

Caracterización mecánica de discos de hidroxiapatita nanoporosos obtenidos por sinterización

Mechanical characterization of nanoporous hydroxyapatite disks obtained by sintering

Meylí Valin-Fernández^I, María Elena Fernández-Abreu^{II}, José Luis Valin-Rivera^{III}, Héctor Lopez-Salinas^{II†}, Carlos Figueroa-Hernández^{II}, Jesús Eduardo González-Ruiz^{IV}

I. Universidade de São Paulo, Brasil Departamento de Mecatrônica e de Sistemas Mecânicos. São, Brasil

II. Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, Facultad de Ingeniería Mecánica. La Habana, Cuba

III. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Mecánica. Valparaíso, Chile

IV. Universidad de La Habana, Centro de Biomateriales. La Habana, Cuba

Correo electrónico: meyli80@usp.br

Este documento posee una [licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)



Recibido: 2 de marzo de 2017

Aceptado: 30 de mayo de 2017

Resumen

El objetivo de este trabajo es la caracterización mecánica de discos fabricados a partir de polvos de hidroxiapatita (HA) sintética cubana y de la Strem Chemicals – USA, con tamaños de partículas diferentes y de forma semiesféricas con superficies porosas, sin aditivos formadores de poros, por compactación uniaxial y sinterización en horno eléctrico a diferentes regímenes de sinterización. Se obtuvieron porosidades aparente entre 3 y 40 % con tamaños de poros entre 18 y 100nm, dimensiones menores a 20 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Se evaluó la

dureza mediante el ensayo de microdureza Vickers y la tenacidad a la fractura a través del ensayo de compresión diametral. Muestras con polvos de mayor tamaño de partículas presentaron comportamiento no lineal con la porosidad en los valores de dureza y de tenacidad a la fractura. Las muestras con menor tamaño medio de polvos presentaron resultados superiores.

Palabras claves: hidroxiapatita, sinterización, porosidad.

Abstract

The objective of this work is the mechanical characterization of disks made from Cuban synthetic hydroxyapatite (HA) and Strem Chemicals - USA powders. With different particle sizes and semi-spherical shape with porous surfaces. Without pore-forming additives, by uniaxial compaction and sintering in electric furnace at different sintering regimes. Obtaining ranges of apparent porosities between 3 and 40%, with pore sizes between 18 and 100 nm and their dimensions smaller than 20 mm in diameter and 2 mm thick. The hardness, fracture toughness and diametrical

compression of the discs were evaluated. To determine the hardness, the Vickers microhardness test and fracture toughness were used for the radial cracking and palmqvist analysis method produced by Vickers prints. Samples with larger particle size powders presented behavior in the values of hardness and toughness to nonlinear fracture with porosity. In general, the samples with lower mean powder size presented higher results.

Key words: hydroxyapatite, sintering, porosity.

Introducción

Nuestro trabajo tiene el objetivo de la caracterización mecánica de discos de hidroxiapatita (HA) sintética que fueron obtenidos a partir de polvos de producción nacional y otra de producción extranjera con diferentes tamaños de partículas, sin la inclusión de formadores de poros. El proceso de fabricación es por prensado y sinterizado. Estos discos tienen diferentes porosidades aparentes, con la finalidad de que sean dopados con fármacos para ser utilizados como sistema de liberación.

Se determina la relación entre las propiedades mecánicas de estos discos y la porosidad aparente, siendo novedoso que puedan ser aplicados como injertos, prótesis o sistemas de liberación controlada en el organismo humano, empleando una hidroxiapatita cubana [1].

Las propiedades mecánicas que se determinan son la dureza, la tenacidad a la fractura por el método de indentación [2] y la compresión diametral. Esto permite obtener características necesarias de los discos para poder introducir su uso en necesidades en el área de la medicina, en la restauración e sustitución de diferentes tipos de tejidos vivos, así como órganos y partes completas del cuerpo humano, problema que enfrenta la medicina desde el propio surgimiento de la humanidad y que se ha mantenido hasta nuestros días. Los intentos de darle solución han desencadenado el empleo de diferentes procedimientos y técnicas quirúrgicas a través del tiempo.

Dentro de las afecciones, la que interesa en nuestro trabajo son las relacionadas con los huesos del cuerpo. Para este tipo de afecciones han surgido distintos materiales que sirven como sustitutos del hueso y ayudan a la regeneración del mismo a partir de técnicas avanzadas. El material de preferencia en estos casos es la hidroxiapatita [3], la cual puede ser natural o sintética [4].

Entre los materiales para la regeneración ósea, los fosfatos de calcio y en especial la hidroxiapatita tienen una amplia utilización debido a la biocompatibilidad y bioactividad que presentan [5]. Los que son empleados de manera general en las aplicaciones médicas en forma de cerámicas y de cementos que se diferencian según las propiedades que alcanzan producto del método de obtención.

La morfología, porosidad y rugosidad en la superficie de los sistemas biológicos es decisiva para su funcionamiento y entre ellos el sistema óseo es un claro exponente de esta situación [6]. Por lo que el conocimiento y control de las propiedades, morfología y rugosidad de la superficie de los materiales de implante óseo son herramientas fundamentales para el estudio y desarrollo de sistemas biocompatibles [7]. El conocimiento y control de la microporosidad de estos sistemas y la correlación con su comportamiento mecánico permite el mejoramiento de las propiedades del biomaterial en su superficie y de esta forma el incremento [8].

La porosidad en las cerámicas de fosfatos de calcio es producto del proceso de fabricación [9]. Por compactación de los polvos y posterior sinterización se alcanzan niveles de microporosidad y/o de macroporosidad con la inclusión o no de agentes volátiles como formadores de poros.

Para la obtención de placas o discos de biocerámicas por compactación y sinterización en horno eléctrico, son utilizadas las cerámicas en forma de polvos, preparándose las muestras en verdes para después ser sinterizadas. La sinterización es el tratamiento que es dado a las muestras de cerámica verde. En ese proceso ocurre la progresiva transición de las partículas en estado de aglomeración, para una unidad en la cual las partículas se funden unas con otras. Durante el proceso, ocurren varias modificaciones en la cerámica; como la disminución del diámetro, del volumen de la muestra y variación de las propiedades mecánicas. La disminución del volumen ocurre como consecuencia de la densificación de la cerámica durante la sinterización, lo que determina su porosidad, siendo muy importante el control de esta.

Métodos y Materiales

En materiales porosos y en capas superficiales es difícil determinar sus propiedades mecánicas por los métodos convencionales debido al pequeño espesor de las capas, al pequeño tamaño de las muestras y en general por la heterogeneidad del material. Bajo esta denominación se cubre una amplia gama de ensayos para la determinación de diferentes propiedades mecánicas, basados en ensayos empleando una herramienta penetradora (indentador) en la superficie de la muestra tratada. En este sentido son muy empleados instrumentos ya establecidos para la medición de durezas superficiales, tales como los durómetros Vickers, el Knoop y otros. Con la huella y grietas surgidas al aplicar cargas en la superficie a través del indentador, se han desarrollado fórmulas para calcular las diferentes propiedades. Así, una de las más conocidas y empleadas es la dureza H medida por el durómetro Vickers. La huella dejada en la superficie por este ensayo sirve también para calcular el módulo de elasticidad E:

El módulo de elasticidad (E) en estos casos también se puede determinar en función de la porosidad. La tenacidad a la fractura K_{IC} [10], también se determina a partir del ensayo de indentación Vickers (IF).

En la determinación de K_{IC} por métodos de indentación, se han presentado diferencias a veces apreciables de valores obtenidos por diferentes autores. Y en especial al compararse con los métodos tradicionales empleados en Mecánica de la Fractura. Para calcular el K_{IC} por este método se han desarrollado varias ecuaciones por diferentes autores según el tipo de grieta formada bajo la carga aplicada (P) a través del indentador. Los principales tipos de grietas que se forman son Palmqvist y Radial, figura 1.

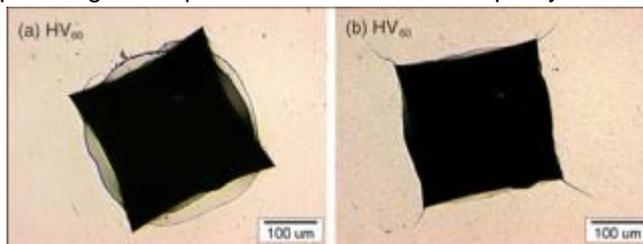


Fig. 1. Tipos de grietas; a) Radial; b) Palmqvist

Al observar las huellas y la grieta formada, permite identificar el tipo de grieta y realizar las mediciones de longitud de esta con la ayuda del ocular graduado del microdurómetro, como se ilustra en la figura 2, para las grietas de tipo Radial (*Median Crack*) y las grietas tipo (*Palmqvist Crack*).

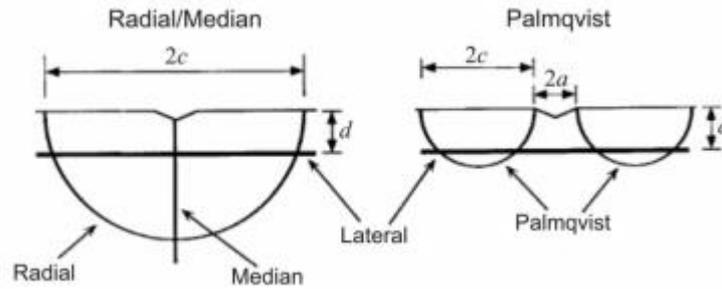


Fig. 2. Tipos de grietas originadas por la impresión de penetrador Vickers

En el primer caso la grieta atraviesa la impresión de indentación mientras en el segundo caso ella se restringe a la continuación de las aristas de impresión. De acuerdo con el tipo de grieta fue desarrollada una ecuación para el cálculo de la tenacidad.

La resistencia a la compresión de estos materiales es determinada indirectamente a través de cálculos, utilizando ensayo de compresión diametral. En este trabajo se evaluó la tenacidad a la fractura y resistencia a la compresión de los materiales estudiados, utilizándose métodos indirectos como ensayo de dureza y de compresión diametral.

Los discos de HA fueron confeccionados con dos tipos de polvos, estos son: B1, producido en el Centro de Biomateriales de la Universidad de la Habana, Cuba y el SC, de la *Strem Chemicals*, USA. Estos polvos poseen tamaño medio de partículas de $8,56\mu\text{m}$ y $4,94\mu\text{m}$ respectivamente, de forma semiesféricas con superficies porosas. Los discos fueron confeccionados por prensado y sinterizado, sin aditivos formadores de poros.

En la fabricación de los discos se utiliza el procedimiento de prensado uniaxial en una prensa hidráulica de marca *Bovendo Schulz*, con posibilidades de trabajo de 15 hasta 20 toneladas (147 KN), con menor división de 0,2 toneladas (1,96 KN). Se empleó un molde de acero 4143 que consta de la matriz, el punzón y dos dados, diseñado y construido en el taller de mecánica de la Facultad de Mecánica del Instituto Superior Politécnico José A Echeverría.

En la fabricación de los discos se determinó la cantidad de polvo a utilizar realizando varios ensayos con diferentes masas de 0,6 hasta 1,0 gramo de polvo B1 empleando la Balanza Sartorius modelo BP210S con rango de 1mg a 210 g. Para determinar la carga de compactación fueron utilizadas cargas de 1 a 5 toneladas (10 a 49 KN) y todos los discos fueron sinterizados en las mismas condiciones (900 °C durante 1 hora). A partir de estos resultados se diseñaron los regímenes de sinterizado. Fue utilizado el horno de cámara eléctrica Jung modelo 2214-4225 con cámara de trabajo de 30 x 25 x 30 cm, temperatura hasta 1400 °C y velocidad de calentamiento de hasta 10 °C/min.

Se realizó la sinterización para temperaturas entre 800 a 1300 °C con razón de calentamiento de 4 °C/min, tiempos desde 0,5 a 3 horas de tratamiento y enfriamiento dentro del horno hasta temperatura ambiente. Obteniéndose una amplia variación de porosidades de 40, 20, 12 y menor al 10 %. Lo que permitió determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de sinterizado en la variación de la porosidad de las placas.

En todos los casos se emplearon cuatro discos para ser tratadas en cada uno de los regímenes de sinterización estudiados.

Los discos en verde para ambos materiales poseen dimensiones de 20 mm de diámetro y 2 mm de espesor. A los discos sinterizados se les determinó la tenacidad a la fractura y resistencia a la compresión a través de los ensayos de dureza y de compresión diametral. En la figura 3, se muestran los discos de hidroxiapatita en estudio.

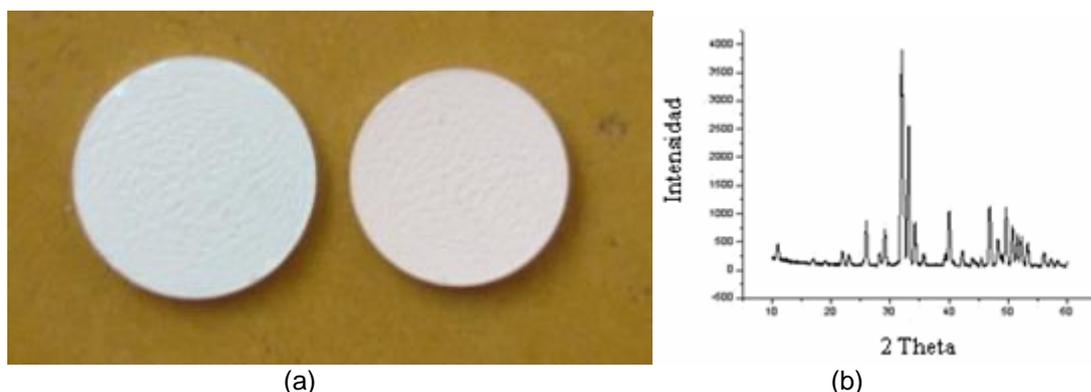


Fig. 3. a) Discos porosos de hidroxiapatita con 40 y 3% PA respectivamente, b) difractograma por rayos X.

En el análisis de las fases por DRX en las placas B1 después de la sinterización se obtuvo un difractograma con los picos característicos a la HA, Figura 3 (a), Lo que indica que en estos discos no se produce cambio de fase durante el proceso de sinterizado hasta la temperatura de 1200°C.

Medición de la dureza

Se realizaron las mediciones de dureza mediante el ensayo de microdureza Vickers. Utilizando un microdurómetro digital MicrohardnessTester HVS – 1000 de la firma Pantec, con rango de trabajo de carga de 10-1000 g/f (0,098-9,8 N) y tiempos de aplicación acorde al material ensayado. Se realizaron 10 mediciones de dureza en cada disco en la superficie pulida hasta paño con pasta de diamante de 1 micra, con carga de 200 gf (1,96 N) con un tiempo de aplicación de 15 segundos.

Medición de la tenacidad a la fractura

En la aplicación del método de indentación en la fase inicial del estudio de este parámetro se evaluó la formación de la grieta para cargas entre 50 y 300 g, apareciendo la grieta con la carga de 200 g (1,96 N) durante 15 segundos para todos los casos, realizándose 10 mediciones en cada disco. Se realizaron mediciones de la diagonal de la huella y longitud de la grieta con el micrómetro ocular del microdurómetro. Se observó que en los discos B1 el cambio de grietas Palmqvist para radial, Figura 1, ocurrió a partir de 12% de porosidad aparente (PA), mientras que en los discos SC ocurrió a partir de 8%, lo cual expresa que la formación de la grieta depende de la porosidad y cambia para cada condición del material.

En las siguientes imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido, figura 4, se pueden observar los dos tipos de grietas que se forman.

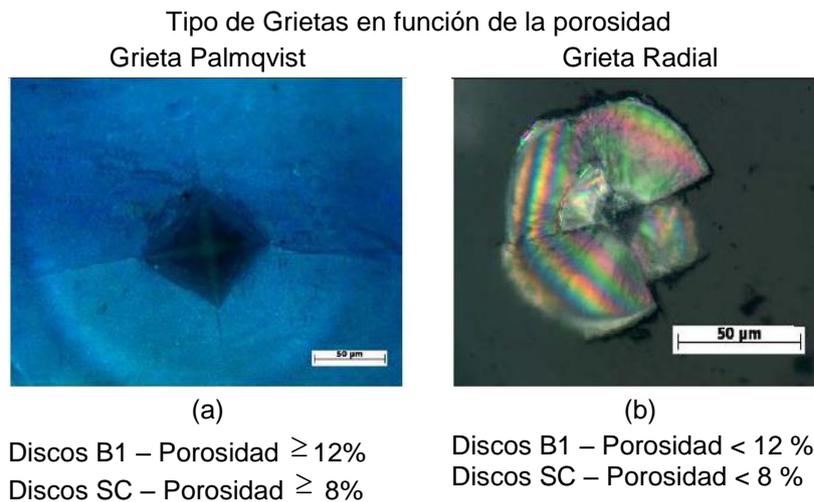


Fig. 4. Variación del tipo de grieta en función de la porosidad de las Discos B1 (a) y SC (b)

Se realizó el cálculo de K_{IC} de acuerdo con el tipo de grieta que se formó por la carga aplicada, usando las ecuaciones 1 y 2 [11, 12].

Para la Grieta Radial:

$$K_{IC} = 0,026(E \times P)^{0,5} \times \frac{a}{c^{1,5}} \quad (1)$$

Para la Grieta Palmqvist:

$$K_{IC} = 0,0319 \cdot \left(P / (a(c-a)^{0,5}) \right) \quad (2)$$

Donde:

E: Módulo de Young (GPa)

P: Carga (1,96 N)

a: Mitad de la diagonal de la impresión de dureza (m)

c: Mitad del largo de la grieta (m)

Es calculado el Módulo de Young según la ecuación 3.

$$E = E_o / 1 + \{3f(1-v)(9+5v) / 2(1-f)(7-5v)\} \quad (3)$$

Siendo:

E_o : Módulo teórico, v: Módulo de Poisson, f: porosidad.

Se utilizaron valores de $E_o = 100$ GP y $v = 0,22$, para la HA.

Ensayo de compresión diametral

El ensayo de compresión diametral se realizó en cinco discos para cada valor de porosidad estudiada. Se utilizó una prensa modelo P 20-T4.1, máquina de ensayo universal con un rango de medición de 0-20 toneladas y una incerteza de $\pm 0,48$ %. La velocidad empleada para la realización del ensayo fue de 0,142 mm/s.

Se determinó la resistencia a la compresión a través de la ecuación 4 [13]:

$$F_t = \frac{2P_{m\acute{a}x}}{\pi \cdot D \cdot e} \quad (4)$$

Donde:

F_t : Resistencia a la compresión

$P_{m\acute{a}x}$: Fuerza máxima aplicada (N)

D : Diámetro de la muestra (mm)

e : Espesor de la muestra (mm)

Resultados y Discusión

Resultados de las mediciones de dureza.

En la Figura 5, es presentado el comportamiento de la dureza en función de la porosidad para muestras B1 figura (a) y SC figura (b). Ambos materiales se comportan según lo previsto en la literatura, donde la dureza disminuye con el aumento de la porosidad. Se distingue que los discos B1 presentan mayor dureza que los SC para las porosidades estudiadas, con excepción apenas en 12 % de porosidad. La disminución brusca de la dureza ocurrida a partir de 12 % de PA para las muestras B1 determinó el cambio en el tipo de grieta de Palmqvist para Radial. Una posible explicación para que ese fenómeno haya ocurrido solamente en las muestras B1 es que en estas la superficie de contacto es menor (mayor tamaño de partícula), contribuyendo para menor resistencia inter partícula a la ruptura. Se nota que para el intervalo de PA entre el 12 % y el 20 %, los valores de dureza son muy aproximados. Este puede haber sido originado debido a la transferencia de la energía de deformación para la formación de grietas, resultando en impresiones con valores aproximadamente constantes. Para los discos SC se verifica un decrecimiento de la dureza en función de la porosidad, al contrario de los discos B1. Mientras los discos B1 presentan un comportamiento no lineal con la porosidad, dificultando el ajuste de sus propiedades.

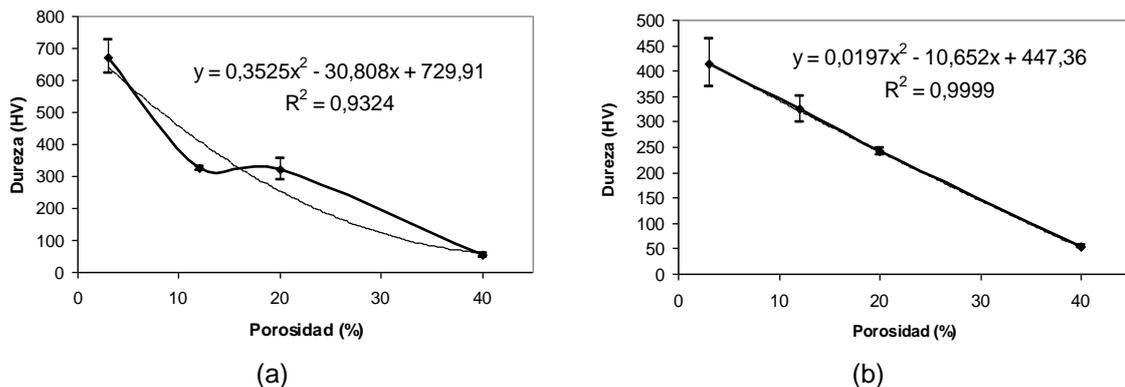


Fig. 5. Relación de la dureza en función de la porosidad (a) muestra B1 y (b) muestra SC

En la figura 6, son presentadas las curvas de K_{Ic} obtenidas a partir de las ecuaciones 1 y 2. También en este caso se observa un comportamiento no lineal para la muestra B1, donde la tenacidad es aproximadamente constante hasta 20% de porosidad y para valores mayores sigue un comportamiento semejante a la muestra SC. Y se muestran los valores de K_{Ic} determinados para las muestras B1 y SC con diferentes porosidades.

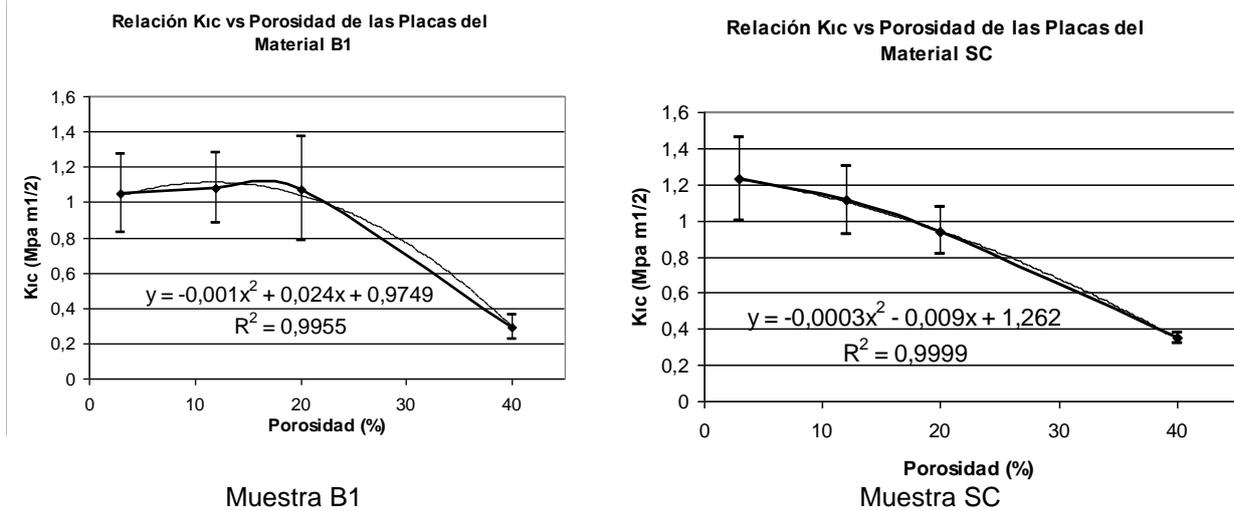


Fig. 6. Curvas de K_{IC} obtenidas a partir de las Ecuaciones 1 y 2.

Análisis de resultados del ensayo de compresión diametral

En la figura 7, foto tomada de las muestras luego del ensayo de compresión diametral, se observa que, para ambos materiales, en el rango de porosidades evaluadas, las fracturas que representan una ruptura frágil se desarrollan a todo lo largo de la zona de contacto donde se aplica la carga.



Fig. 7. Característica de fractura de las muestras producto del ensayo de compresión diametral.

En la figura 8, se observa la relación entre la resistencia a la compresión y porosidad para las dos muestras. Los puntos fueron obtenidos a partir de la Ecuación 4 y representan el valor medio de los ensayos de compresión diametral. Fueron medidos cinco discos para cada valor de porosidad. Se nota que la muestra SC, de un modo general, presenta valores de resistencia a la compresión superiores a la muestra B1.

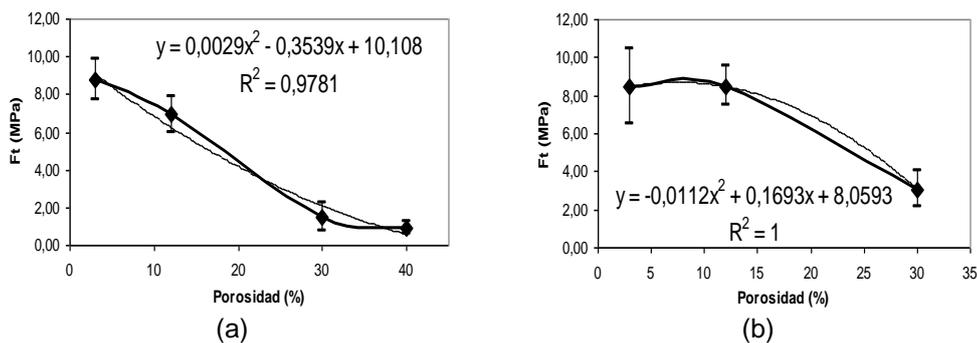


Fig. 8. Relación entre la resistencia a la compresión diametral y la porosidad de las muestras B1(a) SC (b)

En la tabla 2, se relaciona el resumen de los resultados obtenidos en las distintas propiedades estudiadas para cada porosidad evaluada.

Tabla 2. Características mecánicas en los discos B1 y SC

Porosidad	3%		12%		20%		40%	
Discos	B1	SC	B1	SC	B1	SC	B1	SC
Ft (MPa)	8,74	8,47	6,94	8,48	-	-	0,89	-
Dureza (HV)	623	415	323	324	320	241	53,13	55,1
K_{IC} (MPa m ^{1/2})	1,05	1,23	1,08	1,11	1,07	0,94	0,29	0,35
	1,14	1,38	1,15	1,03	0,89	0,94	0,49	0,60

Llegando a un consenso con los resultados podemos decir que el material SC tiene un comportamiento similar al de los discos B1 a todo lo largo del rango de porosidades. La evaluación del tamaño y volumen de los poros en estos, mediante la Porosimetría de Mercurio, entre las porosidades del 12 % y el 20 % existe poca diferencia en los volúmenes de poros. Por lo que, si llevamos esto a comparación con las propiedades mecánicas de estas porosidades, obviando la resistencia a la compresión diametral, podemos decir que las demás características mecánicas como la Dureza y el K_{IC} presentan también poca diferencia, siendo muy similares para ambos materiales. En general las propiedades evaluadas decrecen bruscamente a partir del 20 % de PA. La forma de ruptura y los valores de resistencia a la compresión diametral se comportaron diferente entre los discos más densos (hasta el 12 %) con respecto a las de mayor porosidad, lo que debe ser correspondido por el mayor volumen de poros que actúan en la propagación de la grieta dando una mayor fragilidad en el material. El estudio de la contracción y la influencia de la temperatura, así como el tiempo sobre la porosidad de los discos se llega a la Tabla 3.

Tabla 3. Características de formación de las placas B1 y SC ((-). No se reportan valores).

Porosidad	3%		12%		20%		30%	
Discos	B1	SC	B1	SC	B1	SC	B1	SC
Contracción Diametral (mm)	3,91	3,87	3,17	3,27	1,71	3,23	0,20	2,22
Contracción altura (mm)	0,5	0,5	0,47	0,47	0,34	0,43	0,2	0,4
Temperatura (°C)	1200	1100	1050	1000	1200	900	-	900
Tiempo (h)	2,5	1	1	3	1	2	-	0,5 1 2

Con estos resultados se define claramente la influencia de la temperatura en la contracción de los discos B1 y SC. Es más evidente esta influencia en la contracción diametral la cual va disminuyendo a medida que la temperatura del proceso de sinterización disminuye, no siendo así para la contracción de la altura la cual no presenta tanta variación.

Se puede confrontar también como los cambios más notables se producen en las temperaturas más altas desde 1200 °C. hasta 1000 °C.

No se puede establecer o definir el tiempo como influyente en la contracción o en la definición de la porosidad de los discos B1 y SC, contraria a la temperatura la cual si deja marcada su relación con los resultados de la porosidad de cada disco.

Conclusiones

Ambos materiales se comportan de acuerdo con la literatura donde la dureza, tenacidad a la fractura y resistencia a la compresión diametral disminuyen con el aumento de la porosidad.

Muestras con polvos de mayor tamaño de partículas, HA sintética Cubana (B1); presentaron comportamiento en los valores de dureza y de tenacidad a la fractura no lineal con la porosidad. Siendo prácticamente constantes para los valores de porosidad aparente entre el 10 % y 20 %.

De un modo general, las muestras con menor tamaño medio de polvos (SC) presentaron resultados superiores a los de las muestras B1.

Agradecimientos

A la Universidad Federal de Rio Grande del Norte, Natal, Brasil; a las Agencias de fomento CAPES yCNPq, Brasil por el financiamiento de las investigaciones desarrollada. Al Departamento de Ensayos Mecánicos del Centro de Investigaciones Metalúrgicas, al Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de Cuba y a la Facultad de Ingeniería Mecánica de la Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, La Habana, Cuba.

Referencias

- Fernández Abreu M, López Salinas H, Alves Junior C, et al. Discos de poco espesor de hidroxiapatita cubana sinterizada como sistema de liberación de fármacos. Revista Cubana Investigaciones Biomédicas. 2013;32(3):244-53.
- Donghee Lee M, Rahman M, Zhou Y, et al. Three-Dimensional Confocal Microscopy Indentation Method for Hydrogel Elasticity Measurement. Langmuir. 2015;31(35):9684-93.
- González SR. Hidroxiapatita porosa coralina HAP-200. 15 años de aplicaciones. Clínicas. Revista CNIC Ciencias Biológicas. 2005;36:1-9.
- Villani A, Millán A, González G. Caracterización físico-química y cerámica de hidroxiapatitas producidas por distintos métodos de síntesis: Parte II: Efectos del tratamiento térmico. Revista de la Facultad de Ingeniería. 2015;30(1):201-10.
- Prakasam M, Locs J, Salma Ancane K, et al. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. Journal of Functional Biomaterials. 2015;6(4):1099-140.
- Wang K, Zhou C, Hong Y, et al. A review of protein adsorption on bioceramics. Interface Focus. 2012;2(3):259-77.

7. Ghosh S, Abanteriba S. Status of surface modification techniques for artificial hip implants. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2016;17(1):715-35.
8. Amini A, Laurencin C, Nukavarapu S. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.
9. Habraken W, Habibovic P, Epple M, et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*. 2016;19(2):69-87.
10. Matusevich A, Mancini R, Giudici A. Determinación de la tenacidad a la fractura del material de un gasoducto. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 2012;32(2):154-75.
11. Metsger DS. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. *Journal of Materials Science: Materials in medicine*. 1999;10:9-17.
12. Clovis P. Avaliação da tenacidade à fractura de diferentes sistemas cerâmicos. *UNESP. J Appl Oral Sci*. 2003;11(1):69 - 75.
13. Campos Mora Y, Fuentes Estévez G. Propiedades físico-químicas y mecánica de materiales compuestos hidrófilos. In: VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería; Ciudad de la Habana, Cuba: Universidad de la Habana; 2007. [Citado octubre de 2016] Disponible en: <http://cencomed.sld.cu/socbio2007/trabajos/pdf/t019.pdf>