,6619	12,6097	1,9478	12,3995	0,2102
2	10,4586	12,3937	1,9351	12,1918	0,2019
3	11,4647	13,4038	1,9391	13,2065	0,1973

Cuadro A.7 Resultados obtenidos en la determinación del tiempo de rendimiento máximo de electrólisis efectuadas a 108 mA/cm² y 320 rpm.

Tiempo (h)	pH inicial	pH final	Temp. inicial (°C)	Temp. final (°C)	Masa beaker (g)	Masa beaker+producto (g)	Masa producto (g)
3	7,18	6,97	18,80	23,50	71,21	74,37	3,16
5	7,21	8,07	18,80	24,60	71,04	75,91	4,87
6	7,20	7,10	19,00	25,20	104,01	111,23	7,22
7	7,25	7,22	19,00	26,30	103,99	111,34	7,35
9	7,23	7,74	20,00	23,60	103,99	113,08	9,09
11	7,29	8,39	19,70	24,30	70,18	80,89	10,71

Cuadro A.8 Orden de las corridas determinadas al azar para la electrólisis.

Corrida	Corriente (A)	Velocidad Agitación (rpm)	Orden de Ensayo al azar
1	3,2	120	9
2	3,2	120	5
3	3,2	220	3
4	3,2	220	17
5	3,2	320	2
6	3,2	320	4
7	3,7	120	12
8	3,7	120	18
9	3,7	220	1
10	3,7	220	13
11	3,7	320	16
12	3,7	320	10
13	4,1	120	7
14	4,1	120	11
15	4,1	220	8
16	4,1	220	15
17	4,1	320	6
18	4,1	320	14

Cuadro A.9 Resultados obtenidos en la etapa de electrólisis.

Corrida	pH inicial	pH final	Temp. inicial (°C)	Temp. final (°C)	Masa beaker (g)	Masa beaker+producto (g)	Masa producto (g)
1	7,26	7,63	18,20	22,30	101,25	107,13	5,88
2	7,25	7,65	20,30	22,20	101,25	106,85	5,60
3	7,27	8,33	19,80	21,40	101,25	106,73	5,48
4	7,27	8,29	18,70	21,10	101,25	106,25	5,00
5	7,26	7,44	18,30	7,44	101,25	105,67	4,42
6	7,27	7,53	19,30	24,00	101,25	105,73	4,48
7	7,26	8,51	19,70	21,90	101,25	107,88	6,63
8	7,26	8,57	19,30	22,00	121,82	127,97	6,15
9	7,26	7,46	19,00	25,30	101,25	106,99	5,74
10	7,26	8,29	17,10	20,80	101,25	107,39	6,14
11	7,26	8,34	18,70	21,80	101,25	106,92	5,67
12	7,25	7,50	19,20	22,10	101,25	106,62	5,37
13	7,22	7,78	17,40	24,50	101,25	108,16	6,91
14	7,25	8,69	20,70	25,20	101,25	108,72	7,47
15	7,27	7,49	19,20	24,20	101,25	107,37	6,12
16	7,27	8,29	20,50	22,80	101,25	107,55	6,30
17	7,27	7,51	17,60	24,40	121,82	127,87	6,05
18	7,27	8,33	19,10	22,30	101,25	107,31	6,06

Cuadro A.10 Resultados obtenidos mediante microanálisis EDS para una de las réplicas en la etapa de electrólisis.

Corrida	Corriente (A)	Veloc. agitación (rpm)	Carbón (%)	Oxígeno (%)	Peso atómico		
					Sodio (%)	Fosforo (%)	Calcio (%)
1	3,2	120	10,66	61,84	3,31	9,79	14,41
4	3,2	220	10,31	61,82	2,58	9,75	15,54
5	3,2	320	12,72	62,55	1,97	8,91	13,86
8	3,7	120	10,53	61,66	3,19	9,58	15,04
9	3,7	220	9,68	61,6	2,53	9,86	16,33
12	3,7	320	10,69	61,78	2,26	9,33	15,94
13	4,1	120	10,02	61,79	2,83	9,97	15,39
15	4,1	220	11,09	62,01	2,76	9,44	14,97
18	4,1	320	9,54	61,4	2,11	9,55	17,4

Cuadro A.11 Dimensiones del electrodo utilizado para efectuar la electrolisis.

Dimensión	Medida (cm)
Diámetro del alambre	0,105
Diámetro del electrodo	3,470
Altura del electrodo	4,990
Largo del alambre sujetador	12,570

Cuadro A.12 Orden de las corridas determinadas al azar para el tratamiento térmico.

Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Concentración de Etanol (%)	Orden de Ensayo Azar
1	625	2	0	8
2	625	3	50	3
3	625	4	95	7
4	725	2	95	2
5	725	3	0	5
6	725	4	50	6
7	825	2	50	4
8	825	3	95	1
9	825	4	0	9

Cuadro A.13 Resultados obtenidos en la etapa de tratamiento térmico del hueso.

Corrida	Masa Crisol (g)	Masa crisol + hueso		Masa hueso Inicial	Diferencia de masa (g)
		Antes (g)	Después (g)		
1	10,4337	12,1620	11,6600	1,7283	0,5020
2	10,4302	12,1067	11,6741	1,6765	0,4326
3	11,4465	13,1165	12,6543	1,6700	0,4622
4	10,4362	12,3064	11,7694	1,8702	0,5370
5	11,4450	13,3168	12,7860	1,8718	0,5308

Cuadro A.13 (Continuación) Resultados obtenidos en la etapa de tratamiento térmico del hueso.

Corrida	Masa Crisol (g)	Masa crisol+ Antes (g)	hueso Después (g)	Masa hueso Inicial	Diferencia de masa (g)
6	10,4353	12,3107	11,8040	1,8754	0,5067
7	10,4338	12,0022	11,5791	1,5684	0,4231
8	11,4400	13,3360	12,8067	1,8960	0,5293
9	10,6320	12,5388	12,0022	1,9068	0,5366

Cuadro A.14 Resultados obtenidos mediante microanálisis EDS de las muestras de hueso sometidas a tratamiento térmico.

Corrida	Peso atómico					
	Carbón (%)	Oxígeno (%)	Sodio (%)	Magnesio (%)	Fosforo (%)	Calcio (%)
1	8,40	62,48	1,07	0,58	11,40	16,08
2	6,03	62,60	-	-	12,78	18,59
3	6,11	61,65	-	-	11,45	20,78
4	7,00	62,02	1,31	0,57	11,79	17,31
5	8,70	62,01	1,51	0,52	10,71	16,56
6	8,06	61,91	2,55	0,63	11,35	15,49
7	8,25	62,38	1,28	0,48	11,44	16,17
8	7,84	61,88	1,96	0,54	11,27	16,50
9	8,68	62,13	1,63	0,58	10,93	16,04

APENDICE B
RESULTADOS INTERMEDIOS

Cuadro B.1 Densidad del hueso limpio.

Hueso	Densidad (g/mL)
1	1,925
2	1,979
3	2,036
4	1,967
5	1,830
<i>Promedio</i>	<i>1,947</i>

Cuadro B.2 Porcentaje de humedad en el hueso limpio.

Muestra	Humedad (%)
1	3,67
2	3,96
3	3,82
<i>Promedio</i>	<i>3,82</i>

Cuadro B.3 Porcentaje de materia orgánica en el hueso limpio.

Muestra	Materia Orgánica (%)
1	6,97
2	6,62
3	6,36
<i>Promedio</i>	<i>6,65</i>

Cuadro B.4 Porcentajes de rendimiento obtenidos en la determinación del tiempo de rendimiento máximo de electrólisis efectuadas a 108mA/cm² y 320 rpm.

Tiempo (horas)	Rendimiento (%)
3	28,25
5	43,53
6	64,54
7	65,70
9	81,25
11	95,73

Cuadro B.5 Porcentajes de rendimiento obtenidos en la etapa de electrólisis.

Corrida	Rendimiento (%)
1	52,54
2	50,04
3	48,97
4	44,68
5	39,50
6	40,03
7	59,24
8	54,95
9	51,29
10	54,86
11	50,66
12	47,98
13	61,74
14	66,75
15	54,69
16	56,29
17	54,06
18	54,15

Cuadro B.6 Relación Calcio/Fósforo de las muestras de la etapa de electrólisis analizadas.

Corrida	Corriente (A)	Velocidad agitación (rpm)	Relación atómica Calcio/Fósforo (adim)
1	3,2	120	1,47
4	3,2	220	1,59
5	3,2	320	1,56
8	3,7	120	1,57
9	3,7	220	1,66
12	3,7	320	1,71
13	4,1	120	1,54
15	4,1	220	1,59
18	4,1	320	1,82

Cuadro B.7 Cálculo del volumen y el área superficial del electrodo utilizado en la electrólisis

Dimensión	Valor
Volumen desplazado por el electrodo + el alambre sujetador	1,15 cm ³
Volumen del alambre	0,109 cm ³
Volumen del electrodo	1,041 cm ³
Longitud total de la malla	120,31 cm
Área Superficial	39,67 cm ²

Cuadro B.8 Totales de cada densidad de corriente en cada replica para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis.

		Réplica 1	Réplica 2	Totales
Dens.Corr	81	141.01	134.75	275.76
(mA/cm²)	93	161.19	157.79	318.98
	103	170.49	177.19	347.68
	Totales	472.69	469.73	942.42

Cuadro B.9 Análisis de varianza de los porcentajes de rendimiento para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	436,90	2	218,45	43,24	0,0000	4,26
Columnas	291,73	2	145,86	28,87	0,0001	4,26
Interacción	24,74	4	6,19	1,22	0,3660	3,63
Dentro del grupo	45,47	9	5,05			
Total	798,83	17				

Cuadro B.10 Medias de la relación Ca/P de cada densidad de corriente y cada velocidad de agitación, para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis.

Medias			
Densidad de corriente	Velocidad de agitación		
81 mA/cm²	1,54	120 rpm	1,53
93 mA/cm²	1,65	220 rpm	1,61
103 mA/cm²	1,65	320 rpm	1,7
Media general	1,61		

Cuadro B.11 Análisis de varianza de la relación Ca/P para el diseño de bloques aleatorizados de la electrólisis.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,023	2,00000	0,0117	2,46	0,20	6,94
Columnas	0,043	2,00000	0,0217	4,54	0,09	6,94
Error	0,019	4,00000	0,0048			
Total	0,086	8,00000				

Cuadro B.12 Porcentaje de materia orgánica removida del hueso sometido a tratamiento térmico.

Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Concentración de Etanol (%)	Materia Orgánica Removida (%)
1	625	2	0	29,05
2	625	3	50	25,80
3	625	4	95	27,68
4	725	2	95	28,71
5	725	3	0	28,36
6	725	4	50	27,02
7	825	2	50	26,98
8	825	3	95	27,92
9	825	4	0	28,14

Cuadro B.13 Relación Calcio/Fósforo de las muestras de hueso sometidas a tratamiento térmico.

Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Concentración de Etanol (%)	Relación atómica Calcio/Fósforo (adim)
1	625	2	0	1,41
2	625	3	50	1,45
3	625	4	95	1,81
4	725	2	95	1,47
5	725	3	0	1,55
6	725	4	50	1,36
7	825	2	50	1,41
8	825	3	95	1,46
9	825	4	0	1,47

Cuadro B.14 Medias del porcentaje de materia orgánica removida, de cada temperatura, tiempo y concentración de disolvente, para el diseño de cuadrado latino de la etapa de tratamiento térmico.

Medias					
Tiempo	Temperatura			Concentración Etanol	
2 horas	28.25	625°C	27.51	0%	28.52
3 horas	27.36	725°C	28.03	50%	26.60
3 horas	27.61	825°C	27.68	95%	28.10
Media general	27.74	Total Tiempo/Temp.	83.22		

Cuadro B.15 Análisis de varianza del porcentaje de materia orgánica removida para el diseño de cuadrado latino de la etapa de tratamiento térmico.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico F005</i>	<i>Valor crítico F001</i>
Filas	0,42	2	0,21	1,32	19	99
Columnas	1,25	2	0,63	3,92	19	99
Tratamientos	6,10	2	3,05	19,12	19	99
Residuos	0,32	2	0,16			
Total	8,10	9				

Cuadro B.16 Análisis de varianza de la relación Ca/P para el diseño de cuadrado latino de la etapa de tratamiento térmico.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico F005</i>	<i>Valor crítico F001</i>
Filas	0,022	2	0,01	0,42	19	99
Columnas	0,020	2	0,01	0,40	19	99
Tratamientos	0,046	2	0,02	0,89	19	99
Residuos	0,051	2	0,03			
Total	0,139	9				

APENDICE C

MUESTRA DE CÁLCULO

C.1 CÁLCULO DE LA DENSIDAD DEL HUESO LIMPIO

Para calcular la densidad del hueso se utiliza la siguiente ecuación:

$$Densidad = \frac{masa}{volumen\ desplazado} \quad (C.1)$$

Por ejemplo, para calcular la densidad presentada en el Cuadro B.1, Columna 2, Fila 3; se toman los valores del Cuadro A.2, Columnas 2 y 5, Fila 3 y se obtiene:

$$Densidad = \frac{9,627}{5} = 1,925$$

Una vez, calculado esto para las otras cuatro muestras de hueso, se obtiene un promedio de ellas utilizando la siguiente ecuación:

$$Pr\ omedio = \frac{\sum resultados}{número\ de\ resultados} \quad (C.2)$$

La densidad promedio del hueso limpio se obtiene tomando los valores del Cuadro B.1, Columna 2, Filas 3, 4, 5, 6 y 7:

$$Pr\ omedio = \frac{1,925 + 1,979 + 2,036 + 1,967 + 1,830}{5} = 1,947$$

Cuyo resultado se encuentra en el Cuadro B.1, Columna 2, Fila 8.

C.2 CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD EN EL HUESO LIMPIO

El porcentaje de humedad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$Porcentaje = \frac{masa\ al\ inicio - masa\ al\ final}{masa\ del\ hueso} \times 100 \quad (C.3)$$

Tomando los valores del Cuadro A.5, Columnas 3, 4, y 5, Fila 6; se obtiene el porcentaje de humedad presentado en el Cuadro B.2, Columna 2, Fila 3 de la siguiente manera:

$$Porcentaje = \frac{(33,7412 - 33,815)}{2,0098} \times 100 = 3,67$$

En forma idéntica se calcula el porcentaje de materia orgánica removida en el hueso sometido a tratamiento térmico, tomando los datos del Cuadro A.13, Columnas 3, 4 y 5, con lo cual se obtienen los valores del Cuadro B.12, Columna 5.

El porcentaje de humedad promedio se calcula mediante la ecuación C.2, cuyo resultado se encuentra en el Cuadro B.2, Columna 2, Fila 6.

C.3 CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA EN EL HUESO LIMPIO

El cálculo de este porcentaje se realiza mediante la ecuación C.3, con la salvedad de que a ese valor se le resta el porcentaje de humedad promedio calculado.

Tomando los valores del cuadro A.6, Columnas 3, 4, y 5, Fila 6, y el valor del Cuadro B.2, Columna 2, Fila 6; se obtiene el porcentaje de materia orgánica presentado en el Cuadro B.3, Columna 2, Fila 3, como sigue:

$$Porcentaje = \frac{(12,6097 - 12,3995)}{1,9478} \times 100 - 3,82 = 6,97$$

El porcentaje de materia orgánica promedio se calcula mediante la ecuación C.2, cuyo resultado se presenta en el Cuadro B.3, Columna 2, Fila 6.

C.4 CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO EN LA ELECTRÓLISIS

El porcentaje de rendimiento en la electrólisis se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$Porcentaje = \frac{masa\ del\ producto}{masa\ del\ hueso \times \left(1 - \frac{\% humedad + \% materia\ orgánica}{100} \right)} \times 100 \quad (C.4)$$

Tomando los valores del Cuadro A.9, Columna 8, Fila 4; del Cuadro B.2, Columna 2, Fila 6, del Cuadro B.3, Columna 2, Fila 6 y considerando que para un volumen de disolución de EDTA-Hueso de 500 mL, la masa de hueso utilizada es de 12,5 g, el porcentaje de rendimiento se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje} = \frac{5,88}{12,5 \times \left(1 - \frac{3,82 + 6,65}{100}\right)} \times 100 = 52,54$$

Cuyo resultado se presenta en el Cuadro B.5, Columna 4, Fila 4.

C.5 CÁLCULO DE LA RELACIÓN ATÓMICA CALCIO/FÓSFORO (CA/P)

La relación atómica entre el calcio y el fósforo en las muestras se calcula de la siguiente manera:

$$Ca / P = \frac{\text{Peso atómico del Calcio}}{\text{Peso atómico del Fósforo}} \quad (\text{C.5})$$

Tomando los valores del Cuadro A.10, Columnas 7 y 8, Fila 5, se obtiene el valor del Cuadro B.6, Columna 4, Fila 4, como se presenta a continuación:

$$Ca / P = \frac{14,41}{9,79} = 1,47$$

De la misma manera se calculan los valores presentados en el Cuadro B.13, Columna 5; tomando los valores del Cuadro A.14, Columnas 6 y 7.

C.6 CÁLCULO DEL VOLUMEN Y EL ÁREA SUPERFICIAL DEL ELECTRODO

El volumen del electrodo más el alambre que lo sujeta se obtiene midiendo con una bureta el volumen desplazado por este al sumergirlo en un beaker con agua con un volumen inicial conocido; dicho volumen se presenta en el Cuadro B.7, Columna 2, Fila 2.

Dado que lo que interesa es solamente el área superficial que se encuentra en contacto con la disolución durante la electrólisis, se debe restar el volumen del alambre sujetador al volumen anterior para hacer el cálculo del área superficial del electrodo. El volumen del electrodo se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$Volumen_{Electrodo} = Volumen\ desplazado - Longitud_{Alambre} \times \pi \times \left(\frac{Diámetro_{Alambre}}{2} \right)^2 \quad (C.6)$$

Tomando los valores del Cuadro A.11, Columna 2, Filas 3 y 6, y del Cuadro B.7, Columna 2, Fila 2; se obtiene el volumen del electrodo, presentado en el Cuadro B.7, Columna 2, Fila 9:

$$Volumen_{Electrodo} = 1,15 - 12,570 \times \pi \times \left(\frac{0,105}{2} \right)^2 = 1,041$$

Una vez calculado el volumen del electrodo, se aproxima una “longitud equivalente” correspondiente a la sumatoria de las longitudes de cada uno de los pequeños cilindros que constituyen los alambres en la malla del electrodo, para lo cual se utiliza la siguiente ecuación:

$$Longitud\ equivalente = \frac{Volumen_{Electrodo}}{\pi \times \left(\frac{Diámetro_{Alambre}}{2} \right)^2} \quad (C.7)$$

Tomando los valores del Cuadro A.11, Columna 2, Fila 4 y el Cuadro B.7, Columna 2, Fila 4; se obtiene la longitud equivalente del electrodo, presentada en el cuadro B.7, Columna 2, Fila 5:

$$Longitud\ equivalente = \frac{1,041}{\pi \times \left(\frac{0,105}{2} \right)^2} = 120,31$$

Calculado lo anterior, se estima el área superficial del electrodo mediante la siguiente ecuación:

$$Area\ superficial = 2 \times \pi \times \frac{Diámetro_{Electrodo}}{2} \times Longitud\ equivalente \quad (C.8)$$

Al tomar los valores del Cuadro A.11, Columna 2, Fila 4 y del Cuadro B.7, Columna 2, Fila 5, se obtiene el área superficial del electrodo, la cual se presenta en el Cuadro B.7, Columna 2, Fila 6:

$$Area\ superficial = 2 \times \pi \times \frac{3,470}{2} \times 120,31 = 39,67$$

C.7 CÁLCULO DE LA VARIANZA PARA EL DISEÑO DE BLOQUES ALEATORIZADOS DE LA ELECTRÓLISIS

Los cálculos del análisis de varianza presentados en el Cuadro B.9 y B.11, fueron obtenidos mediante la herramienta de *Análisis de Datos* de la Hoja de Cálculo de Excel, utilizando la opción *Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo* para el caso de la matriz de rendimiento, y la opción *Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo* para el caso de la matriz de relación Ca/P.

C.8 CÁLCULO DE LA VARIANZA PARA EL DISEÑO DE CUADRADO LATINO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

C.8.1 Cálculo de la suma de cuadrados para el diseño de cuadrado latino del tratamiento térmico

Denotemos por y_{itg} la variable aleatoria correspondiente a la fila i -ésima, a la columna t -ésima, y al tratamiento g -ésimo, los cuales suman un total de n filas, k columnas y j tratamientos.

El cálculo de la suma de cuadrados de la media S_M , de las filas S_f , de las columnas S_c , de los tratamientos S_t , y de los residuos S_R , para k columnas y n filas, se realiza con las siguientes ecuaciones:

$$S_M = \frac{\left(\sum_{i,t} \tau_{itg} \right)^2}{k^2} \quad (\text{C.9})$$

$$S_f = \frac{\sum \tau_i^2}{k} - S_M \quad (\text{C.10})$$

$$S_c = \frac{\sum \tau_t^2}{k} - S_M \quad (\text{C.11})$$

$$S_t = \frac{\sum \tau_g^2}{k} - S_M \quad (\text{C.12})$$

$$S_R = \sum_i \sum_t y_{it}^2 - S_M - S_f - S_c - S_t \quad (\text{C.13})$$

En este caso, las temperaturas corresponden a las filas, los tiempos a las columnas, y las concentraciones de etanol, a los tratamientos. Además, los valores denominados como τ_i, τ_t y τ_g , corresponden a los totales de la fila i -ésima, la columna t -ésima, y del tratamiento g -ésimo, respectivamente.

Para calcular por ejemplo, los valores para el porcentaje de materia orgánica removida, presentados en el Cuadro B.19, Columna 2, se deben tomar los valores del Cuadro 5.5:

$$S_M = \frac{(13,39)^2}{3^2} = 19,92$$

$$S_f = \frac{(4,67)^2 + (4,38)^2 + (4,34)^2}{3} - 19,92 = 0,022$$

$$S_c = \frac{(4,29)^2 + (4,46)^2 + (4,64)^2}{3} - 19,92 = 0,020$$

$$S_t = \frac{(4,43)^2 + (4,22)^2 + (4,74)^2}{3} - 19,92 = 0,046$$

$$S_R = (1,41)^2 + (1,45)^2 + \dots + (1,47)^2 - 19,92 - 0,022 - 0,020 - 0,046 = 0,051$$

La suma de cuadrados para el porcentaje de materia orgánica removida se calcula en forma idéntica, utilizando los datos del Cuadro 5.7. Los resultados de éstos se presentan en el Cuadro B.15, Columna 2.

C.8.2 Cálculo de los grados de libertad

Una vez calculadas las sumas de cuadrados, se calculan los grados de libertad ν , para cada una de las poblaciones:

$$\nu = (\text{número de observaciones} - 1) \quad (\text{C.14})$$

Así, por ejemplo, los grados de libertad de las filas (temperatura), se calculan como sigue:

$$\nu_b = (3 - 1) = 2$$

Análogamente se calculan los grados de libertad para las columnas y tratamientos. Los resultados de éstos, se presentan en el Cuadro B.19, Columna 3, Filas 4, 5, 6 y 7.

C.8.3 Cálculo de la varianza o cuadrado medio

La varianza o cuadrado medio s^2 , se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$s^2 = \frac{S}{\nu} \quad (\text{C.15})$$

Para calcular el cuadrado medio de las filas, presentado en el Cuadro B.19, Columna 4, Fila 4; se toman los valores del mismo cuadro, Columnas 2 y 3, Fila 4:

$$s_f^2 = \frac{0,022}{2} = 0,01$$

De la misma manera se calculan el resto de cuadrados medios, cuyos resultados se encuentran en el Cuadro B.19, Columna 4.

C.8.4 Cálculo de la relación de cuadrados medios

La relación de cuadrados medios F , se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$F = \frac{s^2}{s_R^2} \quad (\text{C.16})$$

Para calcular la relación de cuadrados medios de las filas, presentada en el Cuadro B.19, Columna 5, Fila 4; se toman los valores del mismo cuadro, Columna 4, Filas 4 y 7:

$$F = \frac{0,01}{0,03} = 0,42$$

APENDICE D

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

D.1 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE HIDRÓXIDO DE SODIO PARA LA LIMPIEZA DEL HUESO

Disolución A

Para preparar la disolución A, disolver 120 g de NaOH en 4000 mL de agua destilada.

Disolución B

Para preparar la disolución B, disolver 400 g de NaOH en 4000 mL de agua destilada.

Disolución C

Para preparar la disolución C, disolver 6 g de NaOH en 1500 mL de agua destilada.

D.2 LIMPIEZA DEL HUESO

Lote 1

Para la limpieza del lote 1 de huesos, tomar todas las partes disponibles de hueso, entre ellas costillas, pelvis y fémur y realizar lo siguiente:

- 1) Colocar los huesos en una marmita con agua hirviendo durante 3 horas.
- 2) Eliminar restos de carne y cartílagos.
- 3) Colocar los huesos en beakers con la disolución A de NaOH, completamente sumergidos y a una temperatura alrededor de 65 °C, durante aproximadamente 3 horas.
- 4) Lavar los huesos con agua, hasta llevar a pH neutro.
- 5) Colocar los huesos en bandejas y secar en una estufa a aproximadamente 90°C durante 3 horas.
- 6) Quebrar en un quebrador de mandíbulas, primero con mandíbula abierta y luego con mandíbula cerrada.
- 7) Tratar los huesos con la disolución B de NaOH, a una temperatura alrededor de 60°C, durante aproximadamente 12 horas.

- 8) Lavar los huesos con agua, hasta llevar a pH neutro.
- 9) Colocar los huesos en bandejas y secar en una estufa a aproximadamente 100°C durante 6 horas.
- 10) Moler los huesos en un molino de martillos y tamizar.
- 11) Tratar los huesos con la disolución B de NaOH, a una temperatura alrededor de 60°C, durante aproximadamente 12 horas.
- 12) Colocar los huesos en bandejas y secar en una estufa a aproximadamente 70°C durante 24 horas.
- 13) Tamizar los huesos.

Lote 2

Para la limpieza del lote 2 de huesos, realizar una preselección de huesos, descartando aquellos correspondientes a cartílagos y partes que no se observen muy blancas y realizar lo siguiente:

- 1) Colocar los huesos en una marmita con agua hirviendo durante 6 horas.
- 2) Eliminar restos de carne y cartílagos.
- 3) Colocar los huesos en beakers con la disolución B de NaOH, completamente sumergidos y a una temperatura alrededor de 70 °C, durante aproximadamente 15 horas, quebrar los huesos manualmente, y dejar por unas 15 horas más.
- 4) Lavar los huesos con agua, hasta llevar a pH neutro.
- 5) Colocar los huesos en bandejas y secar en una estufa a aproximadamente 70°C durante 12 horas.
- 6) Moler en un molino de martillos y tamizar.

Lote 3

Para el lote 3 de huesos utilizar solamente el fémur, el cual se debe cortar en trozos de aproximadamente 10 cm de largo, descartando los extremos de éste. Para su limpieza, realizar lo siguiente:

- 1) Eliminar manualmente la porción de grasa que se encuentra en el centro del hueso .

- 2) Colocar los huesos en una marmita con agua hirviendo durante 3 horas.
- 3) Eliminar restos de carne.
- 4) Secar los huesos en una estufa a aproximadamente 70°C durante 12 horas.
- 5) Quebrar en un quebrador de mandíbulas, y luego moler en un molino de martillos.
- 6) Colocar los huesos en beakers con la disolución C de NaOH, a 70°C, durante 3 horas.
- 7) Lavar los huesos con agua hasta llevar a pH neutro.
- 8) Secar los huesos en una estufa a aproximadamente 70°C durante 24 horas, y luego tamizar.

D.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DEL HUESO

Para estimar la densidad del hueso, realizar lo siguiente:

- 1) Elegir 5 muestras de hueso de tamaño similar.
- 2) Pesar los 5 huesos.
- 3) Colocar un hueso en una probeta con un volumen inicial de agua, y leer el volumen final luego de sumergido el hueso. La diferencia de volumen corresponde al volumen del hueso.
- 4) Repetir el paso anterior con los otros 4 huesos.

D.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL HUESO LIMPIO

Para determinar el porcentaje de humedad del hueso limpio se debe realizar el siguiente procedimiento:

- 1) Pesar en una balanza analítica aproximadamente 2 g de muestra de la Malla No.40 del lote 1 de hueso. Realizar esto por triplicado.

- 2) Colocar las muestras en 3 beakers prepesados y dejar secando en una estufa durante un día.
- 3) Colocar los beakers en un desecador por al menos una hora.
- 4) Sacar las muestras del desecador y pesar inmediatamente en la balanza analítica.

D.5 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA EN EL HUESO LIMPIO

Para determinar el porcentaje de materia orgánica en el hueso se debe realizar lo siguiente:

- 1) Pesar en una balanza analítica aproximadamente 2 g de muestra de la Malla No.40 del lote 1 de hueso. Realizar esto por triplicado.
- 2) Colocar las muestras en 3 crisoles prepesados y calcinar en una mufla a 600°C durante 2 horas.
- 3) Dejar enfriando los crisoles sobre asbesto hasta que alcancen una temperatura alrededor de 40°C.
- 4) Colocar los crisoles en el desecador por al menos una hora.
- 5) Sacar las muestras del desecador y pesar inmediatamente en la balanza analítica.

D.6 PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN EDTA-HUESO

Disolución 1

Para preparar la disolución 1 de EDTA-Hueso, agregar 36,55 g de EDTA en aproximadamente 300 mL de agua destilada, y adicionar 10,5 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 12,55 g del hueso malla No.80 del lote 1, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de

zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 500 mL con agua destilada.

Disolución 2

Para preparar la disolución 2 de EDTA-Hueso, agregar 73,1 g de EDTA en aproximadamente 600 mL de agua destilada, y adicionar 23,08 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 25,15 g del hueso malla No.50 del lote 1, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 1000 mL con agua destilada.

Disolución 3

Para preparar la disolución 3 de EDTA-Hueso, agregar 146,12 g de EDTA en aproximadamente 1200 mL de agua destilada, y adicionar 40,21 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 50,22 g del hueso malla No.50 del lote 1, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 2000 mL con agua destilada.

Disolución 4

Para preparar la disolución 4 de EDTA-Hueso, agregar 73,12 g de EDTA en aproximadamente 600 mL de agua destilada, y adicionar 20,42 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 25,11 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 1000 mL con agua destilada.

Disolución 5

Para preparar la disolución 5 de EDTA-Hueso, agregar 146,1 g de EDTA en aproximadamente 1200 mL de agua destilada, y adicionar 41,4 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 50,19 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 2000 mL con agua destilada.

Disolución 6

Para preparar la disolución 6 de EDTA-Hueso, agregar 146,12 g de EDTA en aproximadamente 1200 mL de agua destilada, y adicionar 40,78 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 50,11 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 2000 mL con agua destilada.

Disolución 7

Para preparar la disolución 7 de EDTA-Hueso, agregar 73,13 g de EDTA en aproximadamente 600 mL de agua destilada, y adicionar 20,48 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 25,12 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 1000 mL con agua destilada.

Disolución 8

Para preparar la disolución 8 de EDTA-Hueso, agregar 146,13 g de EDTA en aproximadamente 1200 mL de agua destilada, y adicionar 41,6 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 50,19 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 2000 mL con agua destilada.

Disolución 9

Para preparar la disolución 9 de EDTA-Hueso, agregar 73,12 g de EDTA en aproximadamente 600 mL de agua destilada, y adicionar 22,4 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 25,1 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 1000 mL con agua destilada.

Disolución 10

Para preparar la disolución 10 de EDTA-Hueso, agregar 43,97 g de EDTA en aproximadamente 400 mL de agua destilada, y adicionar 14,67 g de NaOH. Realizar la disolución con agitación y calentamiento a alrededor de 70°C. Una vez disuelto el EDTA, dejar enfriar la disolución y agregar 14,88 g de mezcla de las mallas No.50, 60 y 80 de los lotes 1 y 2 de hueso, agitando hasta lograr que se disuelva. Filtrar la disolución al vacío y si es posible utilizar un poco de zeolita sobre el papel filtro, para agilizar el proceso de filtración. Aforar la disolución a 600 mL con agua destilada.