

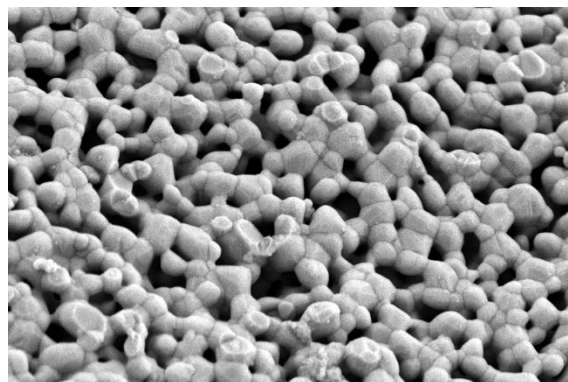
FABRICACIÓN DE FOSFATOS CÁLCICOS NANOPOROSOS PARA REXENERACIÓN ÓSEA

Traballo de Fin de Grao

Curso 2018-2019

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GRAO EN QUÍMICA



Andrea Granja Fondevila

Santiago de Compostela, Febreiro 2019



Instituto de Cerámica de Galicia (ICG)
Universidade de Santiago de Compostela
Avda. Mestre Mateo s/n., Campus Vida
15706, Santiago de Compostela
info@icg.edu.es

D. FRANCISCO GUITIÁN RIVERA, Director do Instituto de Cerámica de Galicia, e profesor titular do departamento de Edafoloxía e Química Agrícola da Universidade de Santiago de Compostela e **Doña MÓNICA GÓMEZ BOADO**, investigadora contratada do Instituto de Cerámica de Galicia, titor e cotitora do presente Traballo de Fin de Grao,

AUTORIZAN a presentación do proxecto titulado *“FABRICACIÓN DE FOSFATOS CÁLCICOS NANOPOROSOS PARA REXENERACIÓN ÓSEA”* realizado por **ANDREA GRANJA FONDEVILA** baixo a nosa dirección, no Instituto de Cerámica de Galicia (ICG) pertencente á Universidade de Santiago de Compostela, para optar ao título de Grao en Química.

Para que así conste, expiden a presente autorización en Santiago de Compostela, Febreiro de 2019.

Fdo.: Francisco Guitián Rivera

Fdo.: Mónica Gómez Boado

CONTIDOS

RESUMO.....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.Ciencia de materiais.....	3
1.2.Rexeneración ósea.....	3
1.2.1. Bioloxía do óso	4
1.2.2. Influencia da porosidade no proceso de rexeneración ósea.....	5
1.3. Biomateriais.....	7
1.3.1. Clasificación dos biomateriais.....	7
1.4. Biocerámicas.....	9
1.4.1. Clasificación das biocerámicas.....	10
1.4.2. Biocerámicas de fosfatos cálcidos.....	10
1.4.2.1. Fosfato tricálcico.....	13
CAPÍTULO II. OBXECTIVOS E PLAN DE TRABALLO.....	16
2.1. Obxectivos.....	16
2.2. Plan de traballo.....	16
CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL	17
3.1. Síntese de β -TCP.....	17
3.1.1. Obtención do ACP.....	17
3.1.2. Proceso de calcinación do ACP.....	19
3.1.3. Proceso de moenda do β -TCP.....	20
3.1.4. Caracterización dos materiais de partida: ACP e β -TCP.....	20
3.2. Procesamento e obtención de materiais de β -TCP.....	21
3.2.1. Procesamento de materiais partindo de ACP sen aditivos.....	22
3.2.2. Procesamento de materiais partindo de ACP e metil celulosa.....	22
3.2.3. Procesamento de materiais partindo de β -TCP sen aditivos.....	23

3.2.4. Procesamento de materiais partindo de β -TCP e metil celulosa..	24
3.3. Consolidación de materiais. Sinterización.....	24
3.4. Caracterización dos materiais de β -TCP.....	27
3.4.1. Análise mineralóxica. Difracción de raios X de po (DRX).....	27
3.4.2. Análise granulométrica vía húmida.....	29
3.4.3. Porosimetría de mercurio.....	30
3.4.4. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).....	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	34
4.1. Influencia do tratamento térmico.....	34
4.2. Estudo da porosidade.....	35
4.2.1. Porosidade dos materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos..	35
4.2.2. Porosidade dos materiais obtidos a partir de β -TCP con metil celulosa.....	36
4.2.3. Porosidade dos materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos...	37
4.2.4. Porosidade dos materiais obtidos a partir de ACP con metil celulosa.....	38
4.3. Estudo da microestrutura.....	40
4.3.1. Materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos.....	40
4.3.2. Materiais obtidos a partir de β -TCP e metil celulosa.....	41
4.3.3. Materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos.....	42
4.3.4. Materiais obtidos a partir de ACP e metil celulosa.....	43
CAPÍTULO V. RESUMO E CONCLUSIÓN.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	47

RESUMO

A historia dos fosfatos cálcicos no campo da medicina comeza no 1769 co descubrimento da existencia destes compostos nos ósos. Isto esperta o interese da comunidade científica e podemos dicir que os fosfatos cálcicos abren as portas ao desafío da rexeneración ósea. A porcentaxe de poros, o tamaño de poro así como a interconectividade dos poros son factores determinantes para que este proceso sexa exitoso. Propiedades coma a súa biocompatibilidade, osteointegración e rápida reabsorción fan do β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; β -TCP) un excelente candidato como material para a rexeneración. No presente traballo levouse a cabo a fabricación de materiais de β -TCP e estudouse a evolución da porosidade e tamaño de poro en función da calcinación do material de partida, do emprego de aditivos e da temperatura de sinterización. A caracterización de materiais realízase mediante granulometría vía húmida, difracción de raios X (DRX), porosimetría de mercurio e microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM). En todos os casos ao aumentar temperatura de sinterización, diminúe a porosidade e aumenta o tamaño de poro. Os materiais procesados con metil celulosa presentan unha distribución de poros bimodal. O menor tamaño de poro obtense co ACP sen aditivos a 925°C: 269nm de tamaño de poro.

RESUMEN

La historia de los fosfatos cálcicos en el campo de la medicina comienza en el 1769 con el descubrimiento de la existencia de estos compuestos en los huesos. Esto despierta el interés de la comunidad científica y podemos decir que los fosfatos cálcicos abren las puertas al desafío de la regeneración ósea. El porcentaje de poros, el tamaño de poro así como la interconectividad de los poros son factores determinantes para que este proceso sea exitoso. Propiedades como su biocompatibilidad, osteointegración y rápida reabsorción hacen del β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; β -TCP) un excelente candidato como material para la regeneración. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la fabricación de materiales de β -TCP y se estudió la evolución de la porosidad y el tamaño de poro en función de la calcinación del material de partida, del

empleo de aditivos y de la temperatura de sinterización. La caracterización de materiales se realiza mediante granulometría vía húmeda, difracción de rayos X (DRX), porosimetría de mercurio y microscopía electrónica de barrida de emisión de campo (FE-SEM). En todos los casos al aumentar la temperatura de sinterización, disminuye la porosidad y aumenta el tamaño de poro. Los materiales procesados con metil celulosa presentan una distribución de poros bimodal. El menor tamaño de poro se obtiene con ACP sin aditivos a 925°C: 269nm de tamaño de poro

SUMMARY

The history of calcium phosphates in the field of medicine begins in 1769 with the discovery of the existence of these compounds in bones. This arouses the interest of the scientific community and we can say that calcium phosphates open the doors to the bone regeneration challenge. The percentage of pores, pore size as well as interconnectivity of the pores are determining factors for this process to be successful. Properties such as its biocompatibility, osseointegration and rapid resorption make β -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; β -TCP) an excellent candidate as a material for regeneration. In the present work, the manufacture of β -TCP materials was carried out and the evolution of porosity and pore size was studied according to the calcination of the starting material, the use of additives and the sintering temperature. The characterization of the materials is carried out using wet granulometry, X-ray diffraction (XRD), mercury porosimetry and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). In all cases, increasing the sintering temperature, the porosity decreases and the pore size increases. Materials processed with methyl cellulose have a bimodal pore distribution. The smallest pore size is obtained with ACP without additives at 925 ° C: 269nm pore size.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Ciencia de materiais ¹

A Ciencia de materiais defínese como un campo multidisciplinar encargado de estudar a relación entre a estrutura e as propiedades físicas macroscópicas dun material. Paralelamente, a Enxeñaría de materiais fundaméntase nesta e deseña ou proxecta a estrutura dun material para que teña unhas propiedades predeterminadas.

En todos ou case tódolos aspectos da nosa vida cotiá empregamos materiais, sexan do tipo que sexan, polo que tiveron, teñen e terán unha grande influencia na evolución e desenvolvemento da nosa sociedade. Proba disto é que as primeiras civilizacións coñécense co nome do material que por aquel entón acadou o seu maior grao de desenvolvemento e supuxo un avance, en maior ou menor medida, para a humanidade: Idade de Pedra, Idade do Cobre, Idade do Bronce ou Idade do Ferro.

No último século a esperanza de vida viuse incrementada en todo o mundo. Conxuntamente co envellecemento da poboación, aumenta a incidencia de patoloxías do sistema músculo-esquelético. Tanto as enfermidades relacionadas co envellecemento coma aquelas asociadas a traumas, fracturas... fan que se produza unha maior demanda de materiais que axuden á súa restauración. Hoxe en día, grazas aos avances tanto en medicina coma en investigación de novos materiais, é posible a reconstrución e substitución de numerosas partes do corpo co emprego dos denominados **biomateriais**.

1.2. Rexeneración ósea

A rexeneración ósea é un proceso fisiolóxico complexo e ben orquestrado de restauración do óso, que pode verse durante o proceso de reparación en resposta a unha lesión así como estar involucrado na remodelación continua do esqueleto durante a vida adulta. Unha das características máis fascinantes do óso é a súa capacidade intrínseca para rexenerar, remodelar e adaptarse. Sen embargo, existen situacións clínicas (por exemplo, fracturas complexas, resección de grandes tumores, enfermidades que comprometen a capacidade rexenerativa como a osteoporose

grave...) nas que esta capacidade se ve limitada e precísanse determinados métodos e técnicas para incrementar a rexeneración.²

Entre estes métodos figura o emprego de estruturas porosas sintéticas que consisten en andamios de biomateriais coma o β -TCP, que promoven a migración, proliferización e diferenciación das células óseas involucradas na rexeneración.² Como veremos máis adiante, ditas estruturas deben cumprir moitos requisitos, incluídos a biocompatibilidade, similitude de propiedades mecánicas co tecido nativo, porosidade interconectada e tamaños de poros axeitados. Destes, o tamaño de poro pode ter un impacto significativo na funcionalidade biolóxica do biomaterial.³

1.2.1. Bioloxía do óso

Os ósos son órganos firmes, duros e resistentes que forman parte do endoesqueleto dos vertebrados. Están formados por tecido óseo, un tipo especializado de tecido conxuntivo vivo, complexo, metabólicamente activo e moi organizado. Entre as súas funcións destacan:⁴ proporciona unha rede de soporte interno, un reservorio para minerais, protección para os órganos internos e sitios de unión para os músculos.

O sistema esquelético conta con 206 ósos e segundo a súa morfoloxía poden ser ósos longos, curtos, planos, irregulares, sesamoideos e suturais.

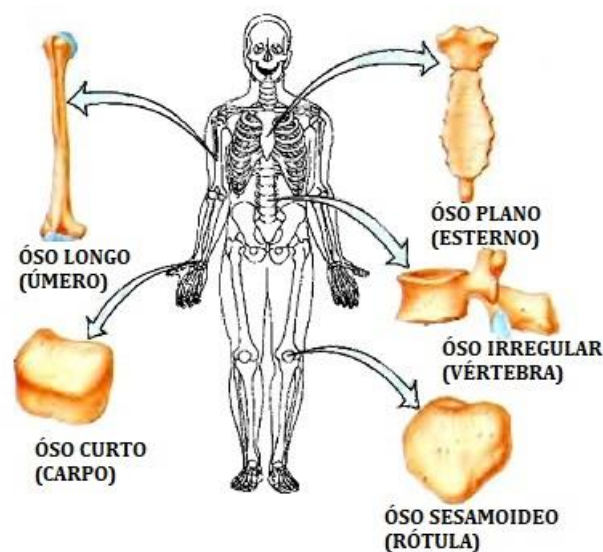


Figura 1. Imaxe na que se mostran exemplos de distintos tipos de óso segundo a súa morfoloxía. Imaxe libre.

Existen dous tipos de ósos que se diferencian macroscópicamente e microscópicamente e son o **óso cortical ou compacto** e **óso esponxoso ou trabecular**.^{3,5}

- O óso cortical representa o 80% da masa ósea do esqueleto debido á súa porosidade relativamente baixa (3-12%). Isto débese a que está constituído por capas concéntricas de laminillas óseas que forman estruturas cilíndricas chamadas osteonas que lle proporcionan unha estrutura compacta. No centro das osteonas atópanse os condutos de Havers por onde transitan os vasos sanguíneos, linfáticos e nervios, e os conductos de Volkmann que serven para conectar varios condutos de Havers.
- Rodeado polo óso compacto atópase o óso esponxoso, que presenta unha porosidade moito maior (50-90%; dependendo da ubicación no corpo). Consiste nunha rede tridimensional formada por trabéculas interconectadas que albergan nas súas cavidades a medula ósea vermella e amarela.

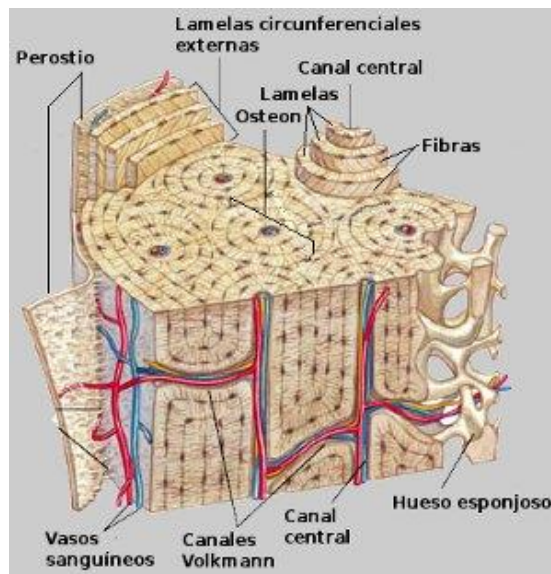


Figura 2. Esquema da estrutura dun óso denso e dun óso esponxoso. Imaxe libre.

1.2.2. Influencia da porosidade no proceso de rexeneración ósea

En última instancia, no proceso de rexeneración ósea, o material empregado será reempazado polo novo óso formado. Para que isto ocorra, debe formarse unha

“ponte” entre o tecido óseo vivo e o enxerto para así garantir a estabilidade e función a longo prazo⁶. Sábese que a porosidade e o tamaño de poro, así como a interconectividade xogan un papel importante no crecemento óseo, xa que os poros permiten a migración e proliferación das células osteoxénicas (células moi activas durante a fase de crecemento dos ósos e na reparación das lesións óseas)⁷. Por iso os substitutos óseos deben imitar a morfoloxía ósea, estrutura e función para optimizar a súa integración.

A necesidade de porosidade na rexeneración foi demostrada nos estudos levados a cabo por Kuboki et al. con partículas densas e porosas de hidroxiapatito como portadoras da proteína morfoxénica ósea (BMP), obtendo como resultado que non se forma óso novo nas partículas densas, mentres que cas estruturas porosas se produce osteoxénese directa.⁸

A diferenza do que considera a Unión Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC), os investigadores en biomateriais empregan o termo macroporosidade cando o tamaño de poro supera os 50 μm , e microporosidade cando é inferior a 50 μm .

O principal obxectivo da **macroporosidade** nas biocerámicas é permitir a colonización celular así como a vascularización (formación de vasos sanguíneos). Distintos estudos mostran que o tamaño dos macroporos debe estar comprendido entre 100 e 400 μm . Estas macroporosidades poden xerarse empregando aditivos que crean poros (poróxenos) dun determinado tamaño, coma cristais, partículas ou fibras de sustancias volátiles; algún exemplos son: sacarosa, cloruro sódico, derivados da celulosa...⁹ No caso da **microporosidade**, facilita a impregnación dos materiais polos fluídos, proporcionando unha gran área superficial para a adsorción e retención de proteínas así como incrementar a proliferización e diferenciación das células. É determinante para que se produza a unión do ósos ao biomaterial ademais da reabsorción deste.^{7,9,10} As microporosidades son o resultado do proceso de sinterización, que se explicará con maior detalle máis adiante.

Finalmente, é importante destacar que a porosidade pechada no é desexable dado que ademais de diminuír as propiedades mecánicas non propicia ningún dos

procesos arriba mencionados. A presenza de **macroporos e microporos interconectados** é un requisito indispensable no proceso de rexeneración ósea.

1.3. Biomateriais

Atopar unha única definición de **biomaterial** non é tarefa fácil xa que foi cambiando para adaptarse ao desenvolvemento e aplicación de materiais de distinta natureza. Grosso modo, defínense coma un conxunto de materiais que se poden implantar nun organismo vivo con algunha finalidade sanitaria. Son materiais deseñados ca fin de reparar ou substituír unha parte ou algunha función do noso organismo, de xeito seguro e fisioloxicamente aceptable. Polo tanto, a **biocompatibilidade** é unha característica intrínseca dos mesmos, é dicir, deben ser bioloxicamente compatibles e non provocar ningunha alteración ou efecto adverso no organismo no que son implantados.¹¹

Ademais de ser biocompatible, un biomaterial debe cumprir unha serie de requisitos tales como¹²:

- ✓ Non ser tóxico nin canceríxeno.
- ✓ Ser quimicamente estable ou biodegradable en produtos non tóxicos.
- ✓ Posuír propiedades mecánicas axeitadas en función do tecido que substitúan (resistencia, peso...).
- ✓ Posuír un deseño, tamaño e forma apropiados.
- ✓ Baixo custo económico.
- ✓ Fabricación e procesamento reproducibles e fiables.

1.3.1. Clasificación dos biomateriais

Estes compostos poden clasificarse atendendo a diversos aspectos tales como: comportamento no organismo, tempo durante o cal manteñen a súa funcionalidade e a súa orixe.

En función do seu comportamento dentro do organismo vivo os biomateriais poden ser **bioactivos** ou **bioinertes**. Un material bioactivo é aquel que posibilita unha

resposta biolóxica na súa interface de maneira que favorece a formación dun enlace entre os tecidos e dito material. Un exemplo é o hidroxapatito. Por outra banda, un material bioinerte é aquel que, a pesares de ter un contacto directo co tecido adxacente, a súa influencia é practicamente nula no mesmo (posúe unha cinética de reacción moi lenta polo que non se produce reacción entre o tecido e o implante). Un exemplo é o titanio.¹³

Segundo o tempo que manteñen a súa funcionalidade, os biomateriais clasifícanse en **biodegradables** ou **biorreabsorbibles** e **bioestables**. Os biorreabsorbibles fan referencia a aqueles materiais que paulatinamente van sendo reabsorbidos polo organismo, de modo que ao final do proceso o material implantado é substituído polo novo óso que se formou no seu lugar. Nestes materiais é necesario que tanto os produtos de partida coma os produtos de degradación sexan inocuos e que non interfiran no proceso de rexeneración de tecidos. O exemplo máis representativo deste grupo é o beta fosfato tricálcico, en adiante β -TCP. En canto aos materiais bioestables, son aqueles que permanecen no organismos sen apenas sufrir modificacións na súa estrutura e propiedades. Exemplo de bioestables son os dispositivos de fixación ósea coma os parafusos, placas metálicas...¹⁴

Atendendo á súa orixe, atopámonos con **biomateriais naturais** ou **sintéticos**. Os de orixe natural son o óso do propio paciente, aquel obtido dun banco de ósos procedentes de individuos da mesma especie ou o procedente de animais. Adoitan recibir os nomes de autoenxerto, aloenxerto e xeroenxerto, respectivamente. O autoenxerto é o mellor substituto do óso para a súa rexeneración, pero en ocasións non é posible realizalo se a cantidade de óso non é suficiente ou se é de mala calidade. Por outra banda, a utilización de aloenxertos e xeroenxertos vese limitada debido á posibilidade de que se transmitan enfermidades ou produzan rexeitamento. Ditas limitacións deron paso aos biomateriais artificiais, e poden clasificarse en materiais metálicos, poliméricos, cerámicas ou materiais compostos.¹⁵ Neste traballo ocupámonos das *biocerámicas*, que veremos con máis detalle no seguinte apartado.

1.4. Biocerámicas

Podemos definir a cerámica como a arte e a ciencia de fabricar e empregar obxectos cuxo compoñente principal son os materiais inorgánicos non metálicos. Esta definición inclúe non só materiais dos que se adoita falar como a porcelana, refractarios..., senón que tamén abrangue materiais magnéticos non metálicos, ferroeléctricos, vitrocerámicas e unha variedade doutros produtos que non existían ata fai uns anos.¹⁶

Os produtos cerámicos adquiren as súas propiedades, tales como resistencia á calor e ao desgaste, resistencia á corrosión, bos illantes eléctricos e térmicos, duras pero fráxiles, pouco tenaces..., tras un tratamento térmico axeitado. De feito, o termo “cerámica” provén da palabra grega “**keramikos**” que significa “cousa queimada”.^{1,17}

Os materiais cerámicos para aplicacións médicas constitúen un campo interesante na obtención de biomateriais para a produción e/ou fixación de implantes. O aumento da esperanza de vida así como a necesidade de proporcionar unha mellora na calidade de vida levaron a progresos neste campo co obxectivo de solucionar problemas que afectan a unha boa parte da poboación.¹⁸ Exemplos destes problemas son a perda de masa ósea (xera osteoporose e a consecuenta fragilidade do óso, o que potencia o posibilidade de fracturas que requirirán implantes de xeonllo ou cadeira, entre outros), perda de pezas dentais que requiren a colocación de implantes dentais, etc.

O incremento destas patoloxías desembocou nunha maior demanda de materiais capaces de substituír ou reparar o tecido óseo. Dentro deste marco falamos das **biocerámicas**, que se definen como cerámicas empregadas na reparación e reconstrución de partes danadas do sistema músculo-esquelético.¹⁹

A historia dos biomateriais cerámicos empregados en medicina comprende diversas fases. Na denominada primeira xeración empregábanse compostos inertes para substituír tecidos danados. Estes materiais evolucionaron cara sustancias bioactivas e biodegradables destinadas a reparar tecidos e máis adiante tamén a rexeneralos. As biocerámicas actuais caracterízanse pola súa bioactividade que lles

permite unirse directamente ao óso, e pola biodegradabilidade, pola cal se integran e se absorben no organismo.²⁰

L.L. Hench definiu en 1988 o Índice de bioactividade [Ecuación 1] como o tempo que ten que transcorrer ata que o 50% da superficie do material implantado se une ao óso.

$$I_B = \frac{100}{t_{0.5}}; \text{ onde "t}_{0.5}\text{" vén expresado en días} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

En xeral as biocerámicas caracterízanse por vantaxes coma unha gran biocompatibilidade, baixa toxicidade, resistencia á corrosión, alta resistencia á compresión e baixas condutividades térmica e eléctrica. Sen embargo presentan os inconvenientes de que son pouco resistentes ao impactos, propiedades difíciles de reproducir e dificultades ao procesar e fabricar.²¹

1.4.1. Clasificación das biocerámicas

Atendendo á resposta do tecido estes materiais poden clasificarse en²²:

- Bioinertes: non hai interacción co tecido despois da implantación. É o caso da alúmina (Al_2O_3) e o zirconio (ZrO_2), coñecidas pola súa inercia química, elevada dureza e resistencia á corrosión e ao desgaste. Normalmente empréganse coma implantes de soporte estrutural.
- Bioactivos: existe unión directa entre o implante e o tecido. Dentro deste grupo encádranse os materiais bioestables coma o hidroxapatito, os bio-vidros e as bio-vitrocerámicas e caracterízanse por ser crebadizas, o cal non resulta un problema xa que non adoitan ter aplicacións estruturais senón de recheo óseo. Por outra banda, están os biorreabsorbibles, que son aqueles que tras introducirse no organismo vense absorbendo gradualmente e terminan sendo substituídos polo novo óso formado. Exemplos destes materiais son os cementos de fosfatos cálcicos e o β -TCP.

1.4.2. Biocerámicas de fosfatos cálcicos.

Dentro do campo das biocerámicas destacan as cerámicas baseadas en fosfatos de calcio.

A historia dos fosfatos cálcicos no campo da medicina comeza no 1769 cando o metalúrxico sueco Johan Gottlieb Gahn descubriu a existencia destes compostos nos ósos.²³ Dende este momento os fosfatos de calcio espertan un gran interese na comunidade científica e podemos dicir que abren as portas ao desafío da rexeneración ósea.⁹

Denomínanse fosfatos cálcicos á familia de minerais que conteñen na súa estrutura ións de calcio (Ca^{2+}) xunto con metafosfatos (PO_3^-), pirofosfatos ($(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$) e ortofosfatos ($(\text{PO}_4)^{3-}$). Son sólidos brancos (excepto se están dopados con algún ión) na súa maioría lixeiramente solubles en auga e outros moi insolubles; en calquera caso, todos son solubles en medio ácido.

Os ortofosfatos cálcicos son de especial importancia xa que son os constituíntes inorgánicos máis importantes dos tecidos duros nos vertebrados. Preséntanse en forma de hidroxapatito non estequiométrica pouco cristalizada e substituída con ións coma sodio, magnesio e carbonato, comunmente denominada “apatito biolóxico”. Os principais constituíntes dos ósos humanos son os ortofosfatos de calcio, o coláxeno e a auga; na figura 3 móstrase unha imaxe SEM dun óso calcinado, é dicir, soamente o esqueleto de fosfato cálcico logo de queimar os compoñentes orgánicos.²⁴



Figura 3. Imaxe SEM dun óso poroso calcinado.²⁴

A familia dos ortofosfatos cálcicos clasifícase pola relación molar calcio-fosfato que varía entre 0.5 e 2.0. Na táboa 1 móstranse os diferentes tipos de ortofosfatos cálcicos de maior interese biolóxico xunto ca súa abreviatura, fórmula química e relación Ca/P correspondente. Dentro deste grupo os fosfatos cálcicos máis estudados e empregados son o β fosfato cálcico (β -TCP, β -Ca₃(PO₄)₂) e o hidroxiapatito (HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂).²⁵

Táboa 1. Clasificación dos ortofosfatos bioloxicamente máis relevantes.²⁴

Relación molar Ca/P	Composto	Abreviatura	Fórmula química
0.5	Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O
0.5	Fosfato monocálcico anhidro	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂
1.0	Fosfato dicálcico dihidratado, "brushita"	DCPD	CaHPO ₄ ·2H ₂ O
1.0	Fosfato dicálcico anhidro, "monetita"	DCPA	CaHPO ₄
1.33	Fosfato octacálcico	OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O
1.5	α -Fosfato tricálcico	α -TCP	α -Ca ₃ (PO ₄)
1.5	β -Fosfato tricálcico	β -TCP	β -Ca ₃ (PO ₄)
1.2-2.2	Fosfato cálcico amorfo	ACP	Ca ₃ (PO ₄) ₂ ·nH ₂ O
1.5-1.67	Hidroxiapatito calcio-deficiente	CDHA	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0<x<1)
1.67	Hidroxiapatito	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
2.0	Fósforo tetracálcico	TTCP	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O

Existe unha serie de propiedades desexables para as biocerámicas de fosfato de calcio. Estas propiedades inclúen: similitude na composición co mineral óseo; bioactividade ou capacidade para formar unha interface directa e forte co tecido óseo; capacidade de promover a función e expresión celular e osteocondutividade (capacidade para proporcionar un andamio para a formación de óso novo). Ademais, deben posuír unha xeometría tridimensional axeitada para ser capaces de unirse e

concentrar proteínas óseas en circulación e, polo tanto, converterse en osteoinductivas (capaces de inducir a osteoxénese ou formación de tecido óseo).²⁶

A pesares de ter unha composición química semellante (táboa 2) o comportamento da HA e o β -TCP no medio fisiolóxico é moi diferente. A HA é moi estable nas condicións de pH e temperatura do medio fisiolóxico ademais de posuír unha excelente bioactividade. Sen embargo, a súa baixa reabsorción pode supoñer unha limitación para determinadas aplicacións. Como consecuencia disto, nos últimos anos incrementouse o uso de β -TCP como material de substitución ósea, dada a súa relativa solubilidade, as propiedades osteoconductoras e a súa gran biocompatibilidade.²⁷

Táboa 2. Composición química referida á porcentaxe en peso de cada elemento para HA e β -TCP.²⁷

Composto	% Ca	% P	% O	% H
β -TCP	38.76	19.97	41.26	0
HA	39.89	18.50	41.41	0.20

1.4.2.1. Fosfato tricálcico

O fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP) emprégase con frecuencia coma un substituto de enxerto óseo en moitos campos como a cirurxía plástica, ortopédica e dental. A súa composición química, próxima á do óso, confírelle as súas excelentes propiedades de biocompatibilidade e o osteointegración. Sumado a isto, a súa elevada reabsorción no entorno biolóxico humano permite unha recolonización significativa da parte tratada mediante o avance do crecemento óseo durante a degradación progresiva deste material.²⁸ Os primeiros ensaios sobre o uso de fosfato tricálcico coma substituto óseo foron realizados en 1920 por Albee e Morrison²³, nos que se probou que o crecemento e unión ósea nunha fractura era maior cando se inxectaba este material.²⁹

O TCP é un ortofosfato cálcico pertencente ao sistema $[\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5]$. Este material presenta catro polimorfos: β , α , α' e γ ; os principais son as formas β e α , mentres que os restantes son polimorfos menos empregados e con condicións de

obtención máis extremas.¹³ O β -TCP é unha fase estable a temperatura ambiente e transfórmase de maneira reconstructiva a 1125°C en α -TCP (para pasar de β a α , e viceversa, primeiro ten que desfacerse por completo a estrutura de partida cara un estado intermedio, para despois reconstruírse a estrutura final). Esta temperatura de cambio de fase non se atopa moi ben definida, difire duns autores a outros.^{24,28,30}

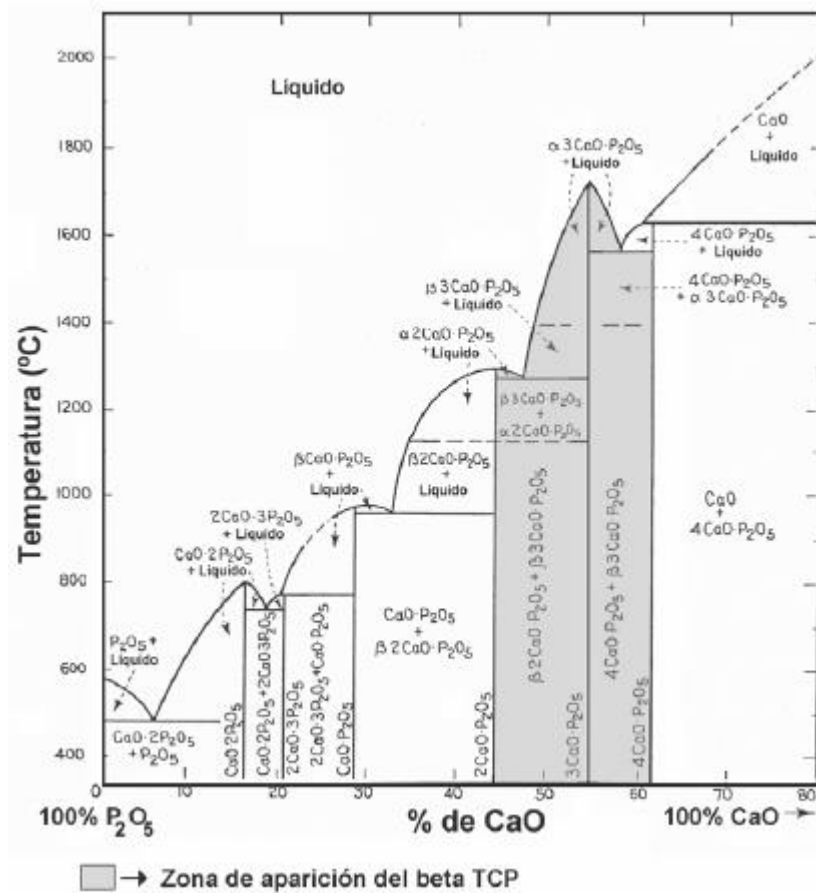


Figura 4. Diagrama de fases correspondente ao sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$.³²

En contraste ca fase α , o β -TCP é termodinamicamente estable nun entorno biolóxico e dentro dun rango de temperatura normal. O β -TCP é menos soluble en auga²⁴, sen embargo a súa biodegradación é máis rápida ca a da forma alfa, debido a que esta última hidrólízase parcial ou totalmente en HA.³¹ Isto determina as aplicacións ás que van destinados cada un dos compostos; o β -TCP emprégase principalmente para preparar biocerámicas biodegradables en forma de gránulos e bloques densos e porosos, mentres que o α -TCP máis soluble e reactivo adoita empregarse coma un po fino para preparar cementos de fosfato de calcio.³⁰ No presente traballo centrarémonos no estudo do β -TCP.

Tal como recollen os estudos cristalográficos levados a cabo por Dickens, Schroeder e Brown³³, o β -TCP cristaliza no grupo espacial romboédrico R_{3c} cunha configuración hexagonal cuxos parámetros de cela unidade son $a=10.439\text{\AA}$, $c=37.375\text{\AA}$.

Por outra banda, o α -TCP cristaliza nun sistema monoclinico, o α' -TCP ten a estrutura do polimorfo α pero un pouco distorsionada e o γ -TCP ten unha estrutura semellante á do β -TCP pero cun maior grao de empacamento.

Táboa 3. Parámetros de cela unidade dos polimorfos de TCP.¹³

Polimorfo	a (Å)	c (Å)
β -TCP	10.439	37.375
α -TCP	12.887	15.219
α' -TCP	12.887	15.219
γ -TCP	5.2847	18.1674

II. OBXECTIVOS E PLAN DE TRABALLO

2.1. Obxectivos

O obxectivo principal do presente traballo é levar a cabo un estudo da evolución de porosidade do β -fosfato tricálcico (β -TCP) atendendo a diferentes factores tales como calcinación dos materiais de partida, emprego de aditivos e temperatura de sinterización.

2.2. Plan de traballo

Para lograr este propósito, o traballo dividiuse nas seguintes tarefas:

- a) Levar a cabo a síntese de β - fosfato tricálcico de elevada pureza.
- b) Estudar a influencia da cristalinidade do material de partida:
 - i. β -TCP.
 - ii. ACP.
- c) Estudar a influencia da presenza ou ausencia de aditivos (metil celulosa) na porosidade.
- d) Estudar a influencia da temperatura de sinterización dos materiais na porosidade.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Síntese de β -TCP

3.1.1. Obtención do ACP

Existen varios métodos para a produción de β -TCP incluídos as reaccións de precipitación en disolucións diluídas, a reacción en estado sólido ou a síntese sol-gel.²⁷ Neste traballo levouse a cabo unha síntese vía húmida; é unha ruta indirecta dado que non é posible obter nun só paso o β -TCP puro senón que se obtén un precursor amorfo, o cal debe someterse a calcinación para que cristalice coma β -TCP.

Traballamos tomando como referencia a síntese descrita por J. Franco¹³, desenvolta nun traballo levado a cabo no Instituto de Cerámica de Galicia (ICG). O método empregado consiste na precipitación a partir de disolucións de calcio e fosfato para obter un precipitado que despois de secado e calcinado teña como estrutura a do β -TCP.

Os reactivos empregados veñen recollidos na seguinte táboa:

Táboa 4. Características dos reactivos empregados na síntese de β -TCP.

Produto	Marca	Fórmula	% Riqueza	Densidade (g cm ⁻³)
Nitrato cálcico tetrahidratado	Panreac	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100	1.86
Ácido ortofosfórico	Panreac	H ₃ PO ₄	85	1.70
Amoníaco	Panreac	NH ₃	33	0.89 (20°C)

Prepáranse as disolucións de nitrato cálcico tetrahidratado, Ca(NO₃)₂·4H₂O, e ácido ortofosfórico, H₃PO₄ cun volume final de 0.5 litros cada unha e unha concentración molar resultante de 1.1M e 0.73M respectivamente.

A continuación axustouse o pH das disolucións en torno a 10.5, empregando NH₃ coma axente alcalinizante, para evitar a formación de fases secundarias coma o pirofosfato cálcico [Ca₂P₂O₇] (C2P) e hidroxapatito [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] (HA). O pH controlouse empregando un medidor de pH CRISON modelo GLP 21; para calibrar o

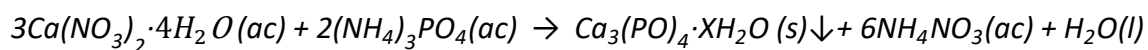
pH-metro empregáronse disolucións reguladoras técnicas CRISON. Unha vez estabilizado o pH procédese á mestura instantánea das disolucións con axitación a velocidade constante. Trabállase en todo momento a temperatura ambiente.

Nestas condicións obsérvase a formación dun precipitado de aspecto leitoso cunha relación molar Ca/P=1.5, que comunmente se denomina fosfato cálcico amorfo (ACP), precursor do β -TCP.



Figura 5. Aspecto do fosfato cálcico amorfo (ACP).

A reacción global do proceso é a seguinte:



Inmediatamente despois de concluír a mestura das disolucións procedemos ao filtrado do precipitado e ao seu lavado con auga destilada co obxectivo de levar o precipitado a pH neutro. Contrólase o pH das augas nai co pH-metro mencionado anteriormente.

Resérvase unha parte do xel de síntese mentres que a outra parte sométese a un proceso de calcinación para obter β -TCP cristalino.

3.1.2. *Proceso de calcinación do ACP*

Tal como se recolle ao comezo deste apartado, para a obtención de β -TCP mediante un proceso vía húmida é necesario sintetizar un precursor amorfo de estequiometría axeitada, de tal modo que ao calcinalo este cristalice e se transforme no β -TCP propiamente dito.

Nun estudo levado a cabo no ICG obtívose que a transformación do precursor amorfo en β -TCP iníciase a unha temperatura entre 600°C e 700°C e a 1000°C a cristalinidade é completa.¹³

Este proceso lévase a cabo nun forno eléctrico CHESA seguindo un ciclo térmico que consta de:

- Rampla de quecemento a 10°C/min ata 1000°C, meseta de 60 min
- Rampla de arrefriamento a 10°C/min ata Tª ambiente



Figura 6. Forno eléctrico CHESA.

3.1.3. *Proceso de moenda do β -TCP*

Unha vez calcinado o β -TCP hai que reducir o tamaño de partícula para poder procesalo posteriormente. Para este fin empregouse un muiño morteiro de ágata Retsch modelo RMO. Partindo dun material co aspecto que se mostra na figura 7-esquerda lévase a cabo unha moenda por espazo duns 30-40 min. Á saída do morteiro o material pasa por unha criba cunha luz de malla de $63\mu\text{m}$ e obtense po de β -TCP co aspecto que se observa na figura 7-dereita.

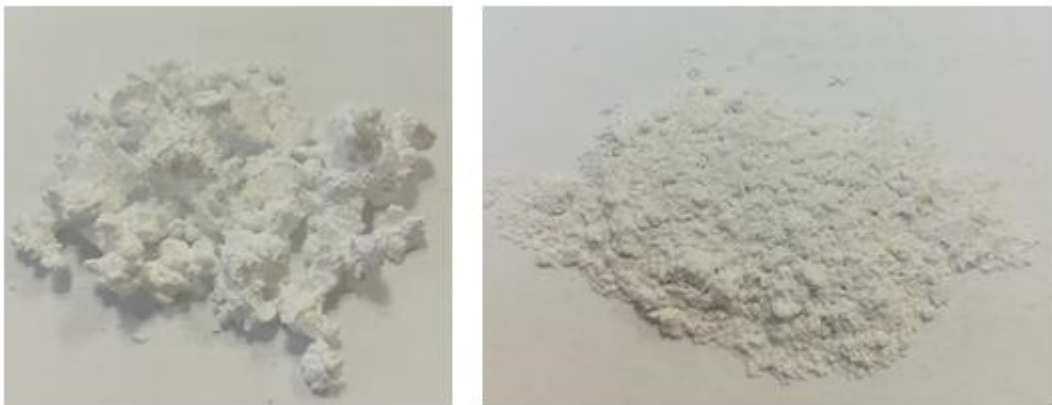


Figura 7. Á esquerda, imaxe na que se mostra o aspecto do β -TCP calcinado sen moer. Á dereita, imaxe do aspecto do β -TCP moído e cribado.

3.1.4. *Caracterización dos materiais de partida: ACP e β -TCP*

Para caracterizar os materiais de partida levouse unha análise granulométrica vía húmida (o fundamento da técnica explícase con maior detalle no apartado 3.4.2.).

Na figura 9 móstrase a análise granulométrica vía húmida do material calcinado a 1000°C . Pode observarse que este material mostra un tamaño medio de partícula de $1,72\mu\text{m}$ e o $\sim 100\%$ atópase por debaixo de $50\mu\text{m}$.

Para analizar o tamaño medio de partícula do material amorfo sen calcinar non é posible facelo vía húmida debido a que neste material as partículas atópanse formando un xel estable e no momento da análise non decantarían. Para ver o tamaño de partícula obsérvase o material mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) (o fundamento da técnica explícase con maior detalle no

apartado 3.4.4.). Obsérvase que o tamaño medio de partícula se atopa en torno a $0,03\mu\text{m}$.

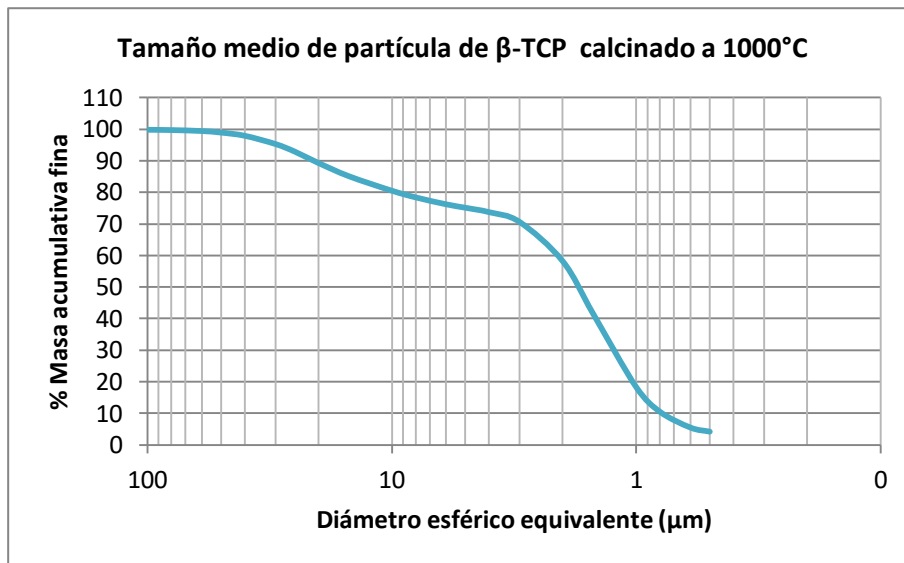


Figura 8. Granulometría vía húmida do β -TCP calcinado a 1000°C .

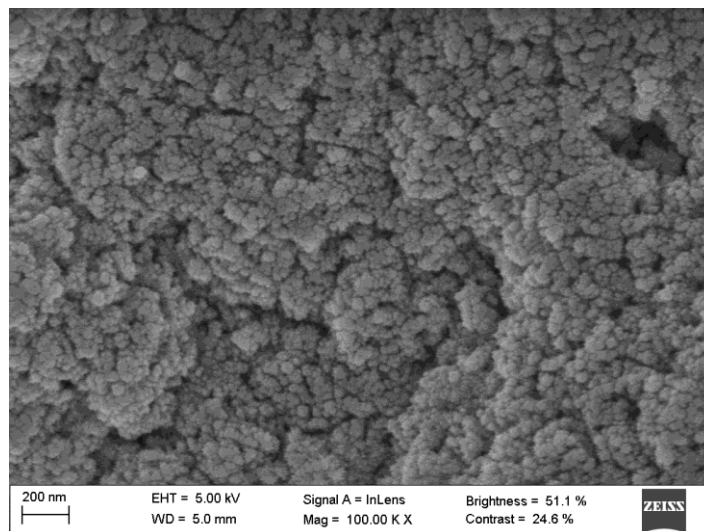


Figura 9. Micrografía FE-SEM do material amorfo (ACP).

3.2. Procesamento e obtención de materiais de β -TCP

Como materiais de partida temos o xel de síntese húmido que reservamos tras a obtención o ACP e temos o β -TCP calcinado a 1000°C . Neste punto podemos seguir dous camiños. Un deles é preparar materiais con β -TCP mentres que o outro camiño é

partir directamente do ACP filtrado, é dicir, traballar co xel de síntese húmido. Ademais, en ambos casos empregárase a metil celulosa como aditivo para xerar porosidade.

3.2.1. *Procesamento de materiais partindo de ACP sen aditivos.*

A obtención destes materiais consiste, simplemente, en tomar unha cantidade suficiente de ACP, introducilo nunha estufa a unha temperatura de 105°C para eliminar a humidade.

Na seguinte figura podemos observar un material de ACP con forma de pino; neste traballo non nos centramos en obter pezas cunha xeometría determinada, simplemente se fixo unha proba para observar a contracción sufrida tralo proceso de secado.



Figura 10. Imaxe dun material de ACP antes e despois do proceso de secado.

3.2.2. *Procesamento de materiais partindo de ACP e metil celulosa*

A metil celulosa (MC) (figura 11) é un polisacárido obtido a partir do tratamento da celulosa con cloruro de metilo en presenza de hidróxido sódico en disolución acuosa, nunha reacción na que os grupos hidroxilo do polímero de partida se substitúen por grupos metoxi. Poden prepararse diferentes tipos de MC segundo o grao de substitución.³²

Neste traballo empregamos a MC para inducir porosidade adicional. Isto ocorre porque ao eliminar este aditivo orgánico no proceso de cocción, o espazo ocupado pola metil celulosa tradúcese en poros.

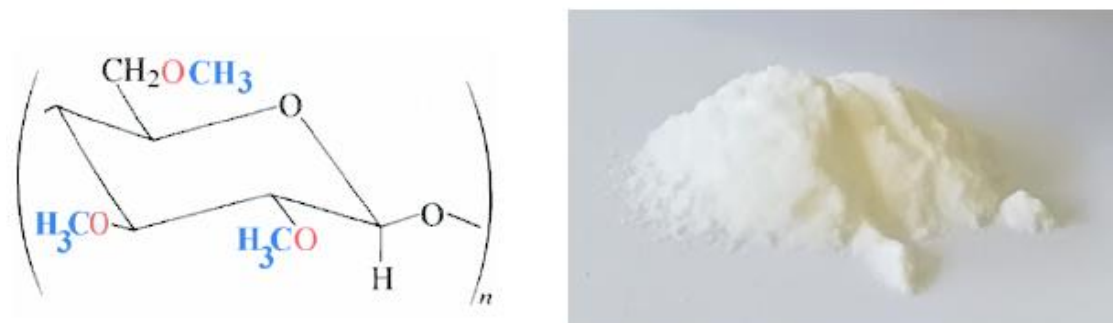


Figura 11. Estrutura e aparencia da metil celulosa.

Para obter estes materiais prepárase unha mestura de ACP e metil celulosa cunha cantidade suficiente de auga para preparar unha pasta facilmente manexable. A mestura prepárase de tal xeito que composición final sexa un 15% de metil celulosa e un 85% de sólidos. Secamos o material nunha estufa a 105°C.



Figura 12. Imaxe dun material de ACP e metil celulosa antes e despois do proceso de secado.

3.2.3. Procesamento de materiais partindo de β -TCP sen aditivos

Para preparar materiais de β -TCP sen aditivos procedemos dun xeito semellante ao caso anterior: sobre o β -TCP engadimos unha mestura de auga destilada cunha gota de dispersante Reotán (este actúa coma defloculante, evitando que se aglomeren as partículas). Sécase o material nunha estufa a 105°C.



Figura 13. Imaxe dun material de β -TCP sen aditivos despois do proceso de secado.

3.2.4. Procesamento de materiais partindo de β -TCP e metil celulosa

Para obter este tipo de pezas primeiro disolvemos a metil celulosa en auga destilada con dispersante Reotán. Sobre esta mestura engadimos o β -TCP. A composición final da peza conformada será 15% metil celulosa e 85% sólidos.



Figura 14. Imaxe dun material de β -TCP con metil celulosa antes e despois do proceso de secado.

3.3. Consolidación de materiais. Sinterización^{34,35,36}

Tal como se mencionou no apartado **1.4.** os produtos cerámicos adquiren as súas propiedades tras un tratamento térmico. Estábamos falando, pois, do proceso de **sinterización**. Propiedades coma a resistencia mecánica, porosidade e microestrutura son características finais do material froito do proceso de sinterización empregado.

A sinterización, tamén denominada cocción, é un proceso polo cal se produce a unión e, usualmente, densificación dun material cando se lle aplica un tratamento térmico a unha temperatura inferior ao seu punto de fusión.

A forza impulsora deste proceso é a diminución da enerxía libre do sistema debido a que durante a sinterización prodúcese unha redución da área superficial das partículas. Isto pode suceder por: (1) eliminación de interfaces e creación de áreas de borde gran, seguido por un crecemento de gran que conduce á *densificación* e/ou (2) redución da área superficial total por un incremento do tamaño promedio das partículas que conducen a un *engrosamento*.

Ambos mecanismos compiten. Se predomina a densificación, os poros fanse máis pequenos e tenden a desaparecer co tempo, a porosidade diminúe e a peza contrae. En cambio, se os procesos que conducen ao engrosamento son máis rápidos, os poros e grans fanse máis grandes co tempo.

A sinterización consta de tres etapas:

1. Inicial: crecemento das zonas de contacto ou “cuellos” entre as partículas. A peza comeza a contraer e a reducir a súa porosidade.
2. Intermedia: o tamaño de gran comeza a medrar e e a porosidade redúcese a canais de poros continuos. Nesta etapa prodúcese a maior parte da contracción mediante densificación.
3. Final: os canais de poros rompen e fórmanse poros illados.

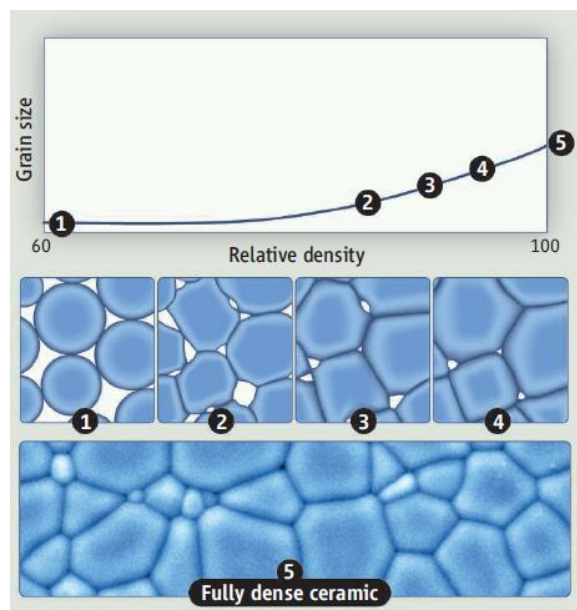


Figura 15. Evolución da estrutura interna durante a sinterización: (1) contacto inicial entre partículas, (2) crecemento de cuellos, (3) cierre de canais e aparición de poros, (4) densificación e contracción de poros, (5) estrutura totalmente densa.³⁷

A sinterización levouse a cabo nun forno de ascensor con plataforma móbil Termiber modelo Eutech Energitechnik AB. O ciclo térmico aplicado dependerá dos materiais de partida:

➤ Materiais con metil celulosa:

No caso destes materiais é necesario unha meseta a temperatura intermedia para a eliminación progresiva da metil celulosa. Así o ciclo constaría de:

- Rampla de quecemento a 2°C/min ata 500°C, meseta 60 min
- Rampla de quecemento a 5°C/min ata Tª de sinterización seleccionada, meseta de 60 min
- Rampla de arrefriamento a 10°C/min ata Tª ambiente

➤ Materiais sen metil celulosa: dada a súa ausencia prescínlese do paso de eliminación de aditivo orgánico.

- Rampla de quecemento a 5°C/min ata Tª de sinterización seleccionada, meseta de 60 min
- Rampla de arrefriamento a 10°C/min ata Tª ambiente

Para aqueles materiais preparados con xel de síntese ACP, as temperaturas de sinterización seleccionadas foron: 925°C, 950°C, 975°C, 1000°C, 1050°C e 1125°C.

Para aqueles materiais preparados con β -TCP, as temperaturas de sinterización seleccionadas foron: 925°C, 1000°C e 1125°C.



Figura 16. Forno ascensor con plataforma móvil Termiber.

3.4. Caracterización dos materiais de β -TCP

Neste apartado expone brevemente o fundamento das distintas técnicas analíticas empregadas na caracterización dos materiais de β -TCP obtidos.

3.4.1. Análise mineralóxica. Difracción de raios X de po (DRX)^{38,39}

Para a identificación de fases do β -TCP obtido a distintas temperaturas emprégase a técnica de difracción de raios X. Emprégase o método de po de Debye-Scherrer. É unha técnica rápida, cunha preparación de mostra sinxela. Para poder someter a mostra a esta análise debe moerse moi finamente unha pequena porción de xeito que pase polo tamiz con luz de $63\mu\text{m}$. O uso desta técnica é axeitado tanto para a análise cualitativa coma semicuantitativa das fases cristalinas presentes.

Os raios X ao incidir sobre unha mostra sofren distintos procesos dependendo de como se atopen dispostos os átomos que forman o material. Se a materia é amorfa, a radiación pode ser reflectida, transmitida ou desviada de xeito totalmente aleatorio debido á falta de orde dos átomos. Cando a substancia ten unha estrutura ordenada, parte dos raios X ademais de verse transmitidos ou reflectidos, poden sufrir un fenómeno de difracción.

Cando os raios X son difractados a través dunha estrutura cumpren a Lei de Bragg:

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

Onde “ $n\lambda$ ” son múltiplos da lonxitude de onda incidente, “ d_{hkl} ” é o espazado da familia de planos e “ θ ” é o ángulo formado entre o raio incidente, a familia de planos e o ángulos difractado.

O equipo empregado é un difractómetro Siemens modelo D-5000, empregándose a radiación $K_{\alpha 1}$ do Cu ($\lambda=1.5402\text{\AA}$), filtro de Ni e un monocromador secundario de grafito. Na táboa 6 recóllense os parámetros empregados para as análises de DRX realizadas.

Táboa 5. Parámetros fixados no difractómetro.

Intensidade	30 mA
Voltaxe	40 KV
Colimador de diverxencia	2 mm
Colimador de dispersión	2 mm
Colimador de detección	0.2 mm

O estudo dos difractogramas obtidos faise comparando os espectros de difracción das mostras cos patróns que posúe o propio equipo na súa base de datos, identificando así as fases cristalinas presentes.

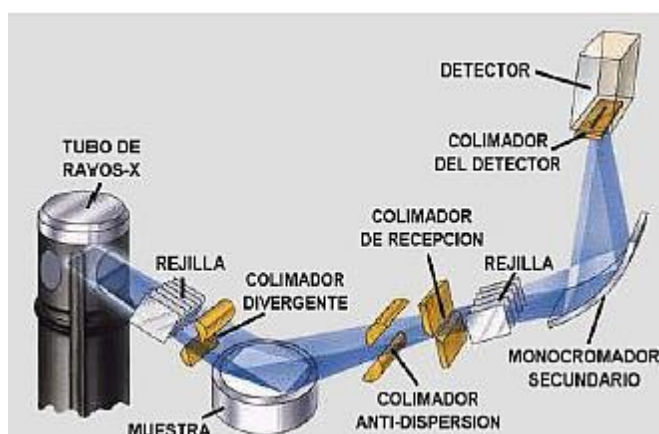


Figura 17. Esquema de funcionamento do difractómetro Siemens D-5000.¹³

3.4.2. Análise granulométrica vía húmida³⁸

Para a determinación do tamaño de partícula do po de β -TCP calcinado a 1000°C emprégase o equipo Micromeritics Sedigraph 5100. Este equipo traballa baseándose na Lei de Stokes [Ecuación 3], na cal calcúlanse as velocidades de sedimentación por gravidade das diferentes partículas en suspensión dun líquido de propiedades coñecidas.

$$u = \sqrt{\left(\frac{4D \cdot (\rho_s - \rho) \cdot g}{6\rho} \cdot \frac{1}{\Phi(\text{Re})} \right)} \quad [\text{Ecuación 3}]$$

Onde “u” é a velocidade de caída, “D” o diámetro esférico equivalente, “ ρ_s ” a densidade do sólido en suspensión, “ ρ ” a densidade do fluído, “g” a aceleración da gravidade e “ $\Phi(\text{Re})$ ” a función do número de Reynolds.

Segundo esta lei as partículas máis grandes caen máis rapidamente, mentres que as máis pequenas fano máis lentamente, ata que todas decantan no fondo deixando o medio sen partículas en suspensión. Como as diferentes partículas rara vez teñen unha forma regular, cada tamaño de partícula vén representado polo diámetro que tería unha esfera do mesmo material coa mesma velocidade gravitacional (“diámetro esférico equivalente”).

Procédese do seguinte xeito: introdúcese unha suspensión ben dispersada, empregando Reotán L como axente dispersante, do material do cal queremos determinar a súa distribución granulométrica no interior dunha cela a través da cal se fan pasar raios X (tal como se observa na figura 18). A cela sitúase de maneira que un feixe colimado de baixa enerxía de raios X incida na súa parte superior. A cela descende cunha velocidade proporcional á densidade do material e á densidade do medio. A distribución das partículas nas diferentes zonas da cela afecta ao número de pulsos de raios X que chegan ao receptor e esta é proporcional á densidade do medio, do material e ao diámetro esférico equivalente. O número de contas detectado emprégase para calcular a distribución e a porcentaxe de partículas cun diámetro dado. As partículas que se analizan deben ser máis densas e máis absorbentes ca o líquido no que están dispersas.

O sistema determina a distribución de partículas dentro dun rango comprendido entre $100\mu\text{m}$ e $0.1\mu\text{m}$. Non obstante, no caso de existir partículas fóra deste rango, mostraríanse coma porcentaxe acumulada.

Tal como se observa na figura 18, o detector e o xerador de raios X son fixos, mentres que a cela ten un movemento vertical.

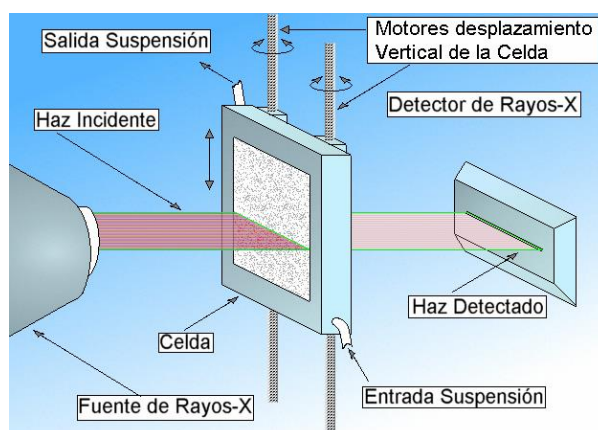


Figura 18. Esquema básico do equipo Micromeritics Sedigraph 5100.¹³

3.4.3. Porosimetría de mercurio^{10,40}

Para determinar o diámetro de poro así como a distribución total de tamaños de poro das distintas pezas de β -TCP obtidas emprégase a porosimetría por inxección de mercurio.

Trátase dunha técnica ben establecida para a caracterización de materiais porosos. É unha análise rápida, sinxela, fiable, de amplo alcance e, polo tanto, ideal para aplicacións industriais e de investigación por igual; como inconveniente hai que dicir que é un ensaio irreversible xa que a mostra ao estar contaminada con mercurio non se recupera. Consiste na aplicación de presión para forzar a entrada do mercurio no entramado poroso do sólido.

Baséase nos fenómenos de capilaridade xerados polos líquidos que non mollan os sólidos cos que están en contacto. De acordo coa ecuación de Washburn (1921), que se amosa a continuación, un líquido coma o mercurio que non penetra espontaneamente nos condutos capilares, precisa unha presión (P) que é inversamente proporcional ao radio dos poros (r) que poden encherse:

$$P=(2 \sigma \cos \alpha)/r \quad [Ecuación 4]$$

Onde “ σ ” é a tensión superficial do mercurio e “ α ” o ángulo de contacto sólido-líquido.

Mediante esta técnica mídese a porosidade aberta (π), que é a porosidade accesible á intrusión de mercurio e vén dada pola Ecuación 4, onde $V_{intrusión}$ é o volume de intrusión total de mercurio e $V_{andamio}$ é o volume do andamio:

$$\pi = \frac{V_{intrusión}}{V_{andamio}} \quad [Ecuación 5]$$

A porosidade cerrada (ϖ), porosidade non accesible ao mercurio, pode determinarse como:

$$\varpi = \Pi - \pi \quad [Ecuación 6]$$

Onde Π é a densidade total da estrutura porosa e pode calcularse como:

$$\Pi = 1 - \frac{\rho_{andamio}}{\rho_{material}} \quad [Ecuación 7]$$

Onde $\rho_{andamio}$ é a densidade aparente da estrutura porosa (denominada andami) e $\rho_{material}$ é a densidade real do material co que está fabricado o andamio.

Para levar a cabo as porosimetrías de mercurio empregouse un porosímetro AUTOPORE II 9215 (Figura 19), o cal está asociado a un ordenador para a recollida e tratamento de datos. A análise lévase a cabo en dúas etapas, a primeira a baixa presión (acádanse os 30 psia (2 atm aproximadamente)), na que o mercurio soamente penetra nos poros grandes. A segunda etapa, a de alta presión (ata 60000 psia (4082 atm aproximadamente)) o mercurio penetra nos poros máis pequenos. Finalmente, os datos de volume de mercurio, tanto en baixa como en alta presión, represéntanse nunha gráfica relacionando o diámetro de poro co volume de intrusión.

Dado que se traballa con mercurio e este é un material perigoso, é necesario seguir con rigorosidade as normas de seguridade.

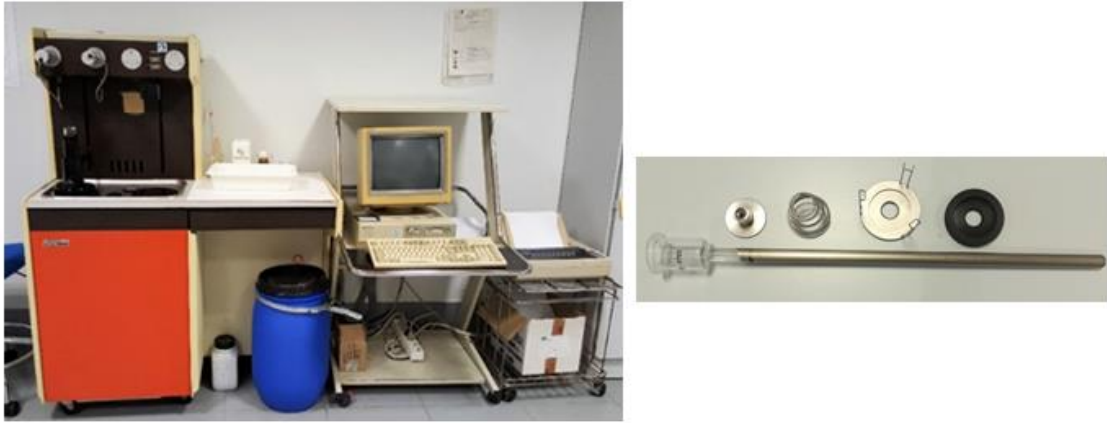


Figura 19. Á esquerda imaxe do porosímetro AUTOPORE II 9215 empregado. Á dereita imaxe do penetrómetro en detalle.

3.4.4. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)³⁵

A microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM polas súas siglas en inglés, “Field Emission Scanning Electron Microscope”) é unha técnica de análise de todo tipo de materiais, que mediante o recorrido a modo de barrido dun feixe moi fino de electróns sobre a superficie das mostras, permítenos observar a microestrutura e a superficie de fractura dos materiais sinterizados así como a súa morfoloxía.

O feixe de electróns empregado para “iluminar” as mostras pasa a través das lentes condensadoras e de obxectivo e é dirixido ao longo da mostra polas bobinas de barrido, mentres que un detector conta o número de electróns secundarios de baixa enerxía emitidos por cada punto da superficie. Ao mesmo tempo emprégase un un foco dun tubo de raios catódicos para proporcionar contraste á imaxe. A fenomenoloxía na que se fundamenta esta técnica reside en que, no momento no que os electróns chocan contra unha mostra sólida, prodúcese varios tipos de radiacións dos cales os máis importante na MEB son: (1) electróns secundarios que son aqueles emitidos pola mostra debido á colisión do feixe de electróns incidente e son os que nos dan información da superficie da mostra e (2) electróns retrodifundidos cuxa intensidade é proporcional ao número atómico e son empregados para a discriminación de fases existentes dentro do material observado.

Antes da súa observación, as mostras non conductoras coma o β -TCP recóbrese cunha capa nanométrica de ouro por evaporación en baleiro (metalización). O microscopio electrónico de barrido con emisión de campo empregado foi un microscopio ZEISS FE-SEM ULTRA Plus con EDX.



Figura 20. Microscopio FE-SEM ULTRA Plus con EDX.

IV. RESULTADOS E DISCUSIÓN

4.1. Influencia do tratamento térmico

Neste apartado estudamos de modo cualitativo a evolución do material amorfo ata que alcanza a súa cristalinidade a distintas temperaturas de sinterización.

Na figura 21 preséntanse os difractogramas de 6 pezas sinterizadas a 925°C, 950°C, 975°C, 1000°C, 1050°C e 1125°C así como do precursor amorfo ACP.

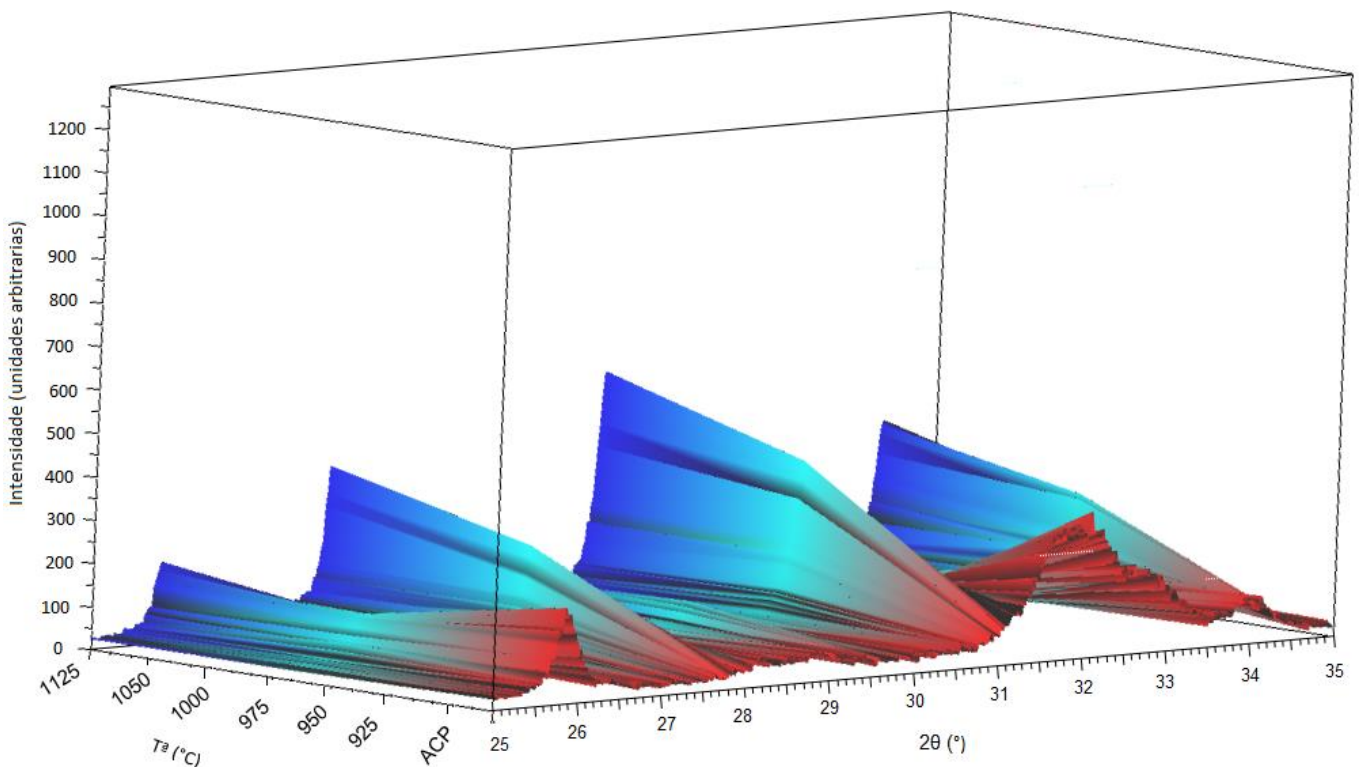


Figura 21. Difractogramas do ACP e dos materiais sinterizados a diferentes temperaturas.

A difracción de raios X do ACP secado a 105°C non presenta picos definidos senón que mostra ombreiros anchos propios da natureza amorfa do material.

Nos difractogramas correspondentes ás 6 pezas sinterizadas a 925°C, 950°C, 975°C, 1000°C, 1050°C e 1125°C obsérvase a aparición de 4 picos ben definidos correspondentes á estrutura cristalina do β -TCP. En ningún dos casos se observan picos correspondentes a fases de secundarias de HA ou C2P. Ademais, o difractograma pon

de manifesto que a medida que aumenta a temperatura de sinterización o grao de cristalinidade do β -TCP é maior (picos cada vez máis estreitos e intensos).

4.2. Estudo da porosidade

Neste apartado expóñense o resultados extraídos das porosimetrías de mercurio levadas a cabo para cada unha das pezas. En concreto interésanos coñecer a evolución da porosidade atendendo a:

- i. Material de partida: β -TCP calcinado a 1000°C ou xel de síntese ACP.
- ii. Temperatura de sinterización.
- iii. Emprego de aditivos (metil celulosa).

4.2.1. Porosidade dos materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos

A continuación amósase na figura 22 a evolución da porosidade en función da temperatura de sinterización para materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos.

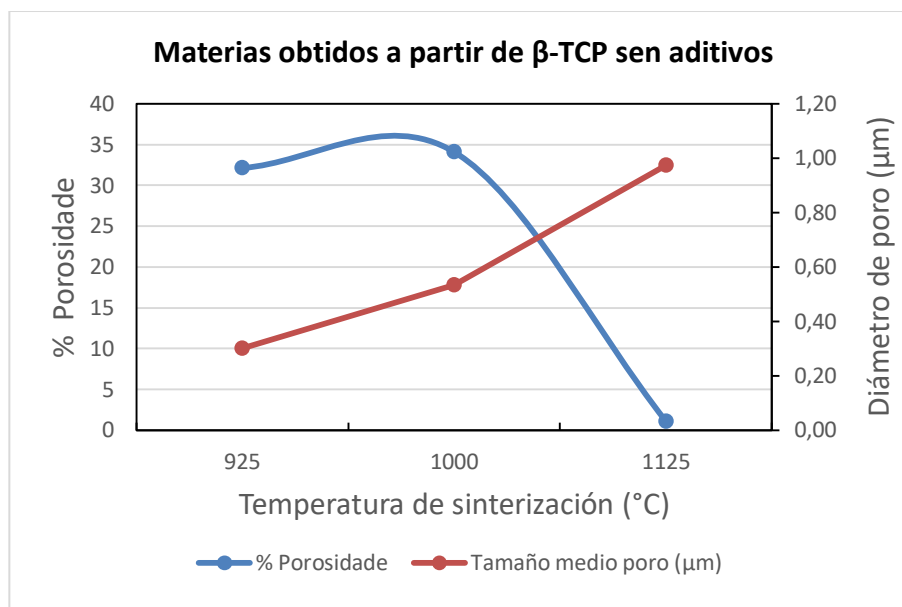


Figura 22. Evolución da porosidade ca temperatura de sinterización para materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos.

Como se pode observar, a medida que aumenta a temperatura de sinterización diminúe a porosidade total do material mentres que o tamaño de poro aumenta. O material contrae e os poros máis pequenos pechan dando lugar a unha diminución da

porosidade aberta chegando a valores de 1.1% para 1125°C. Sen embargo o tamaño medio de poro aumenta por coalescencia dos poros máis próximos.

4.2.2. Porosidade dos materiais obtidos a partir de β -TCP con metil celulosa

Na figura 23 móstrase a evolución da porosidade en función da temperatura de sinterización para materiais obtidos a partir de β -TCP e metil celulosa.

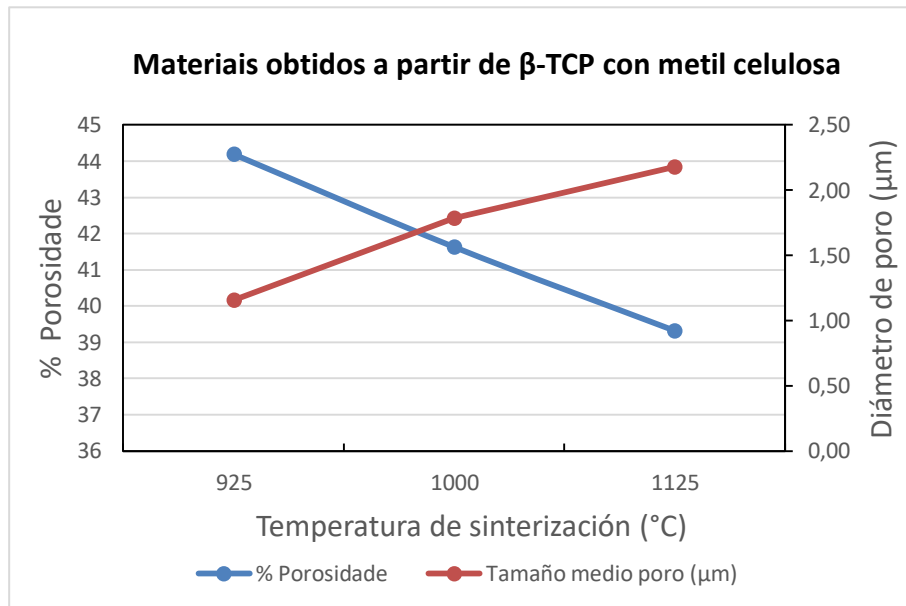


Figura 23. Evolución da porosidade ca temperatura de sinterización para materiais obtidos a partir de β -TCP con metil celulosa.

Como se pode ver, a medida que aumenta a temperatura, diminúe a porosidade e aumenta o tamaño de poro. Isto é debido ao aumento do tamaño de gran e á coalescencia dos poros.

Para os materiais con metil celulosa o tamaño medio de poro non é representativo. Co obxectivo de comprender mellor o que experimentan estes materiais co aumento da temperatura de sinterización botamos man da gráfica de distribución de tamaño de poro que se amosa na figura 24.

Observamos que presentan unha distribución bimodal e isto é debido debido a que no material nos atopamos con dous tipos de poros: aqueles poros máis grandes xerados pola metil celulosa e os nanoporos xerados polo propio proceso de sinterización.

A medida que aumenta a temperatura de sinterización a curva desprázase cara a esquerda, é dicir, os poros máis pequenos desaparecen ben porque co aumento da temperatura a peza contrae e os poros péchanse ou ben porque coalescen os poros pequenos próximos dando lugar a poros maiores.

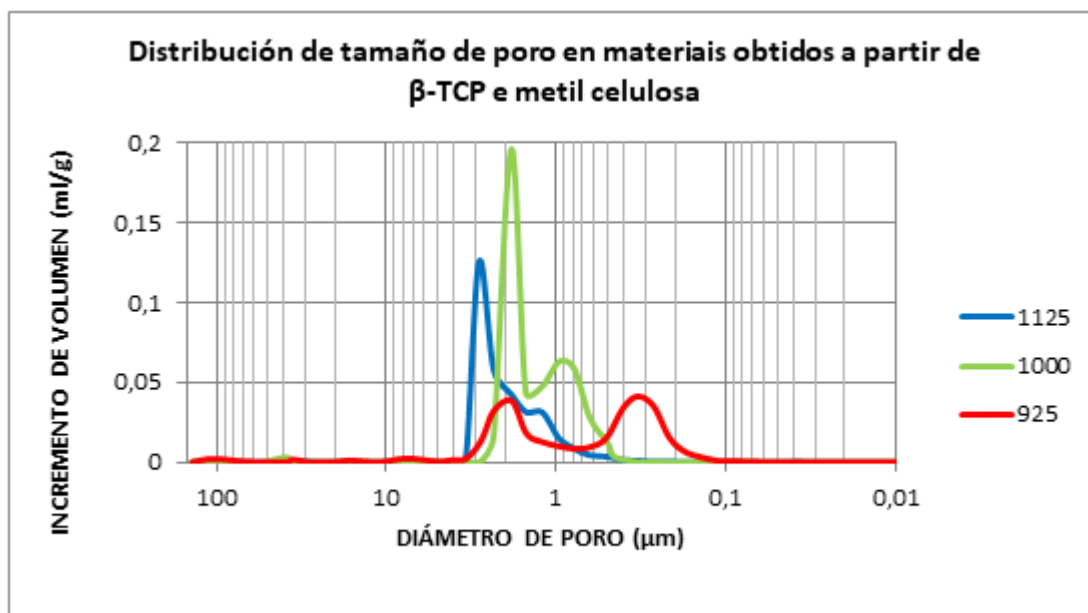


Figura 24. Distribución de tamaño de poro de materiais obtidos a partir de β -TCP e metil celulosa.

4.2.3. Porosidade dos materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos

Na figura 25 pódese ver a evolución da porosidade de materias fabricados a partir de xel húmido de síntese sen aditivos. Da gráfica extraemos que o aumento da temperatura de sinterización provoca unha diminución da porosidade do material mentres que o tamaño de poro aumenta ata chegar a un punto no cal deixa de aumentar e cae drasticamente. Isto é debido a que durante o proceso de sinterización os poros péchanse, e de haber porosidade, en todo caso sería pechada, é dicir son poros illados que non poden ser medidos por porosimetría de mercurio.

Por outra banda o tamaño dos poros aumenta coa temperatura ata 1000°C, a partir de aí o tamaño de poro diminúe coa temperatura debido ó aumento do tamaño de gran.

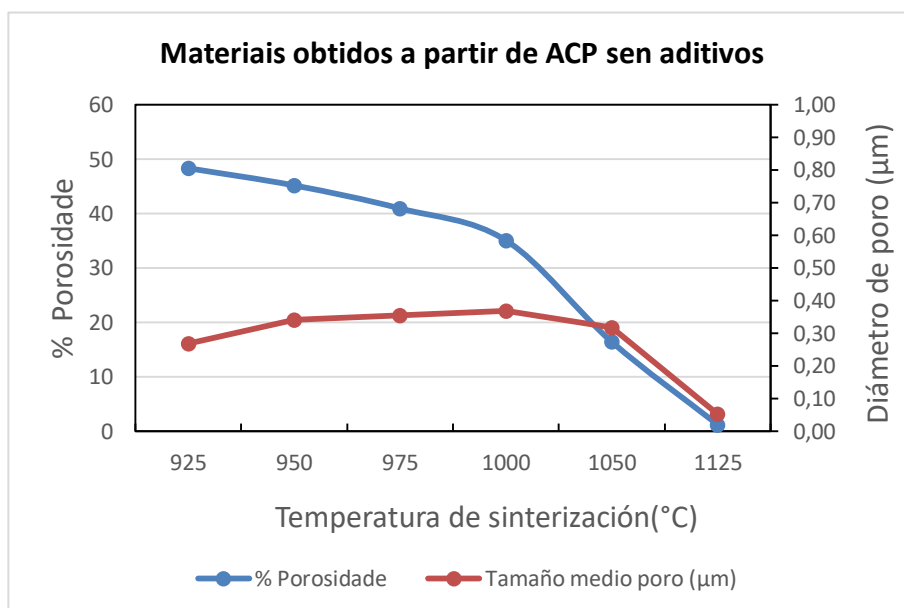


Figura 25. Evolución da porosidade ca temperatura de sinterización para materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos

4.2.4. Porosidade dos materiais obtidos a partir de ACP con metil celulosa

Na figura 26 podemos ver como evoluciona a porosidade ca temperatura de sinterización de materiais obtidos a partir de ACP con metil celulosa.

De igual xeito ca no caso anterior, o aumento da temperatura de sinterización leva a unha caída da porosidade do material e a un aumento do tamaño de poro. Sen embargo, podemos apreciar que a diferenza do ACP sen aditivos, aquí a porosidade non pecha por completo debido ao emprego de metil celulosa.

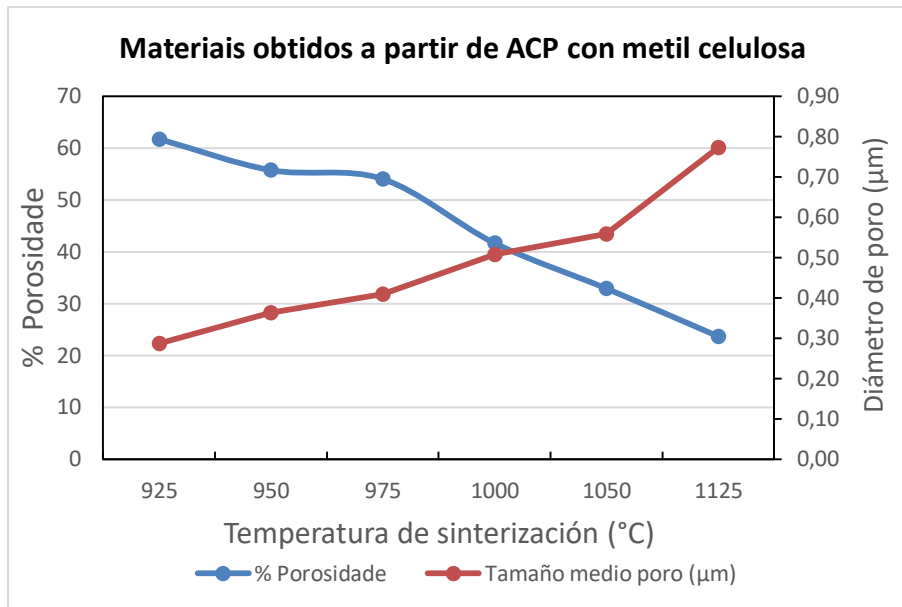


Figura 26. Evolución da porosidade ca temperatura de sinterización para materiais obtidos a partir de ACP con metil celulosa.

Tal como se observa na figura 27, de igual xeito ca no caso anterior, o emprego de metil celulosa fai a distribución de tamaño de poro teña carácter bimodal. Vemos que as curvas se van desprazando á esquerda debido a que o tamaño medio de poro aumenta.

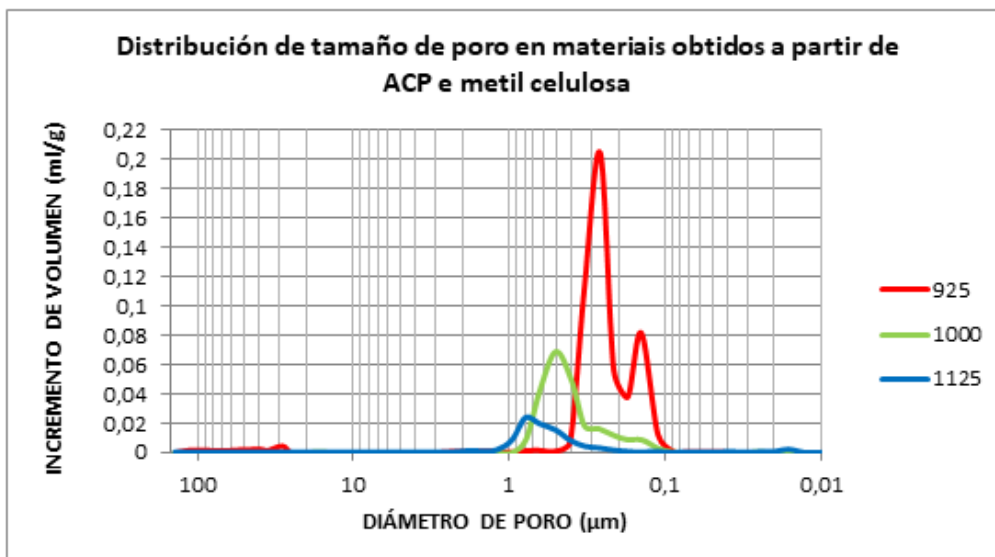


Figura 27. Distribución de tamaño de poro de materiais obtidos a partir de ACP e metil celulosa.

4.3. Estudo da microestrutura

4.3.1. Materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos

Na figura 28 obsérvanse as micrografía FE-SEM correspondentes ao materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos. Como se pode ver, prodúcese un aumento do tamaño de gran ca temperatura dende $0.84\mu\text{m}$ ata $2.45\mu\text{m}$ aproximadamente. De igual xeito o tamaño de poro aumenta ata que se completa o proceso de sinterización.

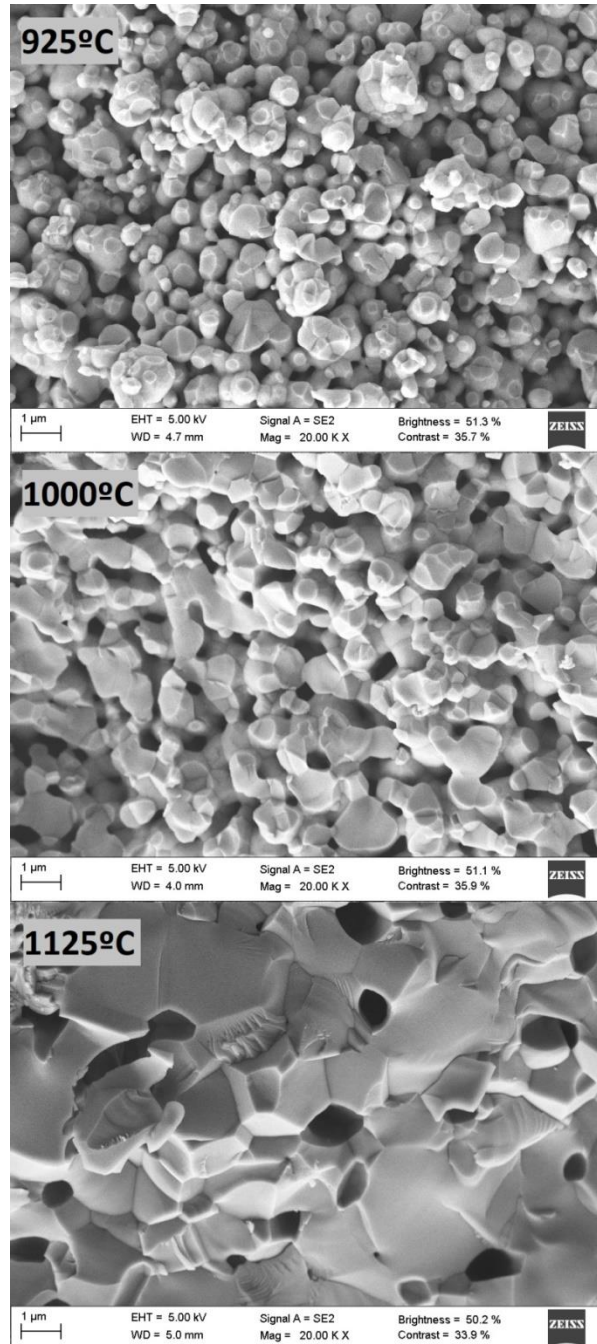


Figura 28. Micrografía FE-SEM de materiais obtidos a partir de β -TCP sen aditivos a distintas temperaturas.

4.3.2. Materiais obtidos a partir de β -TCP e metil celulosa

A continuación móstrase na figura 29 as micrografía FE-SEM correspondentes cos materiais obtidos a partir de β -TCP e metil celulosa. Observamos que o tamaño de gran aumenta a medida que aumenta a temperatura de 1.10 μ m ata 1.98 μ m aproximadamente. O tamaño de poro tamén aumenta ca temperatura.

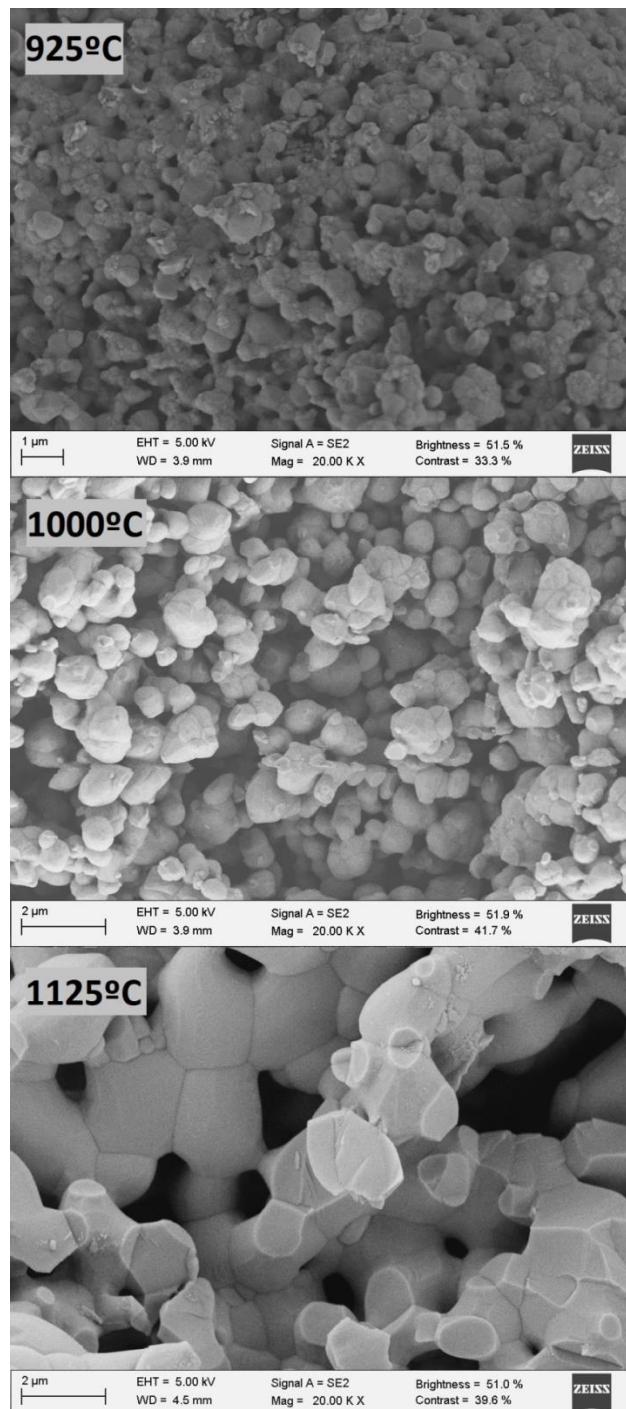


Figura 29. Micrografía FE-SEM de materiais obtidos a partir de β -TCP e metil celulosa a distintas temperaturas.

4.3.3. Materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos

Na figura 30 veñen recollidas as micrografías FE-SEM correspondentes a materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos. Observamos que a medida que aumenta a temperatura de sinterización o tamaño de gran aumenta dende $0.58\mu\text{m}$ ata $1.62\mu\text{m}$ aproximadamente. O tamaño de poro tamén aumenta ca temperatura, sen embargo vemos que a partir de 1000°C diminúe, isto é debido a que se produce coalescencia de gran e poros. Como se pode ver, a 1125°C prodúcese unha densificación total do material, non hai presenza de poros. Tamén extraemos destas micrografías que a medida que se completa o proceso de sinterización tamén cambia a morfoloxía dos poros, vólvense máis redondeados.

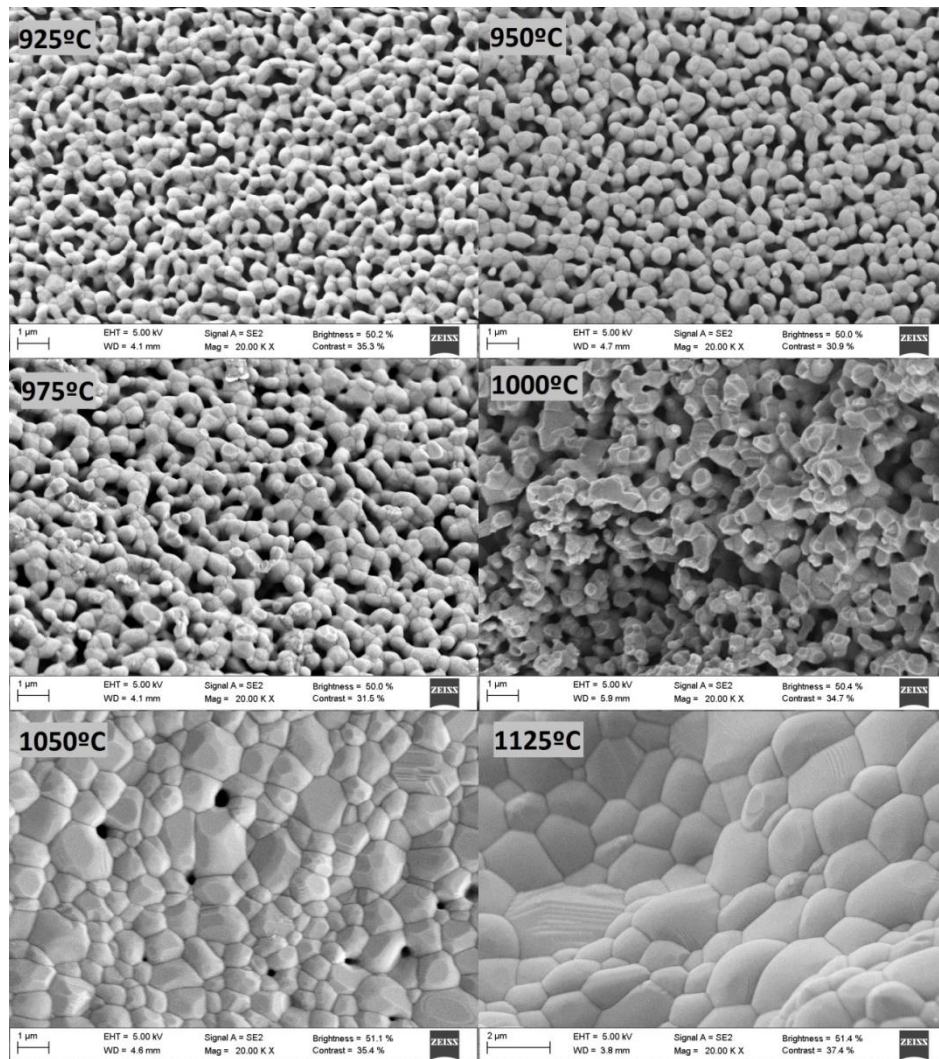


Figura 30. Micrografías FE-SEM de materiais obtidos a partir de ACP sen aditivos a distintas temperaturas.

4.3.4. Materiais obtidos a partir de ACP e metil celulosa

Na figura 31 podemos ver as micrografías FE-SEM de materiais obtidos a partir de ACP e metil celulosa. Observamos que a medida que aumenta a temperatura de sinterización o tamaño de gran aumenta dende 0.23 μm ata 2.01 μm aproximadamente. O tamaño de poro tamén aumenta e a diferenza do que ocurría no caso anterior, agora o material non densifica por completo debido á metil celulosa, que provoca que queden poros illados.

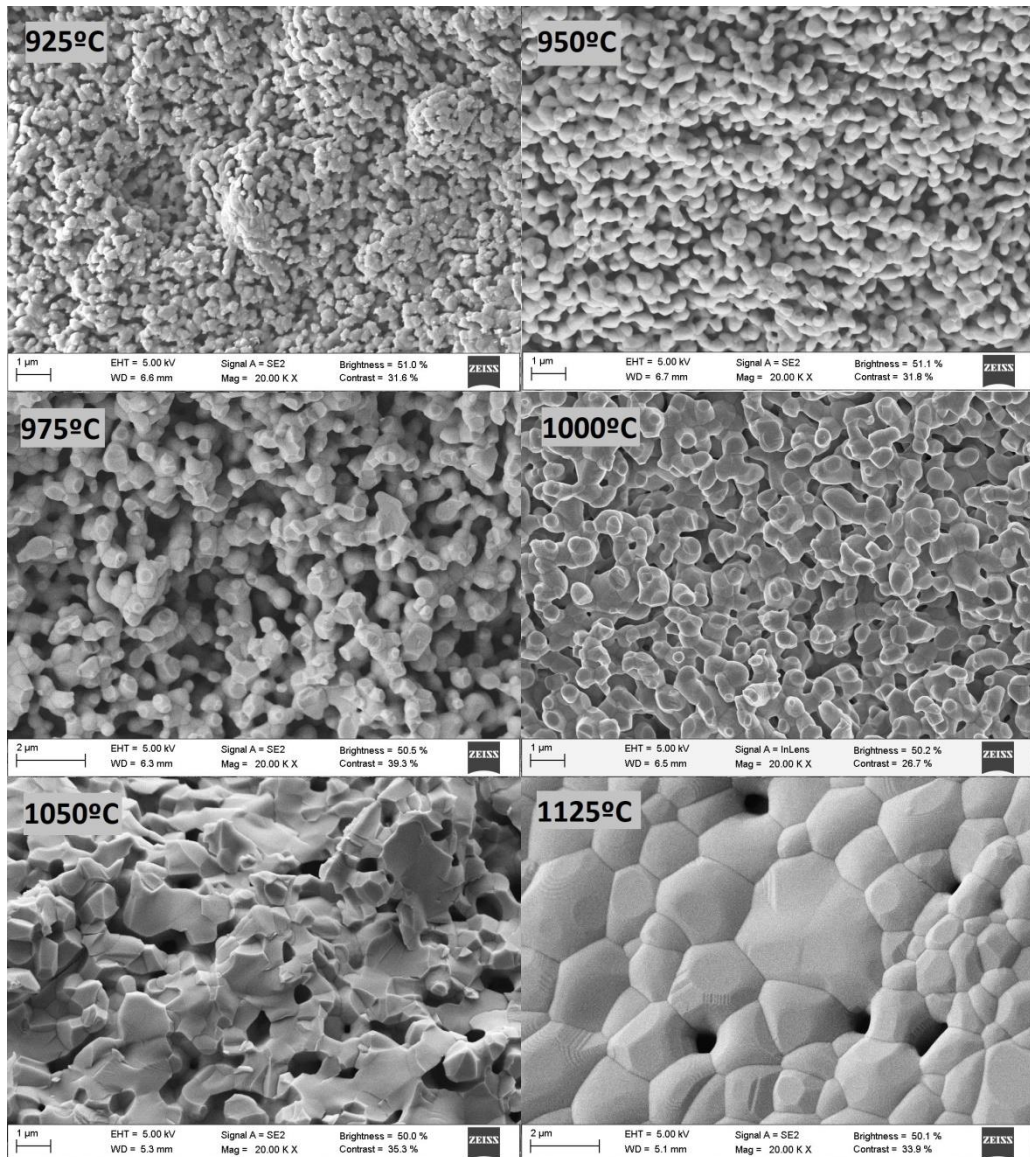


Figura 31. Micrografías FE-SEM de materiais obtidos a partir de ACP e metil celulosa a distintas temperaturas.

V. RESUMO E CONCLUSIÓNS

Neste traballo levouse a cabo un estudo sobre a influencia de determinados factores na porosidade dos materiais. A análise dos resultados obtidos permitiu extraer as seguintes conclusións:

- ✓ En base aos resultados da análise por difracción de raios X dos materiais concluímos que se obtén β -TCP puro a partir da síntese descrita.
- ✓ Os materiais procesados a partir de β -TCP sen metil celulosa varían o tamaño de poro dende 301nm ata 534nm ás temperaturas de sinterización de 925°C e 1000°C respectivamente ao mesmo tempo que a porcentaxe de poros diminúe. A 1125°C a porosidade é pechada.
- ✓ Para os materiais procesados a partir de ACP sen aditivos observamos que o tamaño de poro varía entre 269nm e 318nm ás temperaturas de sinterización de 925°C e 1050°C respectivamente. O volume de poros diminúe ata que a 1125°C non hai poros abertos.
- ✓ No caso dos materiais obtidos a partir de β -TCP con metil celulosa o tamaño de poro atópase entre 1159nm e 2179nm para as temperaturas de sinterización de 925°C e 1125°C respectivamente. Sen embargo a porcentaxe de poros diminúe.
- ✓ En canto aos materiais que se obteñen partindo de ACP e metil celulosa obtemos tamaños de poro entre 286nm e 772nm ás temperaturas de sinterización de 925°C e 1125°C respectivamente. Pola contra, o volume de poros diminúe a medida que aumenta a temperatura.
- ✓ En ambos casos os materiais que se procesan con metil celulosa teñen tamaños de poro medio maiores e maior porcentaxe de poros. A distribución de poros é bimodal a baixas temperaturas e a medida que a temperatura de sinterización aumenta os poros vanse pechando e a distribución torna en monomodal.
- ✓ Co aumento da temperatura de sinterización aumenta o tamaño de gran dos materiais ao mesmo tempo que cambia a morfoloxía dos poros (redondéanse).
- ✓ Finalmente, concluímos que aqueles materiais procesados a partir de ACP sen aditivos sinterizados a 925°C son os que nos proporcionan o menor tamaño de poro (286nm).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre la influencia de determinados factores en la porosidad de los materiales. El análisis de los resultados obtenidos nos ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

- ✓ En base a los resultados del análisis por difracción de rayos X de los materiales concluimos que se obtiene β -TCP puro a partir de la síntesis descrita.
- ✓ Los materiales procesados a partir de β -TCP sin metil celulosa varían el tamaño de poro desde 301nm hasta 534nm a las temperaturas de sinterización de 925°C e 1000°C respectivamente al mismo tiempo que el porcentaje de poros disminuye. A 1125°C la porosidad es cerrada.
- ✓ Para los materiales procesados a partir de ACP sin aditivos observamos que el tamaño de poro varía entre 269nm y 318nm a las temperaturas de sinterización de 925°C y 1050°C respectivamente. El volumen de poros disminuye hasta que a 1125°C no hay poros abiertos.
- ✓ En el caso de los materiales obtenidos a partir de β -TCP con metil celulosa el tamaño de poro se encuentra entre 1159nm y 2179nm para las temperaturas de sinterización de 925°C y 1125°C respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de poros disminuye.
- ✓ En cuanto a los materiales que se obtienen partiendo de ACP y metil celulosa obtenemos tamaños de poro entre 286nm y 772nm a las temperaturas de sinterización de 925°C y 1125°C respectivamente. Por el contrario, el volumen de poros disminuye a medida que aumenta la temperatura.
- ✓ En ambos casos los materiales que se procesan con metil celulosa tienen tamaños de poro medio mayores y mayor porosidad. La distribución de poros es bimodal a bajas temperaturas y a medida que la temperatura de sinterización aumenta los poros se van cerrando y la distribución torna en monomodal.
- ✓ Con el aumento de la temperatura de sinterización aumenta el tamaño de grano de los materiales al mismo tiempo que cambia la morfología de los poros (se redondean).
- ✓ Finalmente, concluimos que aquellos materiales procesados a partir de ACP sin aditivos sinterizadas a 925°C son los que nos proporcionan el menor tamaño de poro (286nm).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In this work, a study on the influence of certain factors on the porosity of materials has been carried out. The analysis of the results obtained has allowed us to draw the following conclusions:

- ✓ Based on the results of the X-ray diffraction analysis of the materials, we conclude that pure β -TCP is obtained from the described synthesis.
- ✓ Materials processed from β -TCP without methyl cellulose vary the pore size from 301 nm to 534 nm at the sintering temperatures of 925°C and 1000°C respectively at the same time the percentage of pores decreases. At 1125°C the porosity is closed.
- ✓ For the materials processed from ACP without additives we observed that the pore size varies between 269nm and 318nm at the sintering temperatures of 925°C and 1050°C respectively. The pore volume decreases until at 1125°C there are no open pores.
- ✓ In the case of materials obtained from β -TCP with methyl cellulose, the pore size is between 1159 nm and 2179 nm for the sintering temperatures of 925°C and 1125°C respectively. However, the percentage of pores decreases.
- ✓ Regarding the materials that are obtained starting from ACP and methyl cellulose, we obtain pore sizes between 286nm and 772nm at the sintering temperatures of 925°C and 1125°C respectively. On the contrary, the pore volume decreases as the temperature increases.
- ✓ In both cases the materials that are processed with methyl cellulose have larger average pore sizes and higher porosity. The pore distribution is bimodal at low temperatures and as the sintering temperature increases the pores are closed and the distribution becomes monomodal.
- ✓ With the increase of the sintering temperature the grain size of the materials increases at the same time as the morphology of the pores changes (they become round).
- ✓ Finally, we conclude that those materials processed from ACP without additives sintered at 925°C are those that provide the smallest pore size (286nm).

BIBLIOGRAFÍA

1. CALLISTER, W. Introducción. En: *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los materiales*. Barcelona: Reverté; 1995; pp. 1-6. ISBN 8429172548
2. DIMITRIOU, R., JONES, E., MCGONAGLE, D., GIANNOUDIS, P.V. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Medicine* [en liña]. 2011 May; **9**(66). [data de consulta 10 Xaneiro 2019]. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0765-x>
3. MALLICK, K. K., WINNETT, J. 3D Bioceramic Foams for Bone Tissue Engineering. En: *Bone Substitute Biomaterials*. Elsevier, 2014; pp. 118-141 ISBN 978-0-85709-497-1 <https://doi.org/10.1533/9780857099037.2.118>
4. TORTORA G.J., DERRICKSON B. *Principios de anatomía y fisiología*. 15ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2015.
5. TESTUT, L, LATARJET, A. *Anatomía Humana*, 9ª Ed. Barcelona: Salvat, 1978.
6. LIM, H., et al. Effectiveness of Biphasic Calcium Phosphate Block Bone Substitutes Processed using a Modified Extrusion Method in Rabbit Calvarial Defects. *Journal of Periodontal & Implant Science* [en liña]. 2015 Abr; **45**(2); pp. 46-55. [data de consulta 10 Xaneiro 2019]. <https://doi.org/10.5051/jpis.2015.45.2.46>
7. KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. En: *Biomaterials*. **26**(27). Elsevier, 2005; pp. 5474-5491 ISSN 0142-9612 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
8. KUBOKI, Y., et al. BMP-Induced Osteogenesis on the Surface of Hydroxyapatite with Geometrically Feasible and Nonfeasible Structures: Topology of Osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research* [en liña]. 1998 Feb; **39**(2); pp. 190-199. [data de consulta 15 Xaneiro 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457547>
9. CANILLAS, M., PENA, P., H de AZA, A., A RODRIGUEZ, M. Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2017 Xuñ; **56**(3); pp. 91-112.
10. PEREZ, R., MESTRES, G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. *Materials Science & Engineering C* [en liña]. 2016 Abr; **61**. pp. 922-939. [data de consulta 10 Xaneiro 2019]. ISSN 0928-4931. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.087>
11. WILLIAMS, DF. The *Williams Dictionary of Biomaterials* [Internet]. Liverpool: Liverpool University Press; 2011 [data de consulta]. Disponible en: <http://universitypublishingonline.org/ref/id/liverpool/CBO9781846314438>
12. VALLET, M., MUNUERA, L. *Biomateriales aquí y ahora*. Madrid: Dykinson; 2000. ISBN 8481556750, 9788481556759
13. FRANCO, J. *Síntesis y procesamiento de "Beta"-TCP para a fabricación de implantes*. Santiago de Compostela: 2004.

14. ANANTH, H., KUNDAPUR, V., MOHAMMED, H.S., ANAND, M., AMARNATH, G.S., MANKAR, S. A Review on Biomaterials in Dental Implantology. *International Journal of Biomedical Science* [en liña]. 2015 Set; **11**(3); pp 113-120. [data de consulta 17 Xaneiro 2019]. Dispoñible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26508905>
15. VALLET, M. *Biomateriales*. Madrid: CSIC; 2013. ISBN 978-84-00-09756-1
16. KINGERY, W. D., BOWEN, H. K., UHLMANN, D. R. *Introduction to ceramics*. Nueva York: Wiley; 1976. ISBN 0471478601
17. PHILLIPS, G. *A Concise Introduction to Ceramics*. Nueva York: Springer Science & Business Media; 2012. ISBN 9789401169738
18. VALLET, M. Ceramics for Medical Applications. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* [en liña]. 2001 Xan; **0**; pp 97-108. [data de consulta 17 Xaneiro 2019]. DOI: 10.1039/b007852m
19. HENCH, L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* [en liña]. 2005 Xan; **81**(7); pp 1705-1728. [data de consulta 9 Xaneiro 2019]. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x>
20. Magnapplus. *Biocerámicas* [internet] [data de consulta 9 Xaneiro 2019]. Dispoñible en: <http://florentinoameghino.magnapplus.org/articulo/-/articulo/AD15085/bioceramicas>
21. SÁENZ, A. Biomateriales. *Tecnología En Marcha*. 2004; **17**(1); pp. 34-45. ISSN 0379-3962
22. PINA, S, REIS, R.L., OLIVEIRA, J.M. Ceramic biomaterials for tissue engineering. En: THOMAS, S., BALAKRISHNAN, P., SREEKALA, M.S. *Fundamental Biomaterials: Ceramics*. Elsevier; 2018; pp 95-116. ISBN 9780081022047
23. DOROZHKIN, S.V. A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950. *Materials Science and Engineering: C* [en liña]. 2013 Ago; **33**(1); pp 3085-3110. [data de consulta 11 Xaneiro 2019]. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.002>
24. DOROZHKIN SV, EPPEL M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angew Chem Int. Ed.* 2002 Set; **41**(17):3130-3146.
25. KOVACH, I, KOSMELLA, S, PRIETZEL, C, BAGDAHN, C, KOETZ, J. Nano-porous calcium phosphate balls. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2015) <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.021>
26. LEGEROS RZ, LEGEROS JP. Calcium phosphate bioceramics: past, present, future. *Key Eng Mater* (2003); vols 240-242; pp 3-10.
27. FRANCO, J, SOUTO, A, REY, P, GUITIÁN, F, MARTÍNEZ, A. Procesamiento cerámico de β -TCP para la fabricación de piezas implantables. *Bol Soc Esp Cerámica Vidr.* 2006 Ago; **45**(4); pp 265-70.
28. MASSIT, A, EL YACOUBI, CHAFIK, B, YAMNI, K. Synthesis and characterization of nano-sized β Tricalcium phosphate: Effects of the aging time. *Journal of Applied Chemistry*. 2014, **7**(7); pp 57-61.

29. ALBEE FH. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery*. 1920 Jan; **71**(1); pp 32-9.
30. CARRODEGUAS, R.G., DE AZA, S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 2011 Oct; **7**(10); pp 3536-3546
31. HORCH, H.H, SADER, R, PAUTKE, C, NEFF, A, DEPPE H, KOLK, A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Aug; **35**(8); pp 708-713.
32. Levin, E. M.; Robbins, C. R.; McMurdle, H. F.; "Phase Diagrams for Ceramists", Volume II, fig 2305, © American Ceramic Society, 1969
33. DICKENS, B., SCHROEDER, L.W., BROWN, W.E. Crystallographic Studies of the Role of Mg as a Stabilizing Impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The Crystal Structure of Pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, *J. Solid State Chem*. 1974; **10**(3); pp 232–248.
34. DAL BO, M., BOSCHI, A., HOTZA, D. Cinética de sinterización y transporte de masa en engobes cerámicos. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2013; **52**(5); pp 237-241.
35. ALVARADO, H.M. *Sinterización y desarrollo microestructural de compuestos nanoestructurados Al_2O_3 -YAG*. Oviedo: 2004
36. DOROZHKIN, S.V. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials*. 2013; **6**(9); pp 3840–3942. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fma6093840>
37. MESSING, G.L., STEVENSON, A.J. Materials science. Toward pore-free ceramics. *Science*. 2008; **322**(5900); 384-383 <https://doi.org/10.1126/science.1160903>
38. REY, P. *Aplicación de los diagramas de volatilidad al diseño y obtención de recubrimientos cerámicos*. Santiago de Compostela: 2005
39. CULLITY, B.D. *Elements of X-RAY DIFFRACTION*. 2ª ed. Filipinas: Addison-Wesley Publishing Company, Inc, 1978. ISBN 0-201-01174-3
40. LEON, A. C., New perspectives in mercury porosimetry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1998; vols. 77-77; pp 341-372 [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00052-9)