
Universidad Autónoma de Baja California



Instituto de Ingeniería

Efecto de la modificación superficial de aleaciones de titanio de uso ortopédico y su impacto en la osteoadhesión

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:
Mónica Isabel Soto Tapiz

Directora
Dra. Mónica Carrillo Beltrán

Mexicali, Baja California, Julio de 2012.

Contenido.

Portada	I
Reflexión personal	IV
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XIII

Capítulo 1: Introducción, planteamiento del problema, hipótesis y objetivos.

1.1 Resumen.....	1
1.2 Biomateriales.	
1.2.1 Concepto de biomaterial.....	5
1.2.2 Biomateriales de tipo metálico utilizados como implantes o dispositivos protésicos.....	10
1.3 Planteamiento del problema.....	24
1.4 Hipótesis y objetivos.....	25

Capítulo 2: Marco teórico.

2.1 Antecedentes.....	27
2.2 Tratamiento superficial vía el método de oxidación electroquímica.	
2.2.1 Anodizado electroquímico.....	35
2.2.2 Anodizado por pulsos.....	37
2.3 Caracterización del substrato metálico mediante análisis de superficie.	
2.3.1 Microscopía metalográfica.....	39
2.3.2 Microscopía de barrido electrónico (MBE/SEM)....	39
2.3.3 Rayos X de electrones dispersados (/EDX).....	40
2.3.4 Microscopía de fuerza atómica (MFA/AFM).....	40

2.4	Recubrimiento biocompatible.	
2.4.1	Cerámicas.....	41
Capítulo 3: Metodología.		
3.1	Modificación superficial del sustrato metálico.	
3.1.1	Anodizado electroquímico.....	54
3.1.2	Anodizado por pulsos.....	58
3.2	Síntesis de HA vía el método de precipitación/combustión.	
3.2.1	Técnica experimental.....	61
Capítulo 4: Resultados y discusión.		
4.1	Recubrimiento biocompatible (HA sintética).....	65
4.2	Modificación superficial del sustrato metálico.	
4.1.1	Anodizado de Ti en HF.....	70
4.1.2	Anodizado de Ti en NH ₄ F.....	79
Capítulo 5: Conclusiones.		
	Conclusiones.....	83
	Seguimiento de la investigación.....	84
Capítulo 6: Referencias bibliográficas.		
	• Artículos indexados y de divulgación científica...	86
	• Libros de texto.....	86
Apéndices:	• Trabajos presentados en coloquios y congresos.	
	• Artículo publicado.	
	• Constancias de participación y/o asistencia.	

Reflexión personal.

Nunca consideres al estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein (1879-1955).

Desde muy pequeña supe que mi pasión por conocer la naturaleza de las cosas, involucraba que estudiase una carrera de ciencias que en ese entonces y a mi corta edad no podía ponerle un nombre. Sin embargo y con el transcurso de los años supe que todo aquello que me maravillaba era Física en su máximo esplendor.

Hoy y después de haber saboreado aunque sea un poco de las mieles de esta hermosa área de la ciencia, he llegado a la culminación de una etapa muy importante en mi formación educativa y que sin querer terminé uniendo con la química; rama encargada desde mi punto de vista de embellecer aún más la física que conozco y que ha provocado estragos extremadamente valiosos en mi mente pues he logrado con ella entender mucho más de lo que podía haber pensado en un principio y que sin lugar a dudas, estos conocimientos me ayudarán en mi caminar y mi crecimiento como profesional.

Me siento muy afortunada por haber encontrado en este proceso a excelentes personas que sin titubear me abrieron las puertas para que mi paso no se detuviera y pudiera lograr mis objetivos. Creo firmemente que debido a ello, ahora que continuaré preparándome seré no solo un testigo de la dedicación y pasión que comparto con ellos, sino también, un aliado más para lograr que el estudio sea siempre considerado como un parteaguas entre lo que suponemos y lo que realmente es sobre un objeto de estudio. Sé que la senda del aprendizaje es larga pero me siento orgullosa de estar sobre ella y satisfecha al decir que de algún modo he contribuido en su transmisión, al menos con la firme convicción de que la única manera de generar el saber es mantenerse siempre observando y cuestionando.

Mist.

Dedicatoria.

La mayor sabiduría que existe es conocerse a uno mismo.

Galileo Galilei (1564-1642).

A los mejores seres humanos que he conocido en mi historia y por los cuales mis acciones se convierten en hechos, quienes con su guía, consejo y apoyo han fundamentado mi existir, quienes con su silencio o palabra oportuna han ayudado a clarificar mi caminar y lo mejor aún, me han hecho sonreír y ser inmensamente feliz durante 34 años de vida.

Para ustedes mis queridos y amados Soto: José de Jesús, Arcelia, Dora Luz, José Luis, Alfonso, Sandra, Alejandro, Luis Iván y José Andrés.

Mi familia.

Agradecimientos.

He notado que aun la gente que dice que todo está predestinado y que no podemos hacer nada para cambiar nuestro destino, mira antes de cruzar la calle.

Stephen Hawking (1942).

Mi más sincera gratitud a quienes contribuyeron en mi formación doctoral e hicieron mi estancia en Mexicali productiva y dicharachera:

A *Dios*, ése Ser invisible pero omnipresente que me ha hecho creer casi irónicamente tanto en los principios Físicos que rigen al Universo como que con Fe y Esperanza todo es posible.

A mi *Padre*, un hombre de integridad indestructible, recio y sereno pero con fortaleza envidiable, de caminar seguro y firme, a quien admiro, es mi héroe, ídolo y ejemplo a seguir. Gracias Papi por ser el hombre que me dio la vida y me ha guiado sin titubear pero principalmente por obsequiarme el mayor tesoro: tu amor incondicional, ingrediente esencial en mi formación humana. Te amo.

A mi *Madre*, una mujer extremadamente virtuosa, dulce, tierna, amable, solidaria y al mismo tiempo con decisión y firmeza, mi guía y maestra, guerrera incansable por la educación, de quien indudablemente heredé los dotes de cátedra y la pasión por la enseñanza. Gracias Mami por tu amor infinito, por ser mi compañera de vida, por brindarme tu abrazo cálido siempre que lo he necesitado, por cuidarme y apapacharme, por haberme formado tan semejante a ti y hacerme caminar por el sendero correcto. Te amo mi gordita hermosa.

A mis hermanos *Dora Luz* y *José Luis*, los dos mejores aliados que he tenido durante mi vida y sin los cuales no hubiese podido llegar hasta este momento puesto que con su apoyo y consejo han fortalecido mis decisiones y han contribuido estrechamente a que mis acciones se conviertan en peldaños de escalada en mi superación tanto profesional como personal. Dos seres de igual

corazón pero distintos en formas y estilos, explosivos y cautelosos, dotados de innumerables virtudes, quienes con su peculiar carácter han sabido guiarme y motivarme para hacer siempre lo que he deseado y de quienes he aprendido a luchar pese a cualquier obstáculo y salir adelante. Gracias por ser mis confidentes ante cualquier tribulación pero sobre todo, por ser las principales torres que preservan la unión familiar y enorgullecen nuestro legado. Los amo.

A mi cuñados *Alfonso* y *Sandra*, por ser aliento y consejo oportuno, por compartir mis logros, alegrías y tristeza, por las innumerables reuniones familiares llenas de anécdotas, chistes, buena comida, películas, alboroto y demás. Gracias por ser parte de nuestra familia. Los quiero.

A mis sobrinos *Alejandro*, *Luis Iván* y *José Andrés*, esos chiquitines que me han vuelto loca en todos los aspectos posibles pero que sin lugar a dudas me han brindado enormes y maravillosos momentos con su existir. Gracias Alex por esa risa incontenible, gracias Chapito por los días de juego y relax, gracias Koshe por las tardes de película en la compu y tus pláticas mochas (justificables por tu corta edad). Los adoro.

A mis amigas *Karla Vázquez*, *Alejandra Calvo*, *Melisa Carrillo*, *Grecia Cupul*, *Denise Pérez* y *África Casillas*, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su honestidad y franqueza, por las enriquecedoras charlas dentro y fuera de nuestro lugar de estudio, por los días de vagancia y travesuras, pero sobre todo por su amistad sincera. Las quiero.

A *Eduardo Espinoza López*, por tu amor y cariño, por soportar los días de estrés que traían consigo desesperación y locura, por tu compañía y soporte, por escuchar y aprender a sonreír sin importar el motivo. Gracias chiito por compartir mis alegría y logros. Te amo.

A *Yolanda Franco*, *Marta Gpe. Berralleza* y *Doricela Flores* (Facultad de Ing.-UABC-Mxli), por su amistad, ánimo y complicidad, por estar siempre cuando las he necesitado, por sus pláticas llenas de consejos sabios, por sus risas

y por ser auténticas. Gracias por que pese a las tribulaciones siempre me han brindado una chispa de alegría. Las quiero.

Al *Dr. Benjamín Valdez Salas*, por su apoyo en la realización de mi proyecto doctoral. Gracias por sus oportunas y valiosas aportaciones.

A la *Dra. Mónica Carrillo Beltrán*, por la dirección que brindó a mi tesis doctoral y sin la cual no hubiera sido posible llegar a buen término en esta etapa profesional, por su orientación, paciencia y tutela. Gracias por permitirme penetrar en el área química y retroalimentar mi espíritu en el saber.

Al *Dr. Roumen Koitche Zlatev*, por sus apoyos de beca y su incondicional consejo en el ámbito profesional, por haberme enseñado aunque sea un poco del mundo electroquímico, por las valiosas contribuciones que hizo a mi tesis y permitirme conocer a ese ser humano tan maravilloso que lleva dentro. Gracias por sus invaluables charlas en el laboratorio y por preocuparse siempre por mi bienestar y salud.

A la *Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva*, por su incansable labor de enseñanza y modelo a seguir, por su aliento y consejo. Gracias por escuchar y preocuparse de cuanto acontecía en mi proyecto doctoral, por la oportuna y valiosa asistencia al mismo, por mostrarme ese lado humano tan característico en su persona que la hace íntegra y respetable para quienes tenemos la fortuna de conocerle.

Al *Dr. Nicola Radnev*, por su enseñanza y apoyo profesional. Gracias por su apoyo de beca.

Al *Dr. Jorge Ramírez*, por su consejo, solidaridad y auxilio profesional. Gracias por las amenas charlas sostenidas en el Lab. Cs. de la Tierra y brindarme ese espacio para estudio.

A la *Dra. Ma. Socorro Romero Hernández*, por su incondicional apoyo y colaboración, por las facilidades otorgadas para el uso del Lab. Qco. Ambiental, por compartir equipo y material para llevar a cabo diversos experimentos concernientes a mi proyecto de tesis. Gracias por la confianza brindada y el honor de haberle conocido. Así mismo extendiendo mi agradecimiento a la Ing. Luz Estela Salazar por su paciencia y apoyo en la utilización del espacio y las veces que tuvo a bien orientarme en el interior del laboratorio.

Al *Dr. Guillermo Muniue* (Depto. de Metalurgia-UNISON-Hermosillo), por su ayuda en el análisis microscópico de las muestras.

A la *Dra. Lidia Vargas Osuna* (Skyworks-Mexicali), por su valioso apoyo en el análisis microscópico y espectroscópico de las muestras. Gracias por su cooperación y paciencia.

Al *Dr. Mario Curiel e Israel Gradilla* (CNyN-UNAM-Ensenada), por su valiosa cooperación y disposición en el análisis microscópico de las muestras. Gracias por su tiempo y paciencia.

A la *M.J. Susana Norzagaray* (Lab. de Bioingeniería-Facultad de Ing.-UABC-Mxli), por las facilidades otorgadas en el uso de material y reactivos de laboratorio requeridos para la realización de una serie de experimentos propios de mi tesis. Gracias por su apoyo y consejo.

Lista de Figuras.

Figura 1.	Superficies estudiadas antes del cultivo celular.....	2
Figura 2.	Representación esquemática de la formación de óxido sobre la superficie de Nitinol.....	3
Figura 3.	Dispositivos biomédicos.....	6
Figura 4.	Curva esfuerzo-deformación.....	22
Figura 5.	Superficies estudiadas después de 1, 7, 14 y 21 días de cultivo celular.....	29
Figura 6.	Clasificación de diversos tratamientos superficiales.....	30
Figura 7.	Proliferación celular de MG63 sobre recubrimientos de FHA.....	32
Figura 8.	Comportamiento disolutivo de recubrimientos de FHA en solución salina fisiológica.....	32
Figura 9.	Concentración de Flúor en recubrimientos de HA.....	33
Figura 10.	Imágenes ópticas de <i>S. gigas</i>	33
Figura 11.	Diagrama de corriente: onda cuadrada formada por los pulsos anódico y catódico.....	37
Figura 12.	Estructura hexagonal del Al_2O_3	42
Figura 13.	Estructura tridimensional en celda unitaria de CaP.: apatitas.....	47
Figura 14.	Estructura tridimensional en celda unitaria de CaP.: esquema OHA y parámetros de red.....	48
Figura 15.	Esquema del proceso de preparación de las placas metálicas....	55
Figura 16.	Esquema de montaje experimental: celda electroquímica para anodizado de Ti en HF.....	56
Figura 17.	Esquema de montaje experimental: tratamientos químico y térmico.....	57
Figura 18.	Esquema de montaje experimental: corrida de impedancia.....	58
Figura 19.	Esquema de montaje experimental: celda electroquímica para anodizado de Ti en NH_4F	59
Figura 20.	Esquema de pulsos aplicados.....	60

Figura 21.	Diagrama de flujo de la síntesis.....	64
Figura 22.	Espectro FT-IR de cascarón de huevo molido.	66
Figura 23.	Espectro FT-IR del precursor negruzco a 250°C, obtenido vía la ruta de síntesis 1.....	66
Figura 24.	Espectro FT-IR del precursor calcinado a 900°C durante 2hrs....	67
Figura 25.	Comparativo de los espectros IR para los polvos tratados a baja y alta temperatura en la ruta de síntesis 1.....	68
Figura 26.	Espectro FT-IR de la hojuela secada a 150°C, obtenida vía la ruta de síntesis 2.....	69
Figura 27.	Espectro FT-IR de la muestra calcinada a 900°C.....	69
Figura 28.	Comparativo de los espectros IR de la muestras obtenidas de ambas rutas de síntesis.....	70
Figura 29.	Sustratos metálicos trabajados, izquierda: blancos Ti (99%) y Ti (6Al4V), derecha: placas Ti (6Al4V); a) anodizado sin NaOH, b) anodizado con NaOH y c) anodizado con NaOH y tratamiento térmico.....	70
Figura 30.	Sustratos metálicos trabajados: a) placa Ti (6Al4V) anodizada sin NaOH, b) placa Ti (6Al4V) anodizada con NaOH y tratamiento térmico, c) placa Ti (99%) anodizada sin NaOH, d) placa Ti (99%) anodizada con NaOH y tratamiento térmico y e) malla de Pt utilizada como cátodo en la celda electroquímica.....	71
Figura 31.	Análisis AFM de la muestra Ti (6Al4V): a) blanco, b) anodizado a escala de 25µm ² y c) anodizado a escala de 1µm ²	71
Figura 32.	Análisis AFM (secuencia de tratamiento) de la muestra Ti (6Al4V): a) anodizado, b) anodizado con funcionalizado y c) anodizado, tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF..	72
Figura 33.	Curva de impedancia para la muestra Ti (6Al4V).....	73
Figura 34.	Análisis SEM/EDX de la muestra Ti (6Al4V): anodizado sin tratamientos posteriores.....	74
Figura 35.	Análisis SEM/EDX de la muestra Ti (6Al4V): anodizado con	

tratamiento químico e inmersión en SBF (3 días).....	75
Figura 36. Análisis SEM/EDX de la muestra Ti (6Al4V): anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF.....	76
Figura 37. Análisis AFM de la muestra Ti (99%): a) anodizado y tratamiento químico, b) anodizado con tratamientos químico y térmico y c) anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF (5 días).....	77
Figura 38. Análisis SEM de la muestra Ti (99%): anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF (5 días).....	78
Figura 39. Análisis SEM de la muestra Ti (99%) a escala nanométrica: anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF.....	79
Figura 40. Sustratos metálicos trabajados Ti (6Al4V): a) NH ₄ F con glicerol y b) NH ₄ F con di-etilenglicol.....	79
Figura 41. Análisis AFM de la muestra Ti (6Al4V) anodizado con glicerol: a) blanco (400μm ²), b) blanco (100μm ²), c) anodizado (400μm ²) y b) anodizado (100μm ²).....	80
Figura 42. Análisis AFM de la muestra Ti (6Al4V) anodizado con di- etilenglicol: a) blanco (25μm ²), b) anodizado (400μm ²), c) anodizados (100μm ²) y d) anodizado (25μm ²).....	81
Figura 43. Análisis SEM de la muestra Ti (6Al4V) anodizado con di- etilenglicol.....	82

Lista de Tablas.

Tabla 1.	Clasificación de los biomateriales.....	6
Tabla 2.	Requerimientos de los materiales de implante para aplicaciones ortopédicas.....	7
Tabla 3.	Distintos biomateriales utilizados para la fabricación de implantes ortopédicos.....	8
Tabla 4.	Propiedades mecánicas de metales y aleaciones seleccionados para uso como implantes.....	11
Tabla 5.	Composición de las aleaciones seleccionadas para uso como implante.....	12
Tabla 6.	Metales utilizados para aplicaciones ortopédicas.....	13
Tabla 7.	Propiedades elásticas de aleaciones de titanio.....	28
Tabla 8.	Biocerámicas según su actividad química.....	44
Tabla 9.	Variación de la relación Ca/P según los fosfatos de calcio.....	45
Tabla 10.	Concentraciones iónicas utilizadas para la preparación de la solución SBF.....	56
Tabla 11.	Composición de la solución Ringer (g/L).....	84

Capítulo 1: Introducción, planteamiento del problema, hipótesis y objetivos.

La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real.

Max Planck (1858-1947).

En este capítulo se presenta inicialmente un breve resumen sobre los primeros indicios en el estudio de los biomateriales y como estos han venido a revolucionar el quehacer cotidiano en los ámbitos de ciencia y tecnología existentes, las consideraciones que se deben tener en cuenta para su uso y aplicación. Posteriormente se discute sobre el problema que atañe a nuestro caso de estudio y finalmente se bosquejan tanto la hipótesis como los objetivos del proyecto de tesis.

1.1 Resumen.

El objetivo de los implantes ortopédicos es restaurar la integridad estructural y la funcionalidad de tejidos fuertemente dañados, minimizar las complicaciones debidas a estructura fallida del implante, aflojamiento, etc.; así como mejorar la calidad de vida del paciente [1]. Los implantes metálicos recubiertos con *Hidroxiapatita* (HA) combinan las ventajas de la bioactividad de la hidroxiapatita con las excelentes propiedades mecánicas de los substratos metálicos, los cuales se hacen más atractivos para aplicaciones médicas. Los recubrimientos de HA sirven también como capa protectora de los substratos metálicos en contra de la corrosión biológica. Sin embargo, la HA pura presenta problemas de estabilidad a corto plazo, tal bioresorción resulta en implantes fallidos e implantes flojos [2-5].

El Flúor (F) está presente en huesos y dientes como un elemento esencial en contra de la disolución. Investigaciones y desarrollos recientes con *Hidroxiapatita Florida* (FHA), han llamado mucho la atención al considerarse como promisorio el reemplazo de HA pura con FHA debido a sus características resistivas en presencia de la biodegradación [6-8]. Con la incorporación de iones fluoruro a la HA, son mejorados la adhesión de los

recubrimientos a la superficie metálica y el incremento de la dureza en la interfase recubrimiento/substrato [9-11, 5].

El Titanio (Ti) y las aleaciones de titanio, son materiales muy usados para implantes en odontología, osteosíntesis y ortopedia debido a sus excelentes propiedades mecánicas, alta resistencia a la corrosión y biocompatibilidad [12-13]. Sin embargo, la bioactividad de la superficie del titanio no es lo suficientemente buena para inducir el crecimiento de tejido óseo y una buena fijación del mismo, toma varios meses. A menudo se emplean diferentes técnicas y métodos de modificación de superficies metálicas como medio de control de las interacciones tejido/material y con la finalidad de acortar el tiempo de fijación del hueso [14-15]. Por ejemplo, para recubrimientos de HA sobre superficies de Ti (o aleaciones), las técnicas de tratamiento son tales como plasma spraying [16-18], inmersión en fluido fisiológico [19-20], método sol/gel [21-22], deposición electroforética [23-24], deposición catódica [25-27], haz iónico [28-29] y sputtering [30-31, 15].

Por otro lado y considerando las diversas técnicas de modificación superficial, cuyo objetivo es mejorar la integración de los implantes al tejido óseo; parámetros como rugosidad (Figura 1), funcionalidad biológica, citotoxicidad, osteoinductividad, biodegradación, etc., son de interés fundamental para el desarrollo de los implantes y sus recubrimientos.

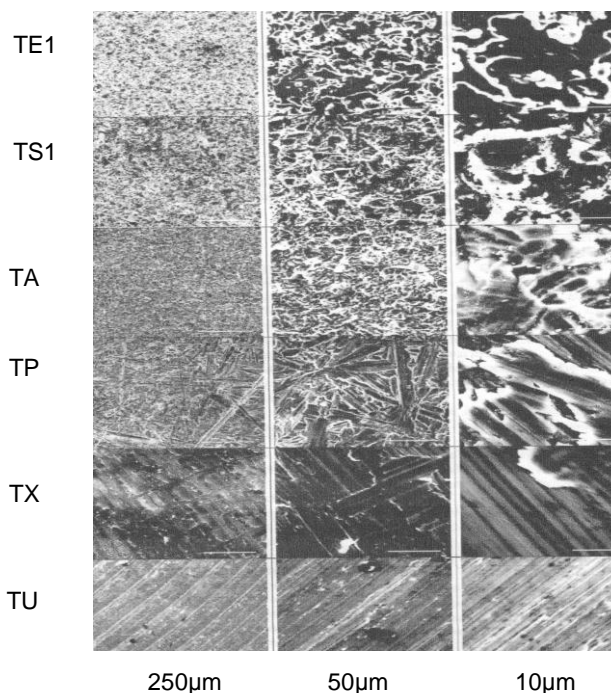


Figura 1. Superficies estudiadas antes del cultivo celular. SEM para superficies electro-erosionadas (TE1), pulidas con arena (TS), abrasión (TA), pulidas (TP), labradas con surcos verticales (TX) y labradas con surcos paralelos (TU) [32].

Dentro de las aleaciones de titanio, la aleación *Nitinol* (NiTi) es de suma importancia para aplicaciones médicas dada sus propiedades de súper-elasticidad y memoria de forma. Aplicaciones recientes de estos compuestos, involucran auto-expansión vascular por stents, filtros vena cava y alambres para aplicaciones ortodónticas; donde las propiedades de súper-elasticidad son requeridas [33-34]. Al mismo tiempo el bajo módulo elástico E de esta aleación, la hace mucho más parecida al hueso y de ahí su interés ortopédico y dental [33, 35].

El *Níquel* (Ni) es conocido por inducir reacciones hipersensitivas y necrosis de tejido, favoreciendo el desarrollo de cáncer por liberación de iones Ni [36]. El Nitinol provee seguridad y biocompatibilidad en diversos estudios *in Vitro* e *in Vivo*, debido a su película de óxido superficial (Figura 2) la cual es principalmente óxido de titanio y previene al Ni de la corrosión y la lixiviación. Sin embargo, existen diferentes opiniones en contra del uso de esta aleación debido a su alto contenido en Ni; la posible presencia de un daño mecánico de la capa de óxido superficial [37] resulta en la toxicidad de productos corrosivos de NiTi generados *in Vitro* [38], incrementando las concentraciones de Ni en sangre después de realizada la implantación de NiTi en animales [39]. En el caso humano, se ha observado corrosión de stents de NiTi [40, 35].

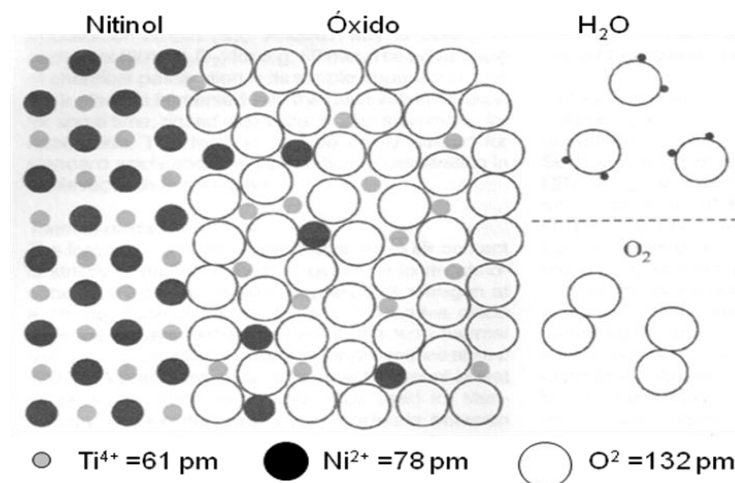


Figura 2. Representación esquemática de la formación de óxido sobre la superficie de Nitinol. Escala 100% según radio de Goldschmidt para iones [41].

Existen varios métodos para reducir la liberación de Ni del NiTi sin deteriorar las propiedades mecánicas del bulto; estas tecnologías involucran a los recubrimientos como una interfase continua entre la superficie y el bulto. Para estudios *in Vitro* de implantes cubiertos por FHA inmersos en fluido corporal simulado (SBF) y SBF modificado orgánicamente, se observa que el fluoruro mejora la deposición de apatita y ésta presenta osteoinducción [8, 42, 5].

Muchos estudios han sido realizados para mejorar el entendimiento de los mecanismos de interacción célula/material, pero hasta el momento no es bien entendido qué tipo de morfología superficial influye la respuesta celular [43-46] y particularmente la adhesión celular, la cual es uno de los principales eventos durante la interacción de células con implantes e influye aún más sobre la proliferación y diferenciación de células óseas antes de la formación de tejido óseo [47, 32]. Frecuentemente la adhesión es relacionada con la adhesión a corto plazo o a la unión celular llevada a cabo durante las primeras horas del contacto con el substrato. Los efectos sobre unión celular de materiales compuestos [48-50], así como los efectos de química de superficie [51-53] o topografía superficial [54-58]; han sido estudiados ampliamente en células derivadas de hueso.

La composición del material siempre está relacionada con la unión celular [48-50], mientras que las variaciones químicas de la superficie de substratos de titanio, se desarrollan en virtud de tratamientos superficiales como la anodización; cuya influencia en la capacidad de unión de los osteoblastos es mínima [52-53, 32]. En este aspecto, Ahmad y sus colaboradores describen una diferencia insignificante entre la unión de células osteoblásticas a substratos de titanio puro de grado 1 y substratos de titanio puro de grado 4 [51]. Sin embargo, la rugosidad presente en la superficie de substratos de Ti posee efectos considerables en la unión, adhesión, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas [48, 54, 57, 59-64]. Finalmente, es importante notar que a la fecha se han desarrollado innumerables estudios enfocados en la investigación del comportamiento celular y en la evolución de la adhesión celular a largo plazo [65] requerida en la fabricación de implantes ortopédicos y dentales [32].

1.2 Biomateriales.

Durante el siglo XX aparecieron los *Materiales Funcionales*, es decir; aquellos materiales que cumplen con una función específica en los sistemas modernos electrónicos, eléctricos, ópticos, mecánicos, sensores y también en el cuerpo humano. Los *Biomateriales* son por excelencia, materiales funcionales y su principal aplicación, incluyendo las aleaciones metálicas, es reparar o reconstruir las partes del cuerpo humano que han sufrido daño o se han perdido, con lo cual se busca mitigar el sufrimiento, restituir las funciones y prolongar la vida [66]. La investigación en biomateriales que favorezcan la adhesión y regeneración de tejido óseo es una prioridad a nivel mundial debido a la alta incidencia de lesiones osteoarticulares, la morbilidad asociada al daño, su impacto en la calidad de vida y el alto costo económico y social de su

manejo. A continuación se presenta un panorama general en relación a los materiales de uso médico que son denominados biomateriales y el impacto que estos presentan en la vida cotidiana, mismo que nos permita justificar el por qué de los esfuerzos en el estudio de los procesos involucrados no solo en la fabricación de dichos materiales sino también del entendimiento de su función e integración con el cuerpo humano.

1.2.1 Concepto de biomaterial.

Un biomaterial puede definirse por ser cualquier sustancia o combinación de sustancias, de origen natural o sintético, que pueden ser usados por algún período, como todo o como parte de un sistema que trata, aumenta o reemplaza algún tejido, órgano o función del cuerpo. Sin embargo, el concepto de biomaterial ha cambiado en la medida que a la ciencia de materiales se han incorporado los avances en biología molecular, ingeniería de tejidos, nanotecnología e ingeniería de superficies.

Los biomateriales cumplen funciones básicas en el cuerpo humano, asegurándose de esta manera la calidad de vida del paciente o de quien haya sufrido un accidente traumático y se sugiera el uso de implantes ortopédicos, reguladores de sistemas cardiovasculares y biosensores. El conocimiento y la aplicación de los biomateriales, involucran un amplio espectro de disciplinas de estudio tales como medicina, biología, química, física, mecánica, metalurgia, ingeniería, informática y computación; así como numerosas áreas de actividad profesional que se llevan a cabo en diversas instituciones públicas o privadas [66].

La Tabla 1 muestra la clasificación de los biomateriales según su composición, origen y estructura. Los dispositivos biomédicos adaptados al cuerpo humano se fabrican con los cuatro materiales de ingeniería convencionales antes mencionados; según su uso, ubicación, función, órgano o tejido a reemplazar o reparar (Figura 3). Los metales se utilizan básicamente en implantes y fijaciones ortopédicas, los plásticos flexibles para corregir tejidos blandos, cartílagos, venas y arterias; los plásticos rígidos para reemplazar la cabeza femoral que gira dentro de la concavidad de la pelvis y los materiales cerámicos se emplean en el reemplazo de huesos y como recubrimientos sobre metales. Así mismo, el uso de materiales avanzados como las aleaciones con memoria de forma, juega un papel importante en la respuesta funcional del implante [66].

Tabla 1. Clasificación de los biomateriales [66].

FUENTE	BIOMATERIAL
Composición química	Metálicos, Plásticos, Cerámicos y Compuestos.
Origen	Naturales y Sintéticos.
Estructura	Sólidos y Porosos.
Implantables	Tubos de dracón (sustitutos de venas), marcapasos, dispositivos anticonceptivos, dentaduras (fijas y removibles) y prótesis ortopédicas (se les emplea para reemplazar total o parcialmente un hueso o una articulación irreparablemente dañados en su morfología estructura y función). Material de osteosíntesis: tornillo, clavo, roscados, clavos intramedulares, placas, clavos-placa, etc. La función de estos implantes es el sostén o soporte interno, intramedular, transóseo, adosado o fijado al hueso. En general pueden ser extraídos cuando el proceso biológico reparativo ha terminado, puesto que el hueso es capaz de soportar las exigencias habituales sin su auxilio.
No implantables	Sondas, catéteres y globos angioplásticos.

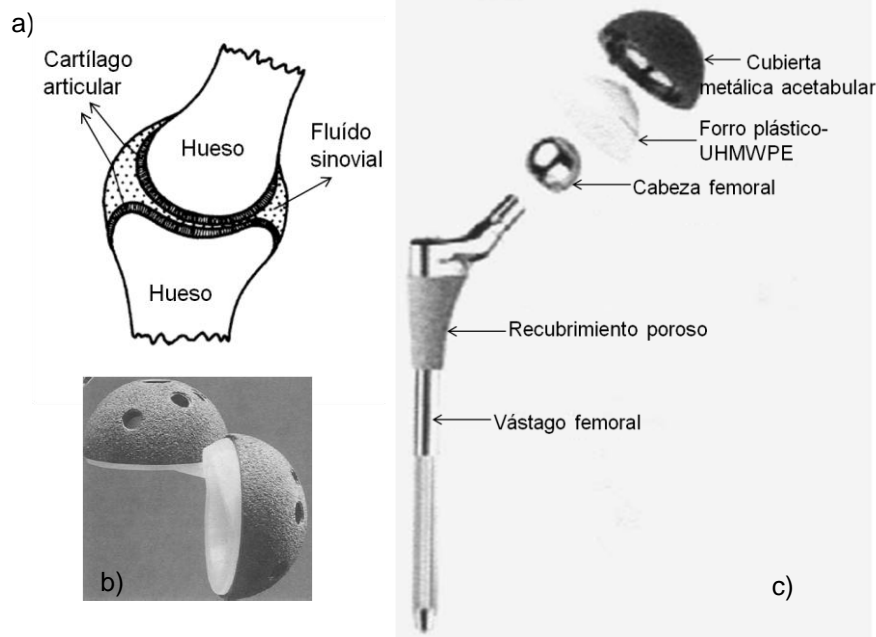


Figura 3. Dispositivos biomédicos: a) articulación sinovial (cartílago articular y hueso duro), b) componentes acetabulares que son colocados sobre la cabeza femoral, c) típico componente encontrado para reemplazo total de cadera [67].

Los materiales porosos por su parte, permiten el crecimiento del hueso dentro de los poros y esto genera la unión de las fibras de los tejidos adyacentes. Las espirales elásticas de acero inoxidable introducidas en venas o arterias cubren

el objetivo de evitar que se colapsen. Sin embargo, la composición química de los metales y las aleaciones, afecta en forma significativa el comportamiento corrosivo dentro del cuerpo humano; por ejemplo el contenido de carbono y nitrógeno, así como su microestructura, el tamaño de grano, la presencia de inclusiones no metálicas y la rugosidad superficial, son factores que se rigen por normas nacionales y en particular por el estándar ISO5832 [66].

Los biomateriales deben cumplir con tres exigencias elementales: primero, ser biocompatibles, segundo, resistir a la corrosión de los fluidos corporales y tercero, cumplir la función biológica o mecánica planeada (Tabla 2). Tres de las aplicaciones principales de los biomateriales son: *implantes ortopédicos* (reparación del sistema óseo), *materiales dentales* y *dispositivos anticonceptivos* (Tabla 3). Por ejemplo, los adhesivos tisulares son muy útiles en la ciencia ortopédica veterinaria; algunos de ellos se aplican en heridas y permiten una rápida cicatrización. Otros productos como granulados de hidroxiapatita o material biodegradable de β -fosfato tricálcio, se emplean para la restauración y reparación ósea. De esta manera, queda claro que la aplicación de los biomateriales no es exclusiva del uso humano sino que también se extiende hacia las especies animales [66].

Tabla 2. Requerimientos de los materiales de implante para aplicaciones ortopédicas [67].



Tabla 3. Distintos biomateriales utilizados para la fabricación de implantes ortopédicos [66].

BIOMATERIAL	PROPIEDADES	APLICACIONES
<p>Metales y Aleaciones:</p> <p>Aceros inoxidables: Aleaciones de Ti, Co, NiTi.</p> <p>Cobre (Cu). Amalgamas y aleaciones dentales. Espirales vasculares elásticas (stents).</p>	<p>Alta densidad, resistencia mecánica al desgaste, impacto, tensión y compresión, baja biocompatibilidad, resistencia a la corrosión.</p> <p>Se corroe en el útero. Biocompatible con saliva. Biocompatible con sangre.</p>	<p>Implantes y fijaciones ortopédicas con tornillos, placas, alambres, varillas, clavos, implantes dentales.</p> <p>Dispositivos anticonceptivos. Implantes dentales y reparaciones. Reparación de venas y arterias.</p>
<p>Plásticos (polímeros):</p> <p>Hule (goma) sintético. Polietileno, propileno, acrílicos, teflón.</p> <p>Dacrón, Nylon (poliéster).</p>	<p>Baja densidad y resistencia mecánica, facilidad de fabricación, formación de bio-películas.</p>	<p>Suturas, sustitución de arterias y venas, restauración maxilo facial, Nariz, oreja, mandíbula, dientes, tendón artificial. Cirugía plástica estética.</p> <p>Hilos de sutura.</p>
<p>Cerámicos:</p> <p>Óxidos metálicos, alúmina (Al_2O_3), zirconia (ZrO_2), titania (TiO_2), fibras de carbono, apatita artificial.</p> <p>Recubrimientos.</p>	<p>Buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inertes, alta resistencia a la compresión, alta densidad, dureza, dificultad de maquinado y fabricación.</p>	<p>Prótesis de cadera, dientes cerámicos y cemento.</p>
<p>Compuestos:</p> <p>Metal cubierto con cerámica: Ti con HA porosa.</p> <p>Material cubierto con carbón o diamante.</p>	<p>Buena compatibilidad, inertes, alta resistencia a la corrosión y a la tensión. Falta de consistencia en la fabricación del material.</p>	<p>Implantes ortopédicos reforzados con fibras de carbono, válvula artificial cardiaca, restauración de articulaciones.</p>

Por otro lado, en los biomateriales de tercera generación, es decir, los que se encuentran en etapa de investigación en el momento, se considera incluso que la biocompatibilidad no sea simplemente sinónimo de no-toxicidad, esto es, en lugar hablar de materiales inertes, se plantea el reto de diseñar materiales biofuncionales y bioactivos [68]. Para la fabricación dichos materiales existen dos vertientes. Primero, producir implantes con propiedades que imiten la estructura jerárquica de los órganos que sustituyen a escalas de longitud desde lo macro hasta lo nanométrico (materiales compuestos con propiedades

superficiales diferentes a las del bulto); por ejemplo, imitando al hueso cuyas propiedades físicas internas son diferentes a las externas o superficiales.

Segundo, producir materiales bioactivos para ingeniería de tejidos, cuyo principio básico es que el material funcione como soporte para el crecimiento de tejido pero que sea absorbido y reemplazado con el tiempo a una velocidad en sintonía con el crecimiento de tejido biológico nuevo, el cual es regenerado por el mismo cuerpo (materiales compuestos basados en polímeros degradables reforzados con algún mineral o cerámico bioactivo) [68].

La biocompatibilidad es una propiedad trascendental en la interacción biomaterial-cuerpo humano y es entendida como la ausencia de una reacción fisicoquímica perniciosa del biomaterial implantado con los tejidos y los fluidos biológicos corporales, también llamados soluciones fisiológicas. Por ejemplo, un implante no debe alterar la composición y las propiedades de los componentes de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos, proteínas, lípidos) y tampoco coagularla para así evitar trombos [66]. Las características de la superficie del implante tales como rugosidad, grado de pulido, porosidad, potencial eléctrico, humectación y comportamiento hidrofóbico o hidrofílico, son factores decisivos que afectan su compatibilidad y determinan la interacción del implante con las bacterias y su capacidad de colonizar su superficie, puesto que éste es el primer contacto con el cuerpo humano que va a determinar el proceso de asimilación o rechazo del implante, así como la velocidad del proceso curativo y finalmente la falla o éxito de la implantación.

La falta de biocompatibilidad induce a una reacción negativa entre el implante y su entorno biológico creando en forma progresiva irritación, inflamación o infección; a tal grado que debe ser removido el implante para evitar la destrucción de los tejidos o perjudicar la función de los órganos cercanos con graves consecuencias en la salud del paciente. Sin embargo, a veces es necesaria la interacción del implante con el tejido aledaño; cuando diminutas arterias o extremos de músculos penetran en los poros de un recubrimiento bioactivo de HA sobre implantes ortopédicos de titanio, cuyo contacto establece un anclaje mecánico que evita el uso de una unión mecánica con clavos, tornillos, cemento cerámico o plástico [66].

Ahora bien, considerando la resistencia corrosiva que deben presentar los implantes metálicos ante los fluidos corporales; es importante tomar en cuenta la capacidad corrosiva interna del cuerpo humano (similar a la del agua de mar tibia), la cual causa muchas veces corrosión localizada del implante,

incluyendo picaduras, hendiduras y corrosión por esfuerzos. Cuando esto ocurre, los cationes metálicos y/o partículas metálicas ingresan y se derraman en el cuerpo ocasionando daños. En tales casos la aleación es clasificada como incompatible con el receptor (cuerpo humano). La corrosión es un fenómeno complejo que depende de varios parámetros del sistema implante-bioambiente como son las geometrías de diseño, metalúrgico, mecánico y químico. Los productos de la corrosión se dispersan en el cuerpo humano y afectan los procesos biológicos, por ejemplo la actividad de los órganos y las enzimas. Además, los materiales plásticos y cerámicos se deterioran por procesos mecánicos como erosión, abrasión y desgaste por fricción. Las partículas sólidas de 1 a 50 micras que se desprenden de un implante metálico, plástico o cerámico pueden aflojar la unión implante-hueso hasta su falla y desintegración; forzando al cirujano a renovar el implante dañado. En ocasiones estas partículas se acumulan en órganos vitales como el hígado, el páncreas o los riñones, con lo cual alteran sus funciones [66].

En resumen podemos decir, que todos los materiales producen algún tipo de respuesta al estar en contacto con los tejidos orgánicos; de acuerdo a esta respuesta, se pueden clasificar como: tóxico (cuando el tejido circundante muere, ejemplo: iones metálicos), no-tóxico y biológicamente inactivo (con superficie modificada; ejemplo: titanio), no-tóxico y biológicamente activo (bioactivo; ejemplo: fosfatos de calcio) y biodegradable (disolución en el medio biológico; ejemplo: polímeros) [68].

1.2.2 Biomateriales de tipo metálico utilizados como implantes o dispositivos protésicos.

Los metales han sido utilizados en varias formas como implantes. El primer metal que se desarrolló específicamente para uso humano fue el acero de Vanadio de Sherman (acero de alto carbono aleado con vanadio para mejorar la dureza y retener la ductilidad) [69], mismo que fue utilizado en la manufactura de platos y tornillos para fractura ósea. Sin embargo, la principal razón en la elección de este tipo de materiales metálicos para la fabricación de dispositivos con aplicaciones quirúrgicas, recae en sus características de fuerza y alta resistencia a la fractura, asumiendo que el procesamiento apropiado de dicho metal, brinda desempeño a largo plazo al implante en situaciones de carga mayores [70-76, 78].

Por otro lado, la relativa facilidad de fabricación de estos biomateriales en formas sencillas y complejas que utilizan técnicas bien establecidas y

extensamente disponibles en la industria como por ejemplo: lanzar, forjar y mecanizar, han promovido el uso de material metálico en los campos de la ortopedia y la odontología. Pese a que la primordial aplicación en estas áreas sean los dispositivos para carga, no se puede dejar de lado que el estudio y la manipulación de dichos materiales bioinjertables, hayan guiado la utilización de los metales para formar dispositivos cardiovasculares como lo son: válvulas artificiales de corazón, conductos de sangre, componentes de ayuda o asistencia aortica, stent vascular e injertos neurovasculares. Además, la excelente conductividad eléctrica que poseen los metales, favorece su uso en dispositivos de estímulo neuromuscular, dentro de los cuales, el ejemplo más común es en marcapasos cardiacos. En sí, todas estas propiedades favorables, están intrínsecamente relacionadas con el enlace metálico interatómico que caracteriza esta clase de material [70-77].

Dentro de los metales utilizados para la fabricación de implantes o dispositivos protésicos se encuentran: Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo y W (Tablas 4 y 5), mismos que pueden ser tolerado por el cuerpo en intervalos de tiempo prolongados. A veces estos elementos metálicos pueden existir naturalmente y en formas diversas en el cuerpo, por ejemplo, el Fe es esencial en las funciones celulares, el Co interviene en la síntesis de la vitamina B₁₂, etc.

Tabla 4. Propiedades mecánicas de metales y aleaciones seleccionados para uso como implantes [70-77].

<i>Metal/Aleación</i>	<i>Límite elástico (MPa)</i>	<i>Límite plástico (MPa)</i>	<i>Modulo de elasticidad (GPa)</i>	<i>Elongación (%)</i>
316L acero inoxidable, recocido	207	517		40
316L acero inoxidable, trabajado en frío	689	862	200	12
Co-Cr-Mo, molde	450	655	248	8
Co-Cr-Mo, procesado termomecánicamente	827	1172		12
Cr-Cr-W-Ni, forjado	379	896	242	
Co-Ni-Cr-Mo, recocido	241-448	793-1000	228	50
Co-Ni-Cr-Mo, trabajado en frío	1586	1793		8
Titanio, grado 1	170-310	240		24
Titanio, grado 4	483-655	550	110	16
Ti-6Al-4V, EBI recocido	827	896	124	10
Tantalio, recocido	138	172		

Tabla 5. Composición de las aleaciones seleccionadas para uso como implante [70-77].

<i>Metal/ Aleación</i>	<i>Fe</i>	<i>Cr</i>	<i>Co</i>	<i>Ni</i>	<i>Ti</i>	<i>Mo</i>	<i>C</i>	<i>W</i>	<i>Otros</i>
Acero inoxidable, F 138	bal.		17-19	13-15		2-3	0.03		Cu(0.5 máx.), Mn(0.2), P(0.025), Si(0.75), S(0.2), N(0.1)
Co-Cr-Mo, molde, F 75	0.75	bal.	27-30	1		5-7	0.35		Si(1), Mn(1).
Co-Cr-W-Ni, forjado, F 562	3.0 máx.	bal.	19-21	9-11			0.05-0.15	14-16	Mn(1-2), Si(0.4 máx.), P(0.04), S(0.03).
Titanio, F 67	0.2 máx.				bal.		0.1 máx.		N(0.03 máx.), H(0.015), O(0.18), Al(5.5-6.5), V(3.5-4.5).
Ti-6Al-4V, forjado, F 138	0.25 máx.				bal.		0.08 máx.		N(0.05 máx.), H(0.012), O(0.13), Al(5.5-6.5), V(3.5-4.5).
Titanio, F 560	0.01			0.01	0.01	0.02	0.01	0.05	N(0.01), H(0.0015), O(0.015), Nb(0.1), Si(0.005).

La biocompatibilidad del implante metálico es de considerable preocupación porque puede ser corroído en el ambiente hostil del cuerpo. Las consecuencias de corrosión incluyen pérdida de materia, que debilitará el injerto, y probablemente y la más importante, que los productos de corrosión escapen en el tejido, teniendo como resultado efectos indeseables. Como puede observarse, si bien las aplicaciones de los biomateriales metálicos son múltiples, el número de familias de aleaciones metálicas que pueden soportar este medio tan agresivo, es muy reducido.

El proceso industrial de estos metales y sus aleaciones, se discute en términos de factores metalúrgicos que proporcionan un mejor entendimiento de su efecto de resistencia a la corrosión. Por ejemplo, los cambios pequeños (microestructura, tamaño de grano, tipo de precipitado, ubicación del precipitado, presencia de impurezas, etc.) que se presentan al alear ciertos elementos, pueden tener como resultado, cambios significativos en la conducta y los mecanismos de corrosión [79]. La comprensión de las propiedades y los procesos físicos involucrados en la elaboración de un componente metálico, son aspectos críticos que impactan el buen desempeño o en su defecto, la falla

del material, así mismo como la simetría deseada y la posible aplicación útil (Tabla 6) [70-77].

Tabla 6. Metales utilizados para aplicaciones ortopédicas [70-77].

<i>Metal/Aleación</i>	<i>Aplicación (mayor/menor)</i>	<i>Proceso de manufactura</i>
Acero inoxidable	Osteosíntesis/reemplazo de articulación	Forja (caliente y tibio) y mecanizado
Co-Cr-Mo	Reemplazo de articulación/osteosíntesis	Fundición, forja (caliente y tibio)
Co-Ni	Osteosíntesis/reemplazo de articulación	Forja (caliente y tibio)
Titanio, grado 4	Osteosíntesis	Forja (caliente y tibio) y mecanizado
Aleaciones Ti ($\alpha + \beta$)	Reemplazo de articulación y osteosíntesis	Forja (caliente y tibio) y mecanizado
Aleaciones Ti (β /casi β)	Osteosíntesis	Forja (caliente y tibio) y mecanizado
Ni-Ti	Osteosíntesis	Forja (caliente y tibio) y mecanizado
Tantalio	Elongación ósea	Infiltración por vapor químico

a) Acero inoxidable.

El primer acero inoxidable utilizado para la fabricación de materiales implantables fue el 18-8 serie 300 (302 en la clasificación moderna), que es más fuerte que el acero al carbono y más resistente a la corrosión. El acero al vanadio ya no es utilizado en injertos desde que su resistencia a la corrosión es inadecuada. La forma más común de aceros empleados en las aplicaciones ortopédicas es la 316L grado 2, así designada por la American Society for Testing and Materials (ASTM) bajo la especificación ASTM F138. La identificación numérica 316 ubica a la aleación entre los aceros inoxidables austeníticos; la L se refiere a la baja concentración de carbono (típicamente menor al 0.03 % en peso). Como todo acero, el acero inoxidable 316L es una aleación de hierro en carbono. Los otros constituyentes son mayoritarios se incluyen el cromo, níquel y molibdeno, con pequeñas cantidades de manganeso, fósforo, azufre y silicio. Los elementos de la aleación afectan a la microestructura y, por lo tanto, a las propiedades mecánicas y a la resistencia a la corrosión [80].

La concentración de carbono debe mantenerse baja en el acero inoxidable 316L para mantener la resistencia a la corrosión. Las concentraciones altas de carbono inducen a su combinación con el cromo para

formar carburos frágiles segregados en los bordes de grano, debilitando significativamente al material y promoviendo la fractura por corrosión. Esta condición, denominada sensibilización, es responsable directa de las fallas mecánicas de las prótesis ortopédicas fabricadas con altos contenidos de carbono. Una desventaja potencial del acero inoxidable de las aplicaciones en prótesis es su susceptibilidad a la corrosión por esfuerzos o por hendidura. En cada proceso de corrosión hay dos reacciones, una reacción anódica en la cual el metal es oxidado a su forma iónica y una reacción catódica en la cual los electrones son consumidos (en una solución acuosa con oxígeno disuelto).

La preocupación sobre la corrosión y los subsecuentes efectos sobre la biocompatibilidad a largos plazos ha motivado el empleo del acero inoxidable en sistemas de fijación de fracturas. Estas aplicaciones frecuentemente requieren la remoción del dispositivo al momento que ocurra la cura del hueso. Las prótesis permanentes han sido fabricados de acero inoxidable, demostrando que puede ser usado en aplicaciones de alta exigencia.

b) Aleaciones base cobalto (Co).

Estos materiales son referidos generalmente como aleaciones de cobalto-cromo. Hay básicamente dos tipos: uno es la aleación de Co-Cr-Mo "Vitallium", que es utilizada generalmente para probar un producto y ha estado en uso por muchas décadas en la odontología y en la elaboración de coyunturas artificiales. El otro tipo, corresponde a la aleación de Co-Ni-Cr-Mo, que es generalmente forjada en altas temperaturas y ha sido utilizada para hacer los tallos de prótesis para coyunturas de carga pesada como la rodilla y la cadera [83]. Las propiedades mecánicas de las aleaciones son el resultado del proceso de manufactura que conducen a distintas microestructuras. Por ejemplo la aleación F75 (Cr-Co) ha sido frecuentemente usada para la colada de precisión (método de la cera perdida). Los moldes de cera con la forma y las dimensiones finales del dispositivo ortopédico son revestidos con cerámica. Ésta es fogueada en un horno (la cera se pierde a medida que se funde dentro del molde cerámico), la cual se cuela o presuriza en el molde permitiendo su solidificación.

La facilidad de fabricación y el amplio rango de las propiedades disponibles para las aleaciones de cobalto las hacen ideales para un amplio rango de aplicaciones ortopédicas, incluyendo todos los componentes metálicos de todos los reemplazos articulares como los dispositivos de fijación de fracturas. El contenido de cromo de estas aleaciones provee de una

excelente resistencia a la corrosión (superior a la del acero inoxidable). El uso clínico prolongado ha probado que estas aleaciones son excepcionales por su biocompatibilidad [84-85].

c) Aleaciones base aluminio (Al).

Hace mucho tiempo que la mayoría de los materiales compuestos de matriz metálica, tanto en investigación y desarrollo como en varias aplicaciones industriales, son base aluminio y sus aleaciones. Esto se debe a que el aluminio es ligero, que es el primer requisito en la mayor parte de las aplicaciones de los biomateriales metálicos actuales. Adicionalmente, es barato en comparación con otros metales ligeros, como el titanio y el magnesio. También se debe a que las aleaciones de aluminio convencionales se utilizan en grandes cantidades, en un gran número de aplicaciones, desde la industria de automoción y aeronáutica, hasta en ocio y recreo. Su excelente resistencia, ductilidad y comportamiento frente a la corrosión ya son bien conocidos y pueden modificarse para satisfacer los requisitos de muchas aplicaciones distintas. Entre las aleaciones de aluminio, las aleaciones endurecidas por precipitación (Al-Cu-Mg y Al-Zn-Mg-Cu) son de especial interés.

La más importante y reciente incorporación a estas aleaciones es la de las aleaciones de Al-Li. El particular efecto del litio es que cuando se alea con aluminio, simultáneamente decrece la densidad y aumenta el módulo de elasticidad de la aleación. Por lo tanto, no sorprende que la industria aeroespacial esté interesada en los compuestos de matriz Al-Li. Aunque la fabricación de compuestos de matriz de aluminio reforzado con fibras continuas es bastante compleja y cara, se utiliza en algunas aplicaciones, principalmente en la industria aeroespacial [85-87].

d) Aleaciones base magnesio (Mg).

Estas aleaciones se han desarrollado de acuerdo con criterios similares a los de las aleaciones de aluminio. El magnesio es el más ligero de los metales estructurales, siendo, aproximadamente, un 35 % más ligero que el aluminio. El magnesio está presente en una gran gama de aleaciones y es relativamente fácil de colar. Además, las propiedades mecánicas y rigidez de los materiales compuestos de magnesio son comparables con los materiales de base aluminio y no sorprende los muchos esfuerzos que se invierten en el desarrollo del magnesio. Sin embargo, las propiedades frente a la corrosión de este material son pobres. Este problema se puede minimizar mediante técnicas de

pintura y recubrimiento. Avances recientes en la tecnología de estos materiales metálicos con matrices de alta pureza, han mejorado sustancialmente las características de corrosión de los mismos. Pese a todo no se utilizan en ambientes muy corrosivos. En la actualidad, los recubrimientos galvánicos mejoran la velocidad de corrosión del material reforzado con carbono, pese a que las fibras pueden separarse de la matriz [88].

Debido a la ligereza que se persigue en estos compuestos, se emplean muchas veces como refuerzo fibras de carbono, aunque la alúmina, el carburo de silicio y las fibras de boro son las más investigadas. El mayor problema es la baja mojabilidad del carbono por el magnesio líquido. El elevado coste de estos materiales limita su uso a aplicaciones muy concretas, como por ejemplo, aplicaciones en satélites espaciales. Los trabajos de investigación se centran en mejorar la calidad y costes de las técnicas de producción [89-90].

e) Aleaciones base titanio (Ti).

Un metal estructuralmente importante [91], utilizado en aplicaciones aeroespaciales es el titanio. Por su elevado punto de fusión mantiene su resistencia a altas temperaturas, mucho mayores que el aluminio [92]. Además, la resistencia a la corrosión y oxidación es buena [93] y es el material ideal para la fabricación de motores a propulsión en la industria aeroespacial. El problema de los materiales compuestos o aleaciones base Ti y su producción está relacionada con la extrema reactividad de la matriz metálica. Durante el procesado a elevadas temperaturas, las reacciones entre la matriz y el refuerzo son difíciles de evitar y consecuentemente los recubrimientos de fibras son de especial interés. Por otro lado, la demanda de recubrimientos restringe la aplicación de refuerzos discontinuos. Si el titanio ya es muy caro, la producción de aleaciones usando como base este metal, lo es mucho más. Esto restringe las aplicaciones más genéricas a nivel de ingeniería [85].

Los intentos para utilizar titanio en la fabricación de injertos o dispositivos protésicos datan de finales de los años treinta. En los estudios realizados en esas fechas, se observó que el titanio era tolerado en fémures de gato tal como lo hacía el acero inoxidable y el Vitallium. La densidad del titanio (4.5 g/cm^3 comparada a: 7.9 g/cm^3 para el acero inoxidable 316, 8.3 g/cm^3 para Co-Cr-Mo moldeado y 9.2 g/cm^3 para aleaciones forjadas de Co-Ni-Cr-Mo), aunada a las excelentes propiedades mecánicas y químicas, proveen a este material metálico de características notables para la aplicación como injerto. El titanio y sus aleaciones son de interés particular para las aplicaciones

biomédicas debido a sus características de biocompatibilidad y resistencia a la corrosión. Su resistencia a la corrosión es provista por una capa pasiva adherente de óxido de titanio (TiO_2), que excede significativamente las del acero inoxidable y de las aleaciones de cobalto. La corrosión uniforme en soluciones salinas es extremadamente limitada y la resistencia a la corrosión al picado, la intergranular y la hendidura son excelentes. Además, las superficies de óxido de titanio y sus aleaciones, son bien toleradas en contacto con el hueso, volviéndose óseo integradas con poca evidencia de la formación de una capa fibrosa entre el hueso y el implante [81].

El titanio-CP (ASTM F67) es usado muy extensivamente en implantes dentales, pero es usado primariamente en cirugía ortopédica para formar revestimientos porosos que son sinterizados sobre los componentes de aleaciones de titanio para los reemplazos articulares. Las propiedades del titanio-CP dependen del contenido de oxígeno, esto es, a bajas concentraciones el incremento del contenido de oxígeno mejora las propiedades mecánicas. La forma más común de titanio utilizado en aplicaciones ortopédicas es la aleación de Ti-Al-V (ASTM F136). Los elementos primarios de la aleación son el aluminio y el vanadio, mismos que están limitados a valores de 5.5-6.5 (% en peso) y 3.5-4.5 (% en peso) respectivamente, de modo que la aleación es frecuentemente llamada Ti-6Al-4V o simplemente Ti-6-4. La aleación es usada en implantes ortopédicos en su forma intersticial extra baja, en la cual la concentración de oxígeno es mantenida muy baja para evitar su fragilidad y maximizar su resistencia y ductilidad. Puede ser mecánicamente trabajada para alterar sus propiedades. Típicamente, la microestructura es una fase α de grano fino con la fase β presente como partículas aisladas que precipitan en los bordes de grano [94-95].

Esta microestructura posee excelente resistencia a la fatiga comparadas con las otras formas de las aleaciones de titanio. Las propiedades mecánicas de Ti-6Al-4V son más adecuadas para la mayor parte de las aplicaciones ortopédicas. El módulo elástico de la aleación es aproximadamente la mitad de la de los aceros inoxidables y de las aleaciones de cobalto, haciendo de esta aleación un candidato ideal para reducir la rigidez estructural de un dispositivo sin cambiar su forma. Esta consideración mecánica ha conducido al uso de la aleación de titanio en dispositivos de fijación de fracturas y fijación espinal, incluyendo placas, uñas y tornillos. La misma consideración ha llevado el uso de la aleación de titanio en mallas para los reemplazos articulares totales. Una desventaja de la aleación de titanio es su sensibilidad a las muescas, es decir, una concentración de tensión producida por ralladura o por el uso de pinzas, reduce la vida útil del componente, causado por fatiga. Otra desventaja del

titanio es su baja dureza en comparación con las aleaciones de cobalto; si bien la dureza involucra un término ambiguo, este es a menudo referido a un número de propiedades mecánicas pero frecuentemente asociado a la resistencia elástica y a las deformaciones plásticas [96-97].

Las observaciones clínicas han demostrado un significativo rayado y desgaste de las cabezas femorales de cadera total hechas con aleación de titanio. Las mediciones de los niveles de titanio y aluminio de los tejidos y fluidos tomados de articulaciones de cadera, han confirmado el desprendimiento de cantidades significativas de estos elementos desde las cabezas femorales [98]. Estas observaciones sugieren que las aleaciones de titanio que no han sido sujetas a procesos superficiales adicionales, (implantación iónica) no deberían ser usadas en superficies articulares. A pesar de la gran evidencia clínica de la excelente biocompatibilidad de las aleaciones de titanio, existe preocupación por la liberación de elementos citotóxicos como el vanadio, que puede causar problemas locales y sistémicos. Esto ha motivado la introducción de otras aleaciones de titanio en las cuales el vanadio ha sido reemplazado por otros elementos como el niobio [94, 97].

e) Superaleación MA956 y las aleaciones con memoria de forma.

Recientemente, se han desarrollado materiales compuestos de base hierro para reducir costos en componentes resistentes al desgaste en la industria química y en industrias de procesamiento. En estos casos, en los que la resistencia a la corrosión es particularmente deseada además de la resistencia al desgaste, se pueden utilizar como material base varios tipos de acero inoxidable y superaleaciones. Desde que hace varios años se propusiera esta superaleación como posible nuevo biomaterial hasta nuestros días, se ha recorrido un largo camino en el que la inicial resistencia a la corrosión frente a sueros fisiológicos se ha visto acompañada de otras magníficas propiedades, que hacen de este biomaterial probablemente el más esperanzador para el empleo convencional en aplicaciones como prótesis de cadera y rodilla e implantes dentales.

La MA956 es una superaleación ferrítica, procesada vía pulvimetalurgia por aleado mecánico (MA) y mediante tratamientos termomecánicos. Su composición química es Fe-20Cr-4,5Al-0.5Ti-0.5Y₂O₃ (% en masa). Como se ve, lleva incorporado un dispersoide, el itrio (Y), que le proporciona una fase termodinámicamente estable cuando es sometida a altas temperaturas (superiores a 1050°C) y facilita la formación de una capa superficial, de unos

5 μ m, de α alúmina, fina, densa y muy bien adherida. Esta capa proporciona un excelente comportamiento frente a la oxidación, hasta el punto que resulta difícil determinarlo cuantitativamente. Pero además, los elevados esfuerzos residuales de compresión previenen la formación de grietas durante la deformación elástica, lo que favorece una buena resistencia al desgaste. Por último, esta capa de α alúmina induce una respuesta "in vivo" completamente satisfactoria, con un grado de biocompatibilidad excelente [99-101].

Por otro lado, el efecto memoria de forma está íntimamente relacionado con la pseudoelasticidad y ambos se basan en la transformación termoelástica martensítica (de fase austenita a fase martensita) que puede obtenerse por enfriamiento o inducirse por esfuerzos. En dicha transformación el material modifica su estructura cristalina a un sistema hexagonal compacto propio de la martensita, transformación que se produce sin difusión. Pues bien, la pseudoelasticidad se da si, una vez inducida una transformación martensítica mediante un esfuerzo, al cesar éste, la fase martensita producida resulta ser inestable en el rango de temperaturas en que se opera. La deformación producida durante la aplicación del esfuerzo se recupera al cesar, ya que la martensita vuelve a la fase inicial. Así mismo, al aplicar un esfuerzo por debajo de la temperatura de comienzo de la transformación martensita-austenita, el cambio producido en la forma permanece. Sin embargo, al calentar hasta la temperatura de finalización del proceso, el material recupera su forma inicial debido a dicha transformación producida. Así se obtiene la forma original de la fase inicial y se recupera la deformación de la fase martensítica, esto se conoce como "efecto memoria de forma".

Dentro de las diferentes posibilidades estudiadas, la aleación NiTi [102-103] combina las características del efecto memoria de forma y la pseudoelasticidad con una excelente resistencia a la corrosión y al desgaste, además de buena compatibilidad, lo que hace de ella un biomaterial muy apropiado, particularmente en cirugía ortopédica y odontología. De modo que, algunas posibles aplicaciones de estas aleaciones incluirían, arcos de ortodoncia, clips de aneurismas intracraneales, filtros de vena cava, músculos de contracción artificial, etc. En Francia y Alemania ya se han realizado con ellas algunos implantes ortopédicos como las grapas. En E.E.UU y Canadá las investigaciones se orientan hacia implantes cardiovasculares y hacia su utilización en microcirugía y cirugía no invasiva. Por último, cabe mencionar que en Rusia y China han utilizado estos biomateriales en prótesis coronarias y en implantes de corrección de columnas vertebrales, sin que hasta la fecha se hayan producido problemas asociados con rechazo o mal función del dispositivo protésico [104-107].

➤ Propiedades mecánicas de los biomateriales.

Las propiedades de un material y su superficie pueden servir para anticipar su comportamiento “*in vivo*” y la biocompatibilidad del mismo. Algunas de las propiedades mecánicas a las que con mayor frecuencia se hace referencia al describir las características de un biomaterial son: deformación elástica y plástica, resistencia a la fatiga, desgaste, fragilidad a la fractura, microestructura y dureza.

❖ Deformación elástica y plástica.

Cuando un material es sometido a una fuerza de tracción en una dirección se produce su deformación. De acuerdo a la ley de Hooke, un material sólido sometido a un esfuerzo de tensión se extiende en dirección de la tracción de manera proporcional a la carga, hasta cierto límite. Si el material recupera sus dimensiones originales cuando la fuerza es eliminada, se dice que ha sufrido una deformación elástica. En consecuencia, si el material se deforma de tal manera que no recupera sus dimensiones originales al ser eliminada la fuerza, se dice que ha sufrido una deformación plástica. El máximo esfuerzo que un material puede soportar antes de quedar permanentemente deformado se denomina límite de elasticidad. Cuando un metal es sometido a una deformación longitudinal elástica, se produce también un cambio en las dimensiones laterales, lo que se conoce como contracción [108, 85].

Ahora bien, si el material presenta propiedades idénticas en cualquier dirección en que sean medidas, la relación entre la deformación lateral y la deformación longitudinal se conoce como coeficiente de Poisson. La deformación plástica (plastodeformación) es entonces una deformación permanente y gradual causada por una fuerza continuada sobre un material. En muchos casos esta deformación lenta cesa porque la fuerza que la produce desaparece a causa de la propia deformación.

Cuando la plastodeformación se prolonga durante mucho tiempo el material acaba rompiéndose. Sin embargo, cuando la deformación plástica comienza, la deformación producida es superior a la deformación elástica; esta no es necesariamente proporcional al esfuerzo y no hay recuperación cuando este cesa ya que los cristales adoptan una nueva localización de manera irreversible. La verdadera plastodeformación solo es posible en materiales cuyos átomos están unidos por enlaces metálicos y es también llamada ductilidad o maleabilidad. En los metales, la plastodeformación se favorece

disminuyendo el tamaño de grano, especialmente en multifases, incrementando la fuerza del material [109-110].

❖ Resistencia a la fatiga.

El comportamiento en cuanto a la resistencia o rotura de una material se mide en función de su resistencia a la fatiga, misma que se produce cuando un material es sometido a una carga que es aplicada y removida por un número grande de ciclos, tal como ocurre en las prótesis articulares y las válvulas cardíacas. Aunque el esfuerzo máximo nunca supere el límite elástico, se producen microfisuras que se propagan en cada ciclo hasta que la superficie eficaz no puede soportar el esfuerzo máximo de la fuerza cíclica. En algunos metales, como las aleaciones de titanio, puede evitarse la fatiga manteniendo la fuerza cíclica por debajo de un nivel determinado. De manera convencional, el esfuerzo que provee una baja probabilidad de falla después de un número de ciclos es considerado punto de fatiga o resistencia límite del material. Este límite se evalúa generalmente en número de ciclos cercano a 10^6 o 10^8 [108-110, 85].

❖ Resistencia al desgaste.

La resistencia al desgaste de un material está asociada a proporcional a la dureza del material la facilidad o dificultad con la que pueden eliminarse partículas de su superficie. El proceso de desgaste está, por tanto, determinado por la formación de estas partículas en la región del material situada inmediatamente por debajo de la superficie de contacto. Las propiedades mecánicas de cada material y las variables concretas de cada problema, como la carga aplicada, la temperatura, la velocidad relativa o la geometría de los cuerpos en contacto, condicionan el mecanismo de desgaste. El desgaste en la mayoría de las aleaciones metálicas está controlado por procesos de deformación plástica que aproximadamente responden al modelo clásico de Archard [111], según el cual, cuando dos cuerpos deslizan uno sobre otro, el volumen desgastado es directamente Los materiales compuestos de matriz metálica reforzados con partículas se han desarrollado y estudiado en las últimas décadas con la intención de mejorar las propiedades de las aleaciones originales que constituyen la matriz base.

En relación al comportamiento frente al desgaste, los materiales compuestos pueden clasificarse en dos grupos en función del tipo de partícula utilizada. El primer tipo corresponde a las partículas duras como las de alúmina

o carburo de silicio que se añaden para aumentar la dureza del material y reducir así, de acuerdo con la teoría de Archard, su desgaste. El segundo opta por añadir partículas blandas como el grafito que tienen el propósito de servir de lubricantes sólidos [108-110, 85].

❖ Fragilidad a la fractura.

En los materiales reales la elasticidad no persiste indefinidamente. Si un material es sometido a una tensión creciente, este fallará por la presencia de defectos microscópicos que comienzan a crecer rápidamente hasta producirse una fractura. En la curva esfuerzo-deformación (Figura 4), el sitio donde la falla ocurre se denomina punto de fractura por estrés. Este comportamiento es típico de muchos materiales incluyendo vidrios, cerámicas, grafito, aleaciones duras y algunos polímeros como el polimetilmetacrilato. El número y el tamaño de los poros o de defectos del material son unas de las características microestructurales que más influyen en la fragilidad de un material [108-110, 85].

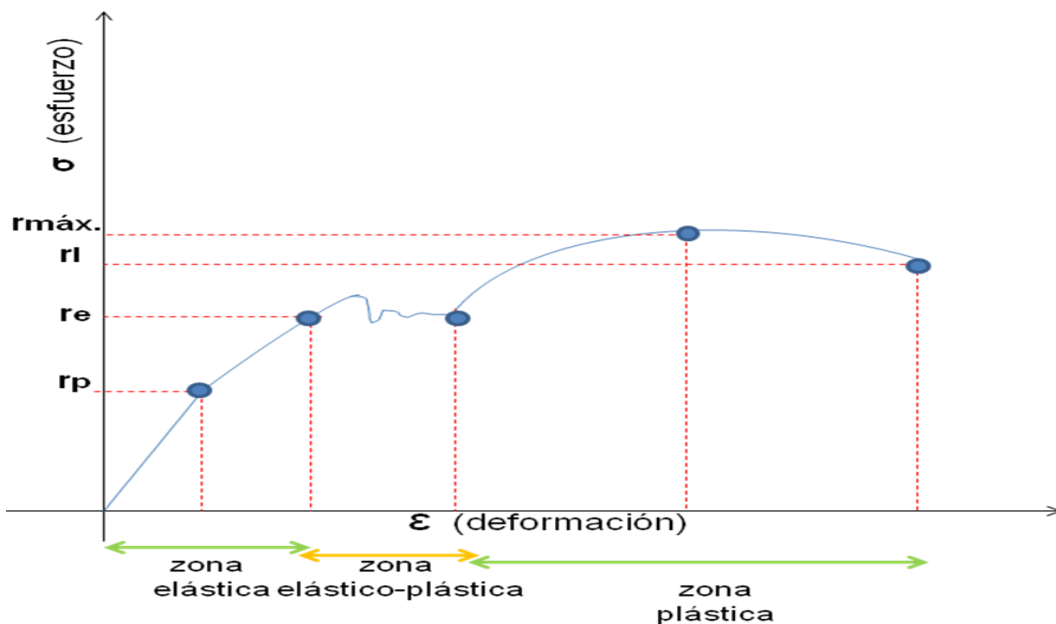


Figura 4. Curva esfuerzo-deformación [108-111, 85].

❖ Microestructura.

Un material está constituido por una jerarquía de niveles de organización. El nivel atómico es responsable del tipo de uniones interatómicas que el material presente. En los sólidos cristalinos, como los metales, los átomos se organizan

en un modelo esencialmente regular, los cristales, aunque la orientación de los mismos puede variar. Esto es, los cristales se unen unos con otros en diversas orientaciones formando granos que pueden estar fuertemente unidos entre sí. El tamaño de grano es una característica importante, puesto que mediante técnicas de ataque (etching) se ha observado que las muestras de un mismo material con granos finos son más fuertes, resistentes y uniformes si se comparan con las de un tamaño de grano mayor.

Cuando un material es puro, los cristales formados son similares y solo varían en su orientación formando granos similares, se dice entonces que el material se encuentra en una fase. En la mayoría de los materiales para implantes, coexisten dos o más fases. Por ejemplo, los sólidos amorfos presentan un orden pobre o de corto alcance, sin la simetría ni la regularidad de los sólidos cristalinos [108-110,85].

❖ Dureza.

Es la habilidad de un material para deformarse plásticamente bajo la influencia de un campo de esfuerzo complejo hasta un límite, antes de producir una fisura. La energía absorbida durante el impacto es una medida de esta característica. Ahora bien, si la deformación plástica no ocurre, para determinar la dureza se considera el esfuerzo a partir del cual se propaga una fisura. En ambos casos este punto se denomina factor de intensidad de esfuerzo y es un parámetro de la dureza a la aparición de fisuras y su propagación [108-110, 85].

➤ Limitaciones del diseño de implantes.

Todas las restricciones fisiológicas hacen que el diseño del implante ideal no sea posible, optándose en primera instancia por un diseño que comprometa algunos de los factores deseados o necesarios para su función específica. Por ejemplo, la compatibilidad biológica es uno de los requisitos básicos que deben ser considerados al momento de plantear el primer bosquejo o prototipo de dicho dispositivo protésico. Por otra parte, el implante no puede diseñarse con márgenes de seguridad altos para todas las condiciones de carga pues el volumen y la rigidez excederían los límites biológicos.

Un implante diseñado para una resistencia mecánica y a la fatiga altas, podría ser demasiado rígido y podría apantallar el hueso de las tensiones de

carga fisiológica (reducción de la carga sobre el hueso), posibilitando de esta manera al mal crecimiento óseo. Si la elasticidad de las placas y tornillos no está en relación adecuada uno a otro o al hueso, los tornillos pueden expulsarse fuera del hueso o pueden romperse, provocando fallas de crecimiento.

Si por el contrario, la placa es muy flexible la unión ósea puede fallar. Si las áreas cubiertas por las placas son muy grandes el suministro sanguíneo puede ser deficiente. Los implantes son usualmente diseñados para mantener su forma a menos que ocurra un accidente. Como se ha discutido previamente la resistencia a la fatiga no es ilimitada, con lo cual se han desarrollado técnicas quirúrgicas adecuadas para alcanzar fijaciones estables [68, 70-77, 108-11, 81].

1.3 Planteamiento del problema.

Las alteraciones del sistema musculoesquelético, ya sea por desórdenes de tipos congénitos o adquiridos del organismo, tienen importantes repercusiones en los ámbitos laboral, económico, psicosocial y familiar de las personas. Los padecimientos ortopédicos son todas aquellas alteraciones del sistema musculoesquelético a nivel óseo o de los tejidos blandos que provocan discapacidad funcional por dolor o deformidad. La patología de columna lumbar es objeto de múltiples estudios epidemiológicos en infantes, jóvenes y adultos, pero también en el sector empresarial por las repercusiones laborales que representan. La literatura reporta que la población en general presenta dolor de la región lumbar por lo menos una vez a lo largo de su vida en un porcentaje de entre el 60 y el 80% sin una causa específica [112]. Dicha patología incluye otros tipos de padecimientos que repercuten en la actividad diaria del individuo y que se ha estudiado poco. La incidencia de estos padecimientos conlleva consecuencias de tipo funcional que dan como resultado individuos discapacitados y en algunos casos incapacitados para llevar una vida independiente y un trabajo remunerado. Estos padecimientos son un problema de salud pública tanto en Estados Unidos como en otros países desarrollados [113]. Un estudio realizado en la ciudad de México reporta una discapacidad secundaria a los padecimientos antes descritos de entre el 1.4 y 10.4 por ciento.

Por otro lado, las pérdidas óseas por traumatismos se deben a varias causas entre las que se encuentran accidentes laborales en el hogar y de tránsito, que involucran fracturas de alta energía con aplastamiento,

desplazamiento, exposición ósea, resecciones tumorales o procesos infecciosos [114]. Debido a la frecuencia con que se presentan estos problemas, el sector médico se ha visto en la necesidad de implementar nuevos métodos para el tratamiento de estos padecimientos y es por ello que ha sumado esfuerzos junto con la comunidad de investigadores expertos de diversas áreas de la ciencia y la tecnología para dar respuestas a esas interrogantes sobre el abordaje de dicho problema y en dicha tarea, surgieron como primer auxilio, los implantes o dispositivos protésicos.

Los reemplazos articulares se incrementaron en gran medida desde su aparición (70's) a la fecha. Si se tiene en cuenta el manejo pre, intra y postoperatorio, así como la rehabilitación a la que deben ser sometidos los pacientes, el costo de los implantes es bastante elevado. El objetivo de los implantes ortopédicos es restaurar la integridad estructural y la funcionalidad de los tejidos fuertemente dañados, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, en muchas ocasiones cuando se coloca un implante puede fallar su resistencia bajo las condiciones fisiológicas de carga o puede darse una inadecuada integración del biomaterial con el hueso, lo cual conlleva al aflojamiento del implante en su posición con degradación del hueso adyacente y en muchas ocasiones a la necesidad de remover el dispositivo colocado (rechazo). Lo anterior lleva a que se reexamine e investigue continuamente sobre el diseño, desarrollo y formulación de nuevos materiales con la idea de llegar al implante que, además de ser no tóxico, resistente a la fatiga y a la corrosión, promueva la neoformación de hueso con adhesión celular sobre su superficie, primer paso para que el tejido óseo se integre estructural y funcionalmente al biomaterial (osteointegración).

1.4 Hipótesis y objetivos.

Habiendo presentado el planteamiento del problema en función de la biocompatibilidad que debe existir entre el implante y el medio biológico al cual será insertado, se presentan en este capítulo la hipótesis, objetivos y metas propuestos para la realización de este trabajo de investigación a fin de responder ciertas interrogantes en virtud de la función no solo del tratamiento superficial del material metálico usado como sinónimo de modificación morfológica sino de la importancia que conlleva el producir un cambio con características bioactivas a fin de lograr la osteointegración necesaria para el buen funcionamiento de dicho implante .

1.4.1 Hipótesis.

La modificación de la superficie de prótesis fabricadas con aleaciones de titanio, favorece el reconocimiento por parte del huésped, disminuyendo así el rechazo hacia el implante. Asimismo, se considera que favorece el crecimiento y la adhesión de las células óseas, mejorando así su biocompatibilidad.

1.4.2 Objetivo general.

Mejorar la biocompatibilidad de prótesis ortopédicas mediante la construcción de nanoestructuras de superficies bioactivas que promuevan la regeneración de células óseas en implantes de uso ortopédico.

1.4.3 Objetivo particular.

1.- Generar sustratos de aleaciones de titanio de uso ortopédico modificados superficialmente, para estimular la bioadhesión de osteoblastos.

1.4.4 Metas.

1. Preparación y modificación de la superficie del sustrato metálico.
2. Evaluación de la superficie de prótesis ortopédicas antes y después de la modificación.
3. Monitorear el desarrollo de la película inorgánica mediante técnicas electroquímicas, espectroscópicas y de análisis de superficie.
4. Evaluar la biocompatibilidad de los osteoblastos en la prótesis modificada.
5. Cultivar células óseas en medio fisiológico sintético.

Capítulo 2: Marco teórico.

No hay método más poderoso para introducir conocimiento en la mente que presentarlo de cuantas maneras diferentes se pueda. Cuando las ideas, después de penetrar por diferentes entradas se reúnen en la ciudadela de la mente, la posición que ocupan se toma inexpugnable.

James Clerk Maxwell (1831-1879).

Por muchos años, el objetivo principal de los estudios en el área biológica, ha sido el poder modelar *in Vitro* el comportamiento celular y la respuesta de estas células en presencia de diversos estímulos, para así poder entender los diferentes mecanismos existentes en los organismos celulares de los seres vivos. El trabajo multidisciplinario ha llevado al desarrollado de materiales con excelentes propiedades mecánicas, biomiméticos, inteligentes y funcionales que interactúan con las células y con los componentes de la matriz extracelular mejorando la respuesta biológica del tejido óseo ante el implante. En el presente capítulo se dan a conocer, los antecedentes y el fundamento teórico asociados a la modificación superficial llevada a cabo en substratos o materiales de matriz metálica usados en la fabricación de prótesis implantables, las técnicas de análisis de superficies de los substratos modificados así como el planteamiento del problema que sustenta el trabajo de investigación realizado.

2.1 Antecedentes.

El estudio del comportamiento de los implantes ortopédicos está basado en la biomecánica, es decir: la mecánica aplicada a la biología en general y particularmente al cuerpo humano, para poder entender su funcionamiento, postura y movimiento. La biomecánica se ocupa del aparato locomotor que depende de la interacción entre el esqueleto y los músculos, del desempeño mecánico del sistema cardiovascular y el flujo sanguíneo; contribuyendo por ejemplo a la optimización de las técnicas aplicadas en el entrenamiento y la práctica deportiva [66]. Numerosas lesiones de deportistas se remedian mediante tratamientos e implantes ortopédicos temporales para ayudar en la recuperación de los tejidos originales o implantes permanentes, cuando el material debe permanecer de por vida para mantener la funcionalidad original

requerida. En el caso de accidentes viales y laborales traumáticos, se requiere la colocación de implantes ortopédicos que le proporcionen al cuerpo su capacidad de movimiento y de trabajo [66]. En este ámbito es usual incrementar los valores de fuerza mecánica de los implantes metálicos mediante tratamientos termomecánicos que crean una microestructura favorable, aumentando así la tenacidad, durabilidad y resistencia a la fractura por fatiga (Tabla 7) [66].

Así mismo, se incrementa la dureza y la resistencia al desgaste de la superficie por fricción con el hueso, evitando que el implante se afloje en su posición y esto genere o provoque inflamación y dolor. Este fenómeno ocurre a veces en implantes de las articulaciones de rodilla y/o el codo formados por materiales plásticos y metálicos. Durante este frotamiento se desprenden del implante partículas sólidas que podrían ser tóxicas o cancerígenas, según la naturaleza del metal involucrado. En verdad, no se conoce bien el impacto químico-biológico a largo plazo por la formación de complejos órgano-metálicos, posiblemente metal-proteínas provenientes de la degradación de los implantes [66].

Tabla 7. Propiedades elásticas de aleaciones de titanio [66].

Aleación	Tensión de ruptura (MPa)	Límite elástico (MPa)	Elongación (%)
Ti grado 1-4	240-550	170-485	24-15
Ti-6Al-4V	860	795	10

En el caso de implantes, un modelo *in Vitro* de cultivo celular de hueso humano ha sido desarrollado por Anselme y sus colaboradores, donde la formación de una interfase célula/material permite reproducir la interfase tejido/implante presente *in Vivo* durante los primeros días de contacto celular. Este modelo consiste en el cultivo de células osteoblásticas humanas sobre substratos modelos (modificados), con el propósito de estudiar la adhesión a corto plazo de células en contacto directo con la superficie nativa, la absorción de proteínas del suero y estudiar también la adhesión celular a largo plazo (Figura 5). La adhesión celular a largo plazo, significa la fuerza interfacial célula/material existente cuando las células han formado una matriz extracelular interfacial (ECM), la cual es un arreglo intrincado de glicoproteínas, colágenos, proteinglicandos y factores de crecimiento que actúan no únicamente como un peldaño físico para la unión celular y organización de estructuras celulares; sino también como un medidor de señal intracelular a

través de superficies celulares receptoras. En este modelo la ECM formada por fibronectina, colágeno tipo I y osteopontina, es sintetizada por la capa de células osteoblásticas sobre la superficie del material [58, 32].

La Figura 5 muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras estudiadas por Anselme, en la cual se observa la morfología de la superficie de la capa celular crecida sobre sustratos modificados mecánicamente, éstas según sus autores presentan características óptimas para la adhesión a corto de las células en contacto con la superficie nativa. Sin embargo, enfatizan que las muestras electro-erosionadas finamente presentan mejores condiciones de adhesión puesto que a 14 días de cultivo se aprecia la formación de ECM, lo cual supone un desarrollo a largo plazo de los constituyentes de la propia matriz y con ello promover la formación de tejido óseo.

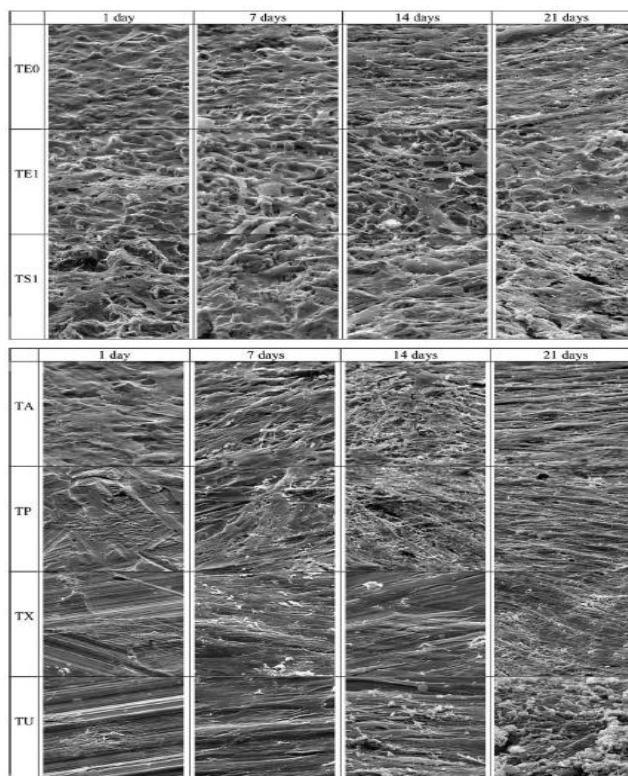


Figura 5. Superficies estudiadas después de 1, 7, 14 y 21 días de cultivo celular. SEM para superficies electro-erosionadas rudas (TE1) y finas (TE0), pulidas con arena (TS1), abrasión (TA), pulidas (TP), labradas con surcos verticales (TX) y labradas con surcos paralelos (TU). Bar=20µm [32].

Por otro lado y referente a este modelo, Meyer y sus colaboradores [32] han demostrado la presencia de células y proteínas de la matriz interfacial, desde el primer día de contacto en implantes dentales de titanio en la mandíbula de

mini-cerdos [115]. La metodología de preparación y estudio de las muestras, incluye parámetros como cultivo celular (solución fisiológica), morfología celular, modificación superficial de los sustratos (tratamientos químicos o físicos), medición de rugosidad superficial (profilómetro), cuantificación celular (adhesión, proliferación y diferenciación), respuesta celular (biocompatibilidad, bioactividad) y análisis microscópico.

La Figura 6 muestra los métodos comúnmente utilizados para modificación superficial. El tratamiento de remoción proporciona al material superficies suaves con rugosidad definida, la oxidación produce películas pasivas con espesores deseados, cuya estructura y composición hacen al material altamente resistente a la corrosión en fluidos biológicos y finalmente los recubrimientos mejoran la adherencia de células biológicas así como la funcionalidad en diversas aplicaciones [41].

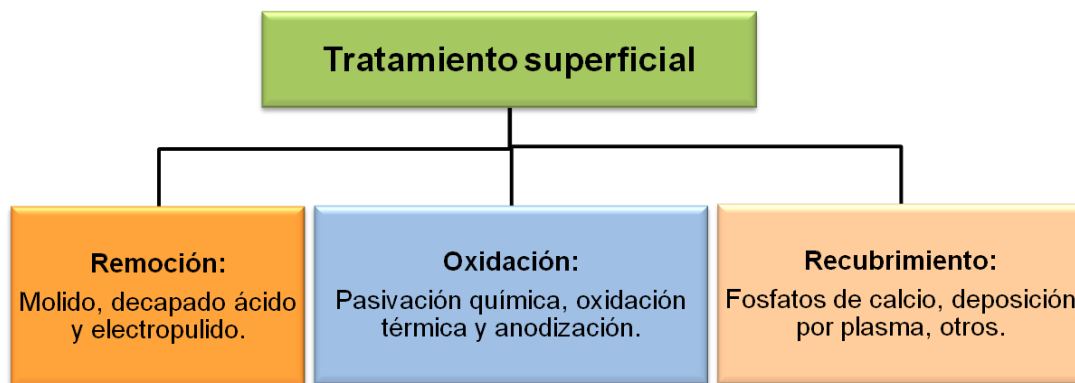


Figura 6. Clasificación de diversos tratamientos superficiales [41].

Por ejemplo y para el caso del tratamiento de remoción, el molido o esmerilado de metales se lleva a cabo por medio de otro metal. Diferentes tipos de esmeriles son utilizados para obtener la superficie deseada, entre éstos predominan las lijas, esponjas, cepillos, pastas y emulsiones. El esmerilado mecánico se lleva a cabo paso por paso, iniciando con un tratamiento rudo a la superficie y alternando el uso de esmeriles finos. Las partículas empleadas son materiales duros como óxido de aluminio (Al_2O_3), óxido de zirconio (ZrO_2), carburo de silicio (SiC), óxido de silicio (SiO_2), carburo de tungsteno (WC), carburo de boro (BC) y diamante. El paso final de este tratamiento de remoción sería pulir la superficie de manera mecánica [41]. La pasivación química como fuente de oxidación, requiere de un fuerte agente oxidante. Comúnmente estos agentes son soluciones de ácido nítrico a concentraciones de 10% [116] o 20% a una temperatura de 80°C aplicados durante 20min [117]. Otra manera, es hervir los sustratos en perhidrol (30% H_2O_2) por 60min. La ventaja de la

pasivación química es su simple aplicación, es decir; la pieza de trabajo es sumergida en la solución de pasivación por un tiempo determinado, se lavan con agua y finalmente se deja secar a la atmósfera deseada [41].

Los recubrimientos de fosfato de calcio por su parte, son favorables en términos de tratamiento superficial para el NiTi como un material de implante. Tales recubrimientos pueden tener la suficiente adhesión al NiTi que se comporten estables mecánicamente y resistan tanto la fuerza de corte (superelasticidad) como la transición de memoria de forma. Lo esencial en este tipo de propiedades es la presencia de una estructura microcristalina y porosa, obtenida a partir de una solución sobresaturada. La sobresaturación garantiza la nucleación homogénea y provee a la estructura cristalina con una buena adhesión de células humanas. Se reportó el uso y la aplicación exitosa de una solución de calcificación supersaturada compuesta de 1.8mM K⁺, 3.0mM H₂PO₄⁻, 6.0mM NO₃⁻; la cual generó una capa de 10μm después de 24hrs de inmersión a 20°C [118-119, 41].

La respuesta celular en virtud de la incorporación de iones a recubrimientos o sustratos se ve favorecida y el crecimiento de células idénticas sobre la superficie de estos compuestos muestra la importancia de los tratamientos superficiales. Por ejemplo y según estudios de Wang y sus colaboradores [5], la respuesta celular para recubrimientos de FHA muestra índices grandes de proliferación y ésta densidad no se ve afectada con el grado de fluorización (Figuras 7 y 8); obsérvese que el grado de sustitución de los grupos (OH)⁻ por (F)⁻ es indicado por el valor de X en la formula general de la hidroxiapatita fluorada, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)_{2-x}F_x, donde X fue seleccionado como 0/3, 2/3, 3/3, 4/3 y 6/3 y los subsecuentes recubrimientos obtenidos fueron nombrados como F₀, F₂, F₃, F₄ y F₆. Sin embargo, niveles de flúor entre 0.84 y 1.04 muestran índices superiores (Figura 9).

Esto puede ser explicado considerando la estructura desordenada de la HA, esto es; un hidrogeno (H⁺) de un grupo hidroxilo (OH) puede unirse con un O²⁻ de diferentes direcciones y una vez que cada grupo OH es sustituido por un F⁻, un enlace fuerte de H se forma entre el F⁻ y el grupo OH más cercano dando lugar a una estructura más ordenada con estabilidad térmica y química [120].

Por su lado, las cerámicas de fosfato de calcio como la hidroxiapatita, el β-fosfato tricálcio y el fosfato bifásico de calcio han sido ampliamente utilizadas debido a su composición mineral similar con el hueso, su bioactividad (formación material de hueso tipo apatita sobre su superficie e interfase

biomaterial CaP-hueso) y su osteoinductividad (capacidad para proveer la base indicada en la formación de hueso) [121-127]. Tradicionalmente las cerámicas han sido fabricadas por síntesis de polvos de CaP a altas temperaturas, donde las propiedades mecánicas y estructurales son controladas por diversos factores tales como la composición de los polvos cerámicos, la temperatura de síntesis y el tiempo de síntesis [126-130].

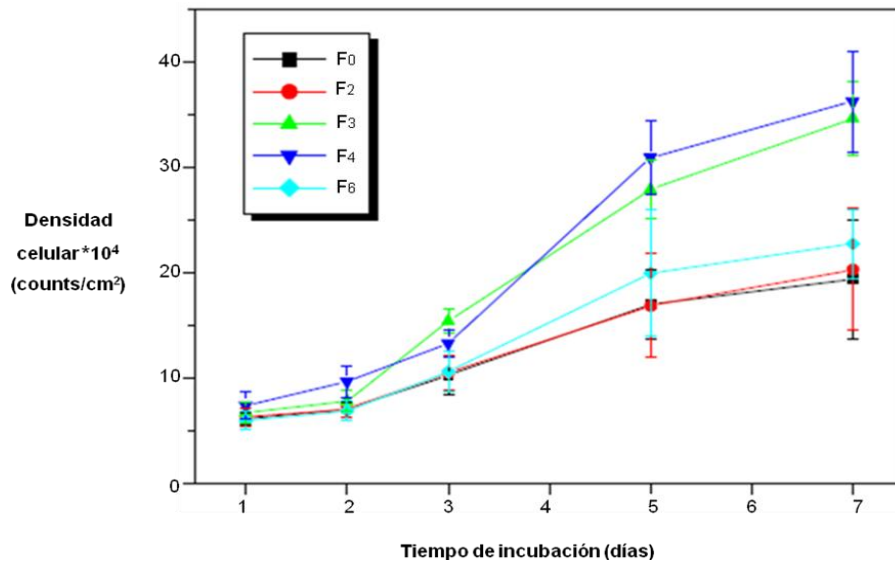


Figura 7. Proliferación celular de MG63 sobre recubrimientos de FHA [5].

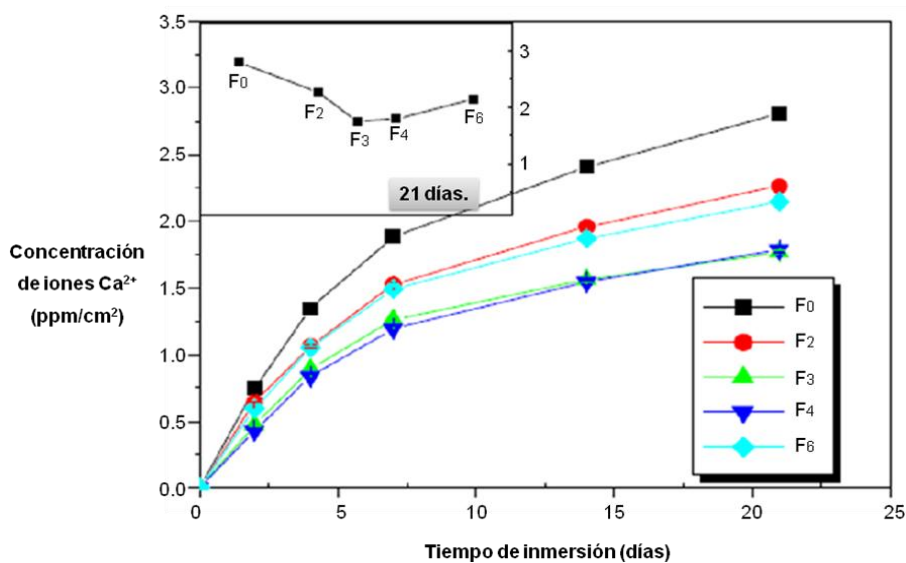


Figura 8. Comportamiento disolutivo de recubrimientos de FHA en solución salina fisiológica: concentración de iones Ca^{2+} como una función del tiempo de inmersión. En el recuadro: concentración total después de 21 días [5].

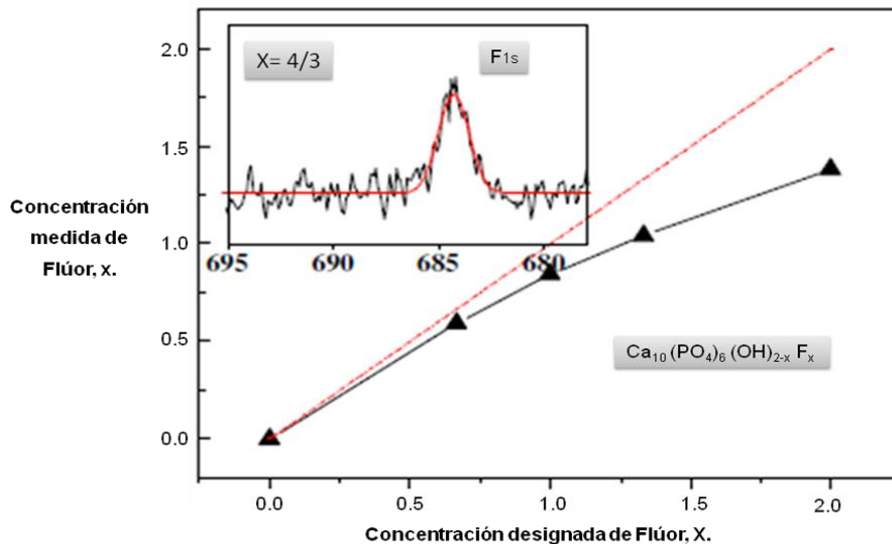


Figura 9. Concentración de Flúor en recubrimientos de HA, línea punteada: valor designado, triángulos: valor medido. En el recuadro: espectro XPS típico de iones F^- en los recubrimientos [5].

Los invertebrados *Phylum Mollusca*, incluyen clases minerales como *Gastropoda* y *Bivalvia* que tienen capas externas calcáreas de suficiente masa y tamaño que son consideradas para implantes biomédicos humanos (Figura 10). Las capas de estos moluscos son compuestos micro-laminados de minerales y biopolímeros, constituidos típicamente de $CaCO_3$ (95-99% W) y macromoléculas orgánicas (1-5%) [131]. Estos compuestos son nanoscópicamente regulares y exhiben una fuerza 3000 veces más grande que los cristales minerales en sí mismos [131-133]. Por ejemplo, las conchas de almeja gigante (*Tridacna gigas*) y de caracol (*Strombus gigas*); presentan propiedades mecánicas tales como fuerza y módulo compresivo que las hacen similares al hueso humano [134, 130].

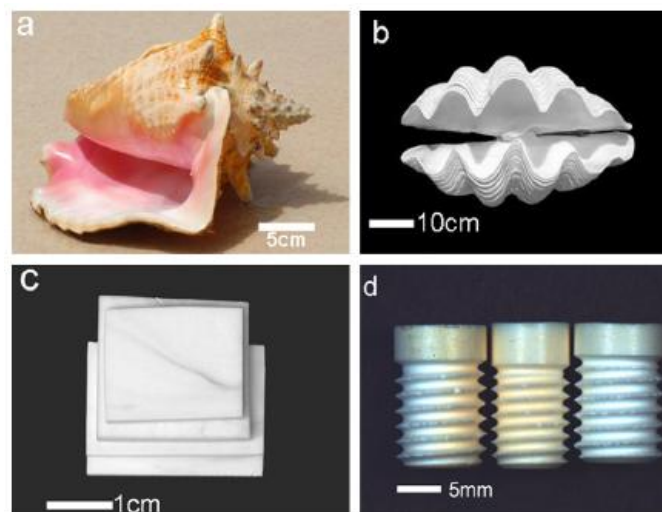


Figura 10. Imagen óptica de: a) *S. gigas* (concha de caracol), b) *T. gigas* (concha de almeja gigante), c) piezas laminares obtenidas por conversión térmica y d) tornillos de concha de caracol y almeja [130].

En el caso de la *T.gigas*, la concha de almeja gigante puede pesar más de 180kg, medir 1.5m de diámetro y tener un grosor de aproximadamente 8cm. La fuerza compresiva de este compuesto puede variar entre 50 y 200MPa, dependiendo de los efectos estructurales presentes [134]. Ahora bien, para la *S.gigas*, la concha de caracol puede llegar a crecer aproximadamente 30cm de longitud, pesar varios kilogramos y tener un grosor de pared de 1cm. La fuerza compresiva de esta especie puede variar entre 140 y 300MPa [134]. Por otro lado, investigaciones hechas por Vecchio y sus colaboradores [130] en relación a estos compuestos minerales, muestran la funcionalidad, biocompatibilidad y bioactividad que presentan.

En dicha investigación, conchas de almeja y caracol fueron convertidas en hidroxiapatita utilizando métodos hidrotérmicos a diferentes temperaturas y tiempos de conversión. Estructuras densas de HA fueron creadas a partir de las conchas minerales obteniendo mejores resultados a temperaturas bajas (200°C) y estrés de corte para muestras de caracol parcialmente convertida (137-218MPa) y muestras de almeja totalmente convertida (70-150MPa) fueron encontrados respectivamente. El valor de estrés de corte medido para conchas de almeja nativa y totalmente convertida, es similar a la fuerza mecánica de un hueso humano compacto; lo cual indica que estos compuestos pueden ser usados como implantes para carga pesada [130].

En conclusión, las investigaciones hechas en relación a diversos materiales fabricados por medio de diferentes métodos u obtenidos en forma natural; nos permiten pensar en el uso favorable de estos compuestos en nuestra vida diaria y cómo éstos afectan nuestro entorno y calidad de vida. Sin lugar a dudas la mayor apreciación de estos materiales y sus usos, es desde el punto de vista médico o biológico; donde los seres vivos y su hábitat coexisten.

2.2 Tratamiento superficial vía el método de oxidación electroquímica.

Desde los años ochenta, las aleaciones de titanio han sido ampliamente utilizadas en la manufactura de aparatos de uso biomédico (implantes ortopédicos y dentales) debido a sus características de biocompatibilidad, resistencia a la corrosión (formación de una película de óxido protectora), ligereza, maleabilidad mecánica, comportamiento osteointegrativo, entre otras. La película de óxido formada sobre la superficie del metal, principalmente TiO₂, juega un papel muy importante por su alta estabilidad termodinámica y efecto

pasivante, al actuar como un inhibidor de la liberación de iones. Por otra parte, la generación de una superficie con características bioactivas, permite el pronto crecimiento de hueso hacia y desde esta superficie, posibilitando al recubrimiento a cumplir con la tarea de regeneración ósea deseada, al mismo tiempo que al implante, a cumplir la función mecánica planificada.

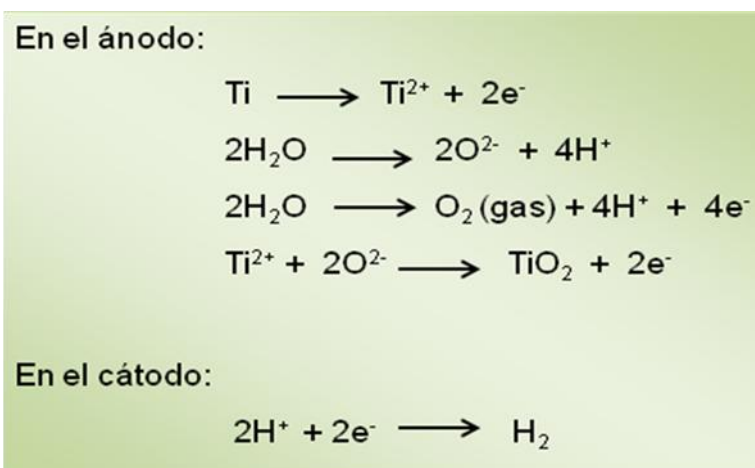
Dentro de las metodologías utilizadas para la generación de esta película sobre el sustrato metálico, se encuentran procesos de sand blasting, oxidación electroquímica, recubrimientos de fosfatos y tratamientos químicos [135-136]. Sin embargo y atendiendo a las necesidades tecnológicas de nuestros días, compuestos estructurados a nano-escala han sido ampliamente estudiados debido a su aplicación en áreas como óptica y electrónica, en donde las películas delgadas de TiO_2 exhiben propiedades foto-catalíticas importantes las cuales ofrecen potenciales aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, nanotubos de óxido de titanio pueden ser preparados por varias técnicas tales como método sol-gel, deposición electroforética y anodizado, cuyos parámetros importantes, son la adhesión e integridad de esta capa.

La deposición electroquímica se puede realizar por dos variantes; mediante la formación directa del recubrimiento sobre el sustrato metálico que actúa como cátodo o la formación de una capa de óxido anódico con incorporación de Ca y P para luego obtener sobre esta capa de óxido modificada el recubrimiento de hidroxiapatita. En la literatura se ha reportado el anodizado de Ti en presencia de compuestos de calcio y fosfato de forma que se obtiene una película de óxido de Ti que contiene ambos iones. Esta variante permite lograr un adecuado enlace entre el metal y el sustrato por medio de un cambio gradual en la composición y estructura de las capas intermedias así como un potencial incremento de la dureza y de la resistencia a la corrosión y al desgaste por medio del crecimiento de la capa de óxido. Estudios de este tipo se han enfocado sobre todo en el Ti y sus aleaciones, que forman capas de óxido no estequiométricas, de gran adherencia y muy resistentes a la corrosión.

2.2.1 Anodizado electroquímico.

El anodizado electroquímico es un proceso que mediante las reacciones de los electrodos en combinación con un campo eléctrico aplicado sobre un sustrato metálico y la difusión de iones de oxígeno, permiten la formación de una película de óxido en la superficie del ánodo [137-138]. Películas protectoras de este tipo se pueden lograr por oxidación anódica en metales tales como titanio

y aluminio. Este proceso puede ser utilizado para producir el aumento del espesor del óxido, coloración y porosidad en los recubrimientos [139]. Las características fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de tales óxidos anódicos pueden variar en un amplio intervalo, dependiendo del o os parámetros en el proceso que sean modificados; tales como el potencial del ánodo, la densidad de corriente, la composición del electrolito y la temperatura [139-140]. Las principales reacciones que conducen a la oxidación anódica de la superficie de titanio son las siguientes [141]:



El campo eléctrico aplicado externamente moviliza a los iones Ti^{2+} y O^{2-} mediante una dinámica redox, misma que conduce al crecimiento de la película de óxido. Esta película de óxido exhibe alta resistividad si se compara por ejemplo con el electrolito y los dispositivos metálicos del circuito, de tal modo que la caída de tensión se realizará principalmente sobre la película de óxido anódico. El óxido continuará creciendo siempre y cuando el campo eléctrico sea lo suficientemente fuerte como para conducir a los iones a través de la película, misma que aumentará su espesor y crecimiento dependiendo casi linealmente a la tensión aplicada hasta que la ruptura de la película se produzca [41, 142-143]. La ruptura dieléctrica depende de la naturaleza del electrolito y aunque puede variar en un amplio rango, generalmente se presenta entre los 100 y 160V [139].

El proceso de anodización puede llevarse a cabo tanto a voltaje constante como a corriente constante; cuando el proceso de anodizado se lleva a cabo a voltajes más altos que el límite dieléctrico, el proceso dará lugar a un aumento en la generación de gas, provocando con esto el engrosamiento y el desarrollo de una morfología porosa de la película superior.

2.2.2 Anodizado por pulsos.

En el párrafo anterior se mencionó que el proceso de anodizado se puede llevar a cabo a potenciales no alternos y con valores constantes en su intensidad. Sin embargo, es posible realizar la formación de la película de óxido metálico aplicando un potencial a pulsos, es decir, pulsos de tensión cuya magnitud varía desde un valor positivo (semiciclo anódico) hasta uno negativo (semiciclo catódico) existiendo entre ellos un lapso muerto o de desconexión (circuito abierto), lo cual genera mejores condiciones al sistema y un control más adecuado de los parámetros en consideración [144-147]. La Figura 11 muestra una curva esquemática de la onda cuadrada formada por los pulsos anódico y catódico del potencial típico utilizado para realizar este proceso comúnmente llamado anodizado por pulsos o anodización pulsada [148-149]. Cabe señalar que muchos investigadores sugieren que dependiendo de los parámetros a medir en el sistema, es conveniente hacer un buen diseño de dichos pulsos en función del tiempo de duración de los semiciclos, la alternancia entre ellos y su amplitud.

La anodización por pulsos utilizando una onda cuadrada a bajas frecuencias fue originalmente descrita por Yokoyama y sus colaboradores [150-151], donde se especifica que t_1 debe ser mayor que t_2 para generadores de pulsos con tiempo neto de duración de los mismos entre 10 y 180s, esto con la finalidad según mencionan este grupo de investigadores de hacer más eficiente el proceso (tiempo y ahorro energético) y tal alternancia de las fases anódicas y catódicas permite incrementar la resistencia al desgaste y a la corrosión de la capa de óxido formada, al mismo tiempo que mejorar la uniformidad en el grosor de la misma; características mecánicas deseables para un buen desempeño del material según las aplicaciones ideadas en el área biológica o ingenieril [152, 154-156].

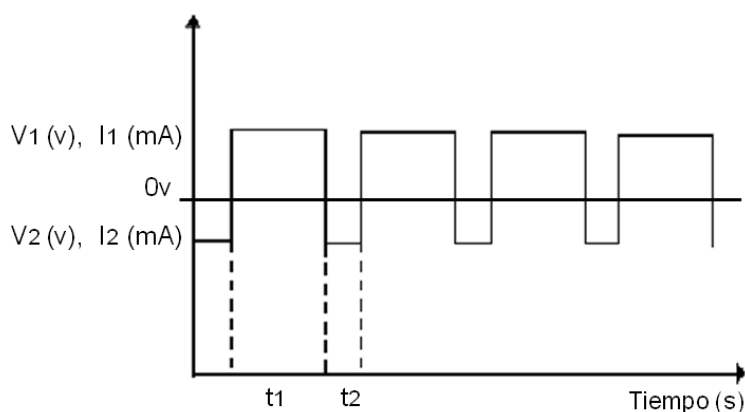


Figura 11. Diagrama de corriente: onda cuadrada formada por los pulsos anódico y catódico [144].

Por otro lado, y refiriéndonos específicamente al hecho de que la capa de óxido formada sobre la superficie del metal tiene un arreglo geométrico característico, es este mismo hecho lo que le imparte aún más valor e importancia en términos de la generación de una mayor área superficial que facilita la inmovilización de material de tipo biológico, como enzimas y células; con propiedades de transporte electrónico y resistencia mecánica poco estudiadas o abordadas en su totalidad y que presumen tener una gran aplicación tecnológica [145, 152-154]. Ahora bien, la metodología del proceso de anodizado por pulsos es la técnica más aplicada a nivel mundial para la formación de nanotubos de TiO_2 en soluciones electrolíticas ácidas o formadoras de complejos que contienen especies como NH_4^+ y F^- y modificadores como glicerol, etilenglicol, polietilenglicol (PEG 400) o mezcla de ellos [157, 165-167].

La formación de los nanotubos en sí misma y sus características geométricas tales como diámetro, espesor de la pared y la longitud dependen estrictamente de la composición de la solución, la amplitud del potencial aplicado o la corriente y el tiempo en el cual se lleva a cabo el proceso de anodizado electroquímico [168]. Sin embargo, el factor más importante para determinar la morfología del nanotubo es precisamente el equilibrio entre los procesos electroquímicos (óxido en crecimiento debido al ataque del metal) y la disolución química del metal base causada por el electrolito ácido o complejo de conformación [169-172]. Cuando la velocidad de disolución química es demasiado alta o demasiado baja (dependiendo de la concentración de F^-) las estructuras nanotubulares no se pueden formar debido al crecimiento del propio óxido de manera muy rápida o muy lenta. Por otro lado, cuando la disolución química es relativamente lenta en comparación con el crecimiento de la capa electroquímica de óxido, la disolución per se, se convierte en el factor determinante en el autoensamblaje de dicho óxido [173].

Algunos autores reportan la aplicación de impulsos de tensión en vez de voltaje o corriente constantes, obteniendo con ello morfologías de nanotubos mejor definidas y cuya técnica descrita posibilita un mejor control y la optimización de los parámetros de la capa nanoestructurada [174-184]. La pasivación superficial resultante de la adsorción de iones NH_4^+ provenientes del seno de la solución, que inhiben la formación del óxido, también se ve afectada por la relación de duración del impulso, la naturaleza de los modificadores en el electrolito y sus concentraciones, debido a que el pulso catódico provoca la disolución de las paredes de los nanotubos suprimiendo así las especies adsorbidas [173]. Como mencionan Chanmanee y sus colaboradores [173], el aumento de la duración del pulso catódico conduce a la formación de nanotubos más cortos con paredes gruesas (espesores grandes),

demostrando así la habilidad de controlar las características geométricas de los nanotubos formados con tan solo variar la duración de los impulsos.

Finalmente, es importante mencionar que la finalidad o el objetivo en la implementación de estas técnicas con nuevas metodologías radica en estudiar el efecto de la aplicación de un periodo de "circuito abierto" en pro de la morfología de las nanoestructuras formadas (longitudes pequeñas y diámetros mayores), permitiendo una mejor cobertura de la superficie metálica modificada con un material tipo cerámico como por ejemplo la hidroxiapatita.

2.3 Caracterización del sustrato metálico mediante análisis de superficie.

La inspección de la integridad de la capa de óxido formado sobre la superficie del sustrato metálico así como la formación del recubrimiento de HA se lleva a cabo mediante diversas técnicas microscópicas. A continuación se mencionan algunas de ellas como parte del proceso de caracterización superficial que se tomará en cuenta para las muestras tratadas vía los métodos de modificación superficial antes mencionados.

2.3.1 Microscopía metalográfica.

Se observará en microscopios metalográfico y estereoscópico a las superficies de titanio que serán sometidas a evaluación, con el fin de conocer acerca de la morfología y revelar si la microestructura del metal es atacada al someterse en condiciones fisiológicas. Las muestras que sean observadas al microscopio metalográfico serán previamente montadas en resina, pulidas y atacadas químicamente para revelar su microestructura. El equipo a utilizar es un microscopio metalográfico Swift con capacidad hasta 1000 X y un estereoscopio marca Leica con capacidad de 40X.

2.3.2 Microscopía de barrido electrónico (MBE/SEM).

Con el MBE se obtendrán imágenes tridimensionales de alta resolución de la superficie. La muestra es bombardeada con un haz de electrones, con lo cual se liberan electrones secundarios de la superficie de la muestra. Un detector

interno sistemáticamente “cuenta” esos electrones, registrando los datos de origen e intensidad de emisión, los cuales posteriormente se utilizan para construir una imagen de alto contraste y alta resolución. Muestras de prótesis ortopédicas, así como de polvos de productos de corrosión e incrustaciones serán observadas en un MBE marca JEOL-JSM-6360. El pretratamiento de las muestras consistirá en secarlas, fijarlas con glutaraldehído y posterior deshidratación con alcohol y aplicación de un baño metálico de oro si es necesario para su mejor observación en la cámara de vacío.

2.3.3 Rayos X de electrones dispersados (EDX).

El microscopio posee un espectrómetro de Rayos X de electrones dispersados (EDX, por sus siglas en inglés), el cual se utiliza para determinar la composición elemental de la porción de la muestra que está siendo observada. Cuando la muestra es bombardeada con el haz de electrones del MBE, ésta emite rayos X que son capturados por el EDX. Debido a que cada elemento emite rayos X con energía y longitud de onda específica, la unidad EDX es capaz de determinar qué elemento es responsable de la emisión. Esta información puede sobreponerse en una micrografía y producir un mapa elemental virtual de la superficie de la muestra.

2.3.4 Microscopía de fuerza atómica (MFA/AFM).

Esta técnica tiene por objeto reproducir la topografía de la superficie bajo estudio, magnificándola hasta resolución nanométrica e, incluso, atómica. Para ello se sirve de diferentes interacciones entre la muestra y una sonda que se le aproxima tanto como sea necesario para que dichas interacciones sean relevantes. La interacción es la fuerza de atracción/repulsión entre los átomos de la sonda y la muestra, pudiéndose operar tanto en la zona repulsiva (modo de contacto) como en la atractiva (modo de no-contacto), lo cual nos permitirá visualizar con gran detalle las características de las prótesis ortopédicas. El equipo a utilizar es Quesant Q-250.

2.4 Recubrimiento biocompatible.

Varios estudios han demostrado que los componentes metálicos de las aleaciones utilizadas como implantes pueden ser tóxicos y disolverse en los fluidos fisiológicos debido a la corrosión [185-186]. Cada metal tiene su propia

toxicidad intrínseca con las células, pero es la corrosión quien controla la concentración existente. De modo que la biocompatibilidad de las aleaciones metálicas está determinada por ambos, la resistencia a la corrosión y la toxicidad de los metales individuales. La corrosión de los metales en soluciones acuosas tiene lugar vía mecanismos electroquímicos los cuales son específicos de cada metal [187-188]. Mientras más noble sea el metal, menor es su corrosión. Sin embargo, las reacciones que ocurren en la superficie del metal al estar en contacto con el medio específico pueden modificar radicalmente su nobleza.

Después de la implantación, el metal está rodeado de iones séricos, proteínas y células, los cuales pueden modificar de manera local la resistencia a la corrosión del metal. De hecho, la resistencia del metal medida *in-vitro* en medios no fisiológicos puede ser totalmente diferente de la resistencia medida *in-vitro* en medios fisiológicos y aún más diferente de la respuesta *in-vivo* [189-192]. Hay una gran variedad de factores que afectan la corrosión del metal, desde factores superficiales del implante como porosidad o corrosión hasta características mismas de la distribución de cargas en el implante o la estructura, composición y espesor de la capa pasiva del metal, la cual a su vez dependerá del procedimiento del metal y de sus propiedades superficiales.

La pasivación es la formación de una capa de óxido metálico compacta que protege al metal cuyas propiedades y estructura varían de acuerdo al metal en cuestión y son complejas. Durante el proceso de corrosión del metal en el cuerpo humano, el cual en general es altamente salino, los iones metálicos son disueltos de los puntos en los que la capa de óxido no está totalmente formada a través de la formación de un complejo metal-cloruro que se disuelve en el fluido fisiológico. Esto limita la pasividad de dicho metal de manera local, lo cual posibilita la creación de una zona anódica muy pequeña rodeada de una zona catódica extensa y en consecuencia la corrosión localizada (picadura) ocurre de manera rápida [68]. Un modo de evitar la corrosión de los biomateriales metálicos es el formar una capa pasiva o bien recubrir el substrato con una capa protectora biocompatible, las cuales serían diferentes según la aplicación específica deseada.

2.4.1 Cerámicas.

El término *Cerámica* proviene de la palabra griega *Keramos* que significa literalmente "material quemado", aludiendo al hecho de que las materias primas constituyentes, deben ser dispersadas por calentamiento a alta

temperatura con el fin de formar un material que posee un intervalo útil de propiedades en el ámbito de la ingeniería [71-73]. Las cerámicas se componen generalmente de dos o más elementos metálicos y no metálicos que resultan en estructuras cristalinas más complejas que, por ejemplo, los metales por sí solos. La naturaleza del enlace atómico en estos materiales cerámicos varía dependiendo los propios constituyentes, es decir, puede ser principalmente iónico (unión fuerte, entre los iones de carga opuesta) o principalmente covalente (enlaces fuertes, formada por el intercambio de electrones); sin embargo, hay cerámicas que tienen una combinación de los dos tipos de enlace. La fuerza de los enlaces imparte las propiedades características de alta dureza, resistencia térmica y eléctrica a la cerámica [70].

Las cerámicas que son predominantemente iónicas, resultan de la combinación de un metal y un no metal con diferentes cargas eléctricas. Los aniones forman a menudo un arreglo tridimensional regular en el espacio proporcionando sitios intersticiales en las que los cationes, tendrá que ajustarse para dar lugar a la coordinación correcta. La disposición de los iones en la celda unitaria debe satisfacer los requisitos de relación de radios iónicos y asegurar al mismo tiempo, que el equilibrio adecuado de carga se mantenga.

Un buen ejemplo de esto es la alúmina (Al_2O_3) [70-77], en la cual, los iones de oxígeno (O^{2-}) forman un estrecho embalado hexagonal (CPH) que tiene un agujero octaédrico y dos agujeros tetraédricos por átomo (Figura 12). Los iones de aluminio (Al^{3+}) ocupan los sitios octaédricos tales que cada uno está rodeado por seis iones O^{2-} . Con el fin de equilibrar las cargas en general, los iones Al^{3+} sólo se deben llenar dos terceras partes de los sitios, dejando una tercera parte vacantes [70].

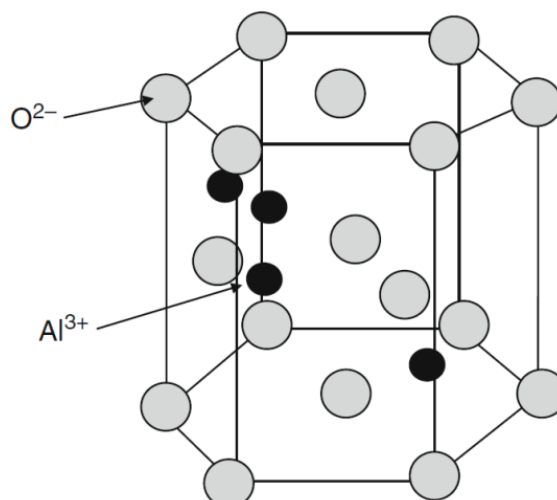


Figura 12. Estructura hexagonal del Al_2O_3 [70].

En consecuencia, las cerámicas que son predominantemente covalente pueden ser constituidas por elementos individuales, por ejemplo, diamante, carbono, o puede ser una combinación de dos elementos no metálicos, por ejemplo, sílice (SiO_2) [74]. El enlace covalente difiere de enlace iónico en que los electrones de átomos adyacentes comparten lo que se traduce en un número fijo de fuertes enlaces direccionales en toda la estructura. En algunos casos esto puede resultar en la formación de cadenas extendidas, hojas o redes tridimensionales. Los materiales cerámicos por lo tanto pueden existir en forma de cristales simples, sólidos regulares policristalinos o materiales amorfos de arreglos irregulares. A la fecha, hay un grupo diverso de materiales cuya respuesta biológica y propiedades mecánicas tales como resistencia y tenacidad, varían de acuerdo con la composición de la fase y el tamaño de grano [70].

Por otra parte, y atendiendo precisamente este aspecto biológico, existen los materiales biocerámicos, es decir, aquellos específicamente diseñados para ser usados en la fabricación de implantes quirúrgicos, prótesis y órganos artificiales, así como para cumplir una determinada función fisiológica en el cuerpo humano [193]. Las biocerámicas poseen una buena biocompatibilidad y osteointegración, además son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso, por lo que sus expectativas de aplicación son muy amplias. Sin embargo, su carácter rígido y quebradizo limita su empleo a aquellas aplicaciones que no deban soportar cargas, como es el caso del relleno de defectos óseos tanto en cirugía bucal como en ortopédica, en la cirugía del oído medio y en el recubrimiento de implantes dentales y articulaciones metálicas.

No obstante, se está investigando activamente en otros posibles campos de utilización como son la fabricación de cementos basados en fosfato cálcico, la preparación de mezclas bifásicas para obtener componentes minerales del hueso lo más similares a las apatitas biológicas, la ingeniería tisular y por supuesto, la obtención de materiales nanoestructurados semejantes a las estructuras de los tejidos duros [70-77, 194].

Como se había mencionado antes, estructuralmente las cerámicas se pueden clasificar en: sólidos cristalinos, sólidos amorfos como los vidrios y sólidos amorfos con núcleos de cristalización caso de las vitrocerámicas. Además, atendiendo a su actividad química en el organismo humano, se consideran 3 tipos de biocerámicas: bioinertes, bioactivas y bioreabsorbibles (Tabla 8) [76].

Tabla 8. Biocerámicas según su actividad química [76].

<i>Tipos</i>	<i>Materiales</i>
Bioinertes	Al_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 , ZrO_2
Bioactivas	Biovidrios
	Vitrocerámicas (apatita-wollastonita)
	Hidroxiapatita
Bioreabsorbibles	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

a) Fosfatos de calcio.

Los fosfatos de calcio (CaP) forman parte de la familia de las biocerámicas, compositos que son bien conocidos por su uso en aplicaciones biológicas. Hay varias formas de las estructuras de estos fosfatos, que normalmente forman una familia de compuestos llamados *apatitas*; tienen estructura cristalográfica similar (sistema hexagonal, grupo espacial P63/m). El término apatita fue acuñado por primera vez por Werner en 1786, mismo que se deriva de la palabra griega *apataw* [195]. Inicialmente y en virtud a la similitud de los patrones de difracción de rayos X de esmalte, dentina y hueso a los de las apatitas minerales (hidroxiapatita HA y fluorapatita FA), aunado con los análisis químicos, los cuales muestran la presencia de calcio y fosfato como constituyentes principales de estos compuestos; se propició la creencia de que los componentes inorgánicos de los huesos y los dientes son esencialmente hidroxiapatita de calcio (HA) representada por la fórmula química, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Sin embargo, la estructura exacta de las apatitas biológicas no está clara y esto se debe a las múltiples formas de su morfología y las variaciones existentes en la estequiometría. Las diferentes formas y fases de estos fosfatos, depende directamente de la complejidad de las diferentes variantes en los métodos de procesamiento de estos sistemas [195-196, 74].

Si se considera a los fosfatos de calcio como un sistema de estudio, este representa uno de los más difíciles pues como se había mencionado antes, éstos conforman una de las familias más complejas de materiales debido a la existencia de una multitud de compuestos conformados por el elemento fosfato. Además, la estabilidad de cada uno de los fosfatos se ven afectados no solo por pequeños cambios en la composición, sino también por las variaciones en el pH y las condiciones de reacción tales como la temperatura del disolvente, la

presión, la naturaleza de los precursores y los agentes acomplejantes, utilizados para controlar la cinética de reacción. En conclusión, la síntesis de todos los diferentes tipos de fases de los CaP no se lleva a cabo de manera trivial. Es esta complejidad la que hace que esta familia de materiales muy singular y uno de la clase más interesante de los biomateriales inorgánicos conocidos por la humanidad [195-198].

El fosfato de calcio se puede cristalizar en las sales de mono-, di-, tri-, y tetra-fosfato de calcio, hidroxiapatita, y β -TCP, dependiendo de la relación Ca/P (Tabla 9), la presencia de agua, las impurezas y la temperatura [71, 78]. El más importante es la hidroxiapatita, debido a su presencia en el hueso natural y los dientes. En un ambiente húmedo y con temperatura baja ($<900^{\circ}\text{C}$), es más probable que la apatita (hidroxilo o hidroxilo) se forme, mientras que en una atmósfera seca y en una temperatura alta, el β -TCP ($3\text{CaOP}_2\text{O}_3$) se formará. Ambas formas son muy compatibles con el tejido y se utilizan para sustituir hueso en forma granular o como un bloque sólido [70-77].

Tabla 9. Variación de la relación Ca/P según los fosfatos de calcio [199-202].

Compuesto	Fórmula	Abreviatura	Ca/P
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP	2
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HA	1.67
Oxihidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x\text{V}_x$	OHA	1.67
Hidroxiapatita deficiente en Ca	$\text{Ca}_{5-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	CDHA	1.5
Fosfato tricálcico (α , β)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	TCP	1.5
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP	1.3
Fosfato dicálcico	CaHPO_4	DCP	1.0
Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD	1.0
Fosfato monocálcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$	MCPM	0.5

b) Hidroxiapatita.

La hidroxiapatita HA con fórmula química básica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el principal constituyente inorgánico de los tejidos óseo y dental. Por este motivo y debido a que presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad, es que ha sido empleada

como biomaterial o como uno de los componentes de biomateriales compuestos, destinados a reparaciones o sustituciones óseas.

➤ Generalidades sobre la estructura.

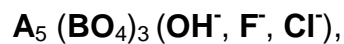
Este fosfato de calcio puede obtenerse a partir de huesos humanos o de otra especie animal [203-209] por transformación de materiales naturales como los esqueletos minerales de los corales y equinodermos, o puede ser sintetizada artificialmente. Dependiendo del origen y del método de síntesis, resultarán materiales con gran variabilidad fisicoquímica y morfológica. De esta manera, pueden obtenerse distintas hidroxiapatitas para satisfacer los requisitos de aplicaciones clínicas específicas [210-213]. Las HA's mantienen su estructura dentro de una amplia gama de composiciones no estequiométricas, las cuales pueden ser deficientes en calcio o hidroxilo y pueden tener iones extraños substituyendo parcialmente el calcio, el fosfato o el hidroxilo en su retículo cristalino [207, 214].

Además, los átomos que componen la red cristalina de la HA pueden estar dispuestos de forma imperfecta, es decir, puede presentar cristalinidad variable. Cuando se encuentra en forma de partículas o granulado, la superficie de los cristales de HA contribuye de forma significativa a determinar las propiedades, entre ellas, las biológicas del material. Siendo así, el término "hidroxiapatita" comprende en realidad una clase de compuestos con gran variabilidad en sus propiedades fisicoquímicas y morfológicas [215].

Por otra parte, las propiedades de la HA sirven de guía para el diseño de biomateriales (aun cuando el desempeño real de un biomaterial solo puede comprobarse mediante costosos y tediosos protocolos que incluyen ensayos "in vitro" e "in vivo" en modelos animales y clínicos), por ejemplo, una hidroxiapatita pobremente cristalizada y deficiente en calcio [216, 201] tiene una solubilidad mayor que otra bien cristalizada, y por tanto, puede ser reabsorbida en el organismo. Por otro lado, las fluorapatitas, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, presentan menor solubilidad que las HA's, y por tanto son más estables en el organismo [201-202]. Los cristales nanométricos de HA presentan una alta reactividad y frecuentemente interactúan con los tejidos a su alrededor de forma distinta a la de los cristales micrométricos [217-219]. La variabilidad en composición, cristalinidad y morfología afectan la solubilidad y reactividad de la hidroxiapatita. Consecuentemente, dependiendo de las condiciones de síntesis, al ser implantada, la HA puede permanecer estable o ser reabsorbida, ser inerte o enlazarse a los tejidos adyacentes, etc. [220, 211-212].

Se sabe que el hueso está constituido por una matriz orgánica (22%) compuesta principalmente por fibras de colágeno, una fase mineral (69%) y agua (9%) [203-208, 210-211, 215, 220-223]. La fase mineral está formada principalmente por pequeños cristales de HA y otros fosfatos de calcio. La HA es el miembro más importante de la fase mineral y pertenece a una familia de minerales denominados *apatitas*. Durante mucho tiempo las apatitas fueron objeto de estudio debido a que se deseaba obtenerlas de forma sólida, pero la carencia de métodos había impedido el estudio y desarrollo de potenciales aplicaciones de esta biocerámica [221]. Los minerales del grupo de la apatita son un grupo de los fosfatos, arseniatos y vanadatos que tienen estructuras hexagonales o monoclinicas pseudo-hexagonales muy similares (Figuras 13 y 14) [214, 224-225].

Este grupo incluye varios minerales tales como la apatita, mimetita, piromorfita y vanadinita. Apatita es el nombre general para los minerales: clorapatita, fluorapatita e hidroxiapatita. La fórmula general para este grupo es:



donde los cationes A pueden ser varios iones metálicos como Ca, Ba, Na, Pb, Sn, La y/o Ce; los cationes B pueden ser P, V o As. Los grupos del anión CO_3 y los grupos del anión SiO_4 , pueden sustituir en un grado limitado a los grupos BO_4 [220], [222], [207].

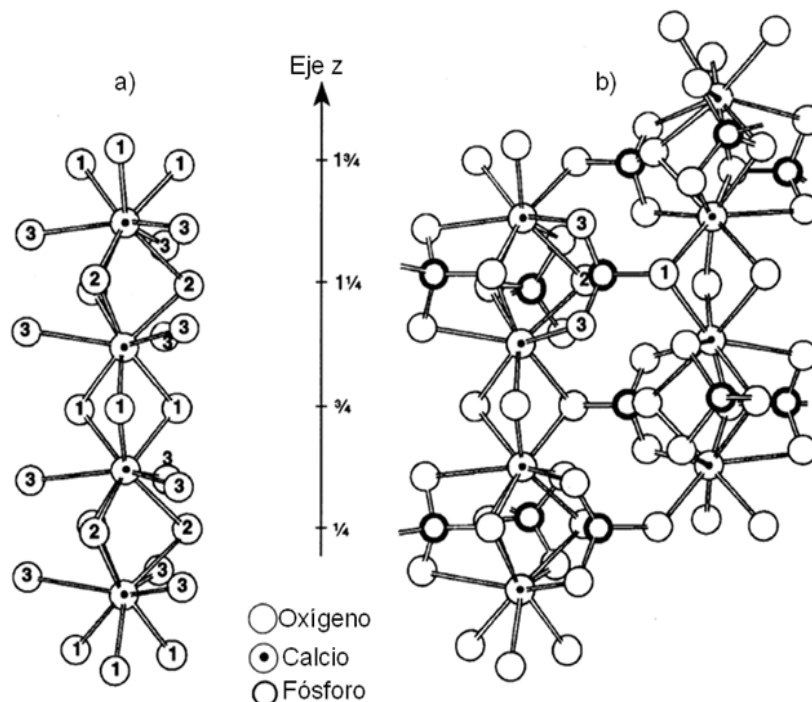


Figura 13. Estructura tridimensional en celda unitaria de CaP.: a) apatitas, b) OHA [214, 224-225].

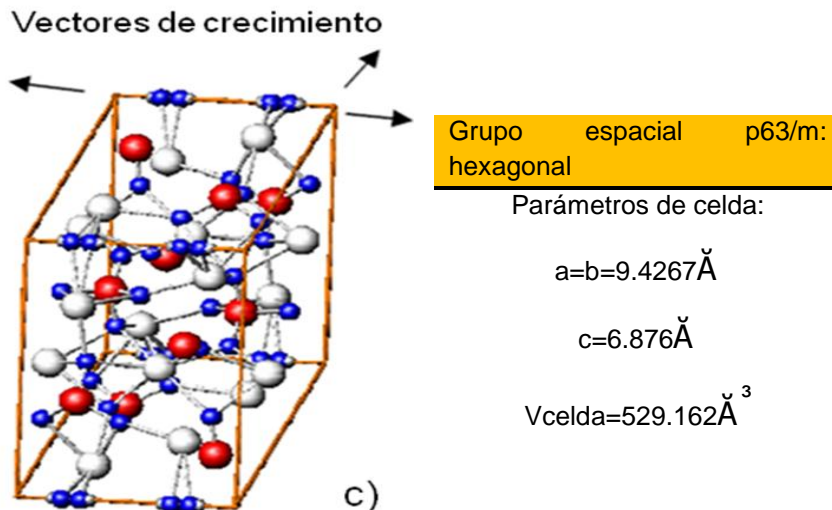


Figura 14. Estructura tridimensional en celda unitaria de CaP.: c) esquema OHA y parámetros de red [214, 224-225].

➤ Métodos de obtención de HA.

Actualmente se han hecho múltiples esfuerzos para mejorar las propiedades mecánicas de la HA [226], tales como la mezcla de este compuesto con poliestireno o polietileno de alta densidad cuyos resultados han mostrado una mejoría pero sin llegar a igualar las propiedades del hueso sano. Además de esto, se disminuyen sus propiedades biológicas, existiendo un remanente de dicho plástico en el sitio del implante debido a que éste no es biodegradable. Aunado a estas combinaciones plásticas, se ha intentado mezclar HA con diferentes compuestos orgánicos naturales, como es el caso de fibras de colágeno a las que se les ha depositado microcristales de HA [227-230], semejando lo que ocurre naturalmente en el organismo. Si bien esta metodología parece una buena idea, posee la desventaja de la utilización de un polímero proteico como el colágeno que, aunque es poco inmunogénico en su estado fibrilar empaquetado, al ser degradado *in vivo* produce cierta actividad inflamatoria derivada de una respuesta a los productos de esta degradación.

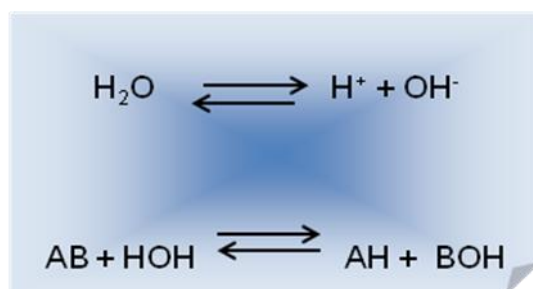
Ahora bien, para mejorar las características de adhesión celular y control de la porosidad, se han utilizado los quitosanos (polisacáridos) [231-232], pero en virtud de los resultados obtenidos, se sugieren mejor como productos de andamiaje tridimensional de células progenitoras y factores de crecimiento en la ingeniería de tejidos más que de soporte mecánico de fracturas.

Finalmente puede decirse que a la fecha, se han desarrollado muchas rutas para sintetizar HA. Los métodos más utilizados son: hidrólisis, reacciones

en estado sólido, reacciones hidrotermales y precipitación, caracterizándose este último por su simplicidad, bajo costo y aplicación a nivel industrial. También se mencionan otros métodos, incluyendo síntesis mediante alcóxidos, sol-gel y métodos químicos, además de diferentes procedimientos para obtener recubrimientos sobre diferentes sustratos, tales como deposición electroquímica, métodos de spray por plasma, etc.

❖ Método por hidrólisis.

Este método se lleva a cabo mediante la reacción química del agua con compuestos orgánicos o inorgánicos, misma que genera la ruptura de un enlace covalente permitiendo la transferencia de carga entre las especies reaccionantes. La hidrólisis resulta posible por la disociación electrolítica de la molécula de agua y puede describirse mediante la siguiente ecuación:



Los compuestos reaccionantes (AB) y los productos de hidrólisis (AH, BOH) pueden ser moléculas neutras (en su mayoría compuestos orgánicos) o iónicas (ácidos, bases o sales). La molécula disociada de agua puede reaccionar con los aniones o cationes de otros compuestos a su vez disociados, dando lugar a reacciones ácidas o básicas de la solución acuosa.

Por otro lado, la hidrólisis de sustancias orgánicas requiere de un catalizador ácido o base. Cuantitativamente, la hidrólisis se mide por medio de la constante de equilibrio para la reacción correspondiente, K_h , que se denomina constante de reacción [233].

❖ Método por reacciones en estado sólido.

Este método se basa en reacciones a altas temperaturas de una mezcla en estado sólido de compuestos de calcio y fosfato. Dichas reacciones son generalmente controladas por procesos difusivos sólido-sólido. A temperatura

ambiente la velocidad de tales procesos es casi nula, sin embargo la exposición a altas temperaturas los favorecen considerablemente debido al aumento de la movilidad atómica. De la misma manera es necesario un contacto estrecho entre la superficie de las partículas de los sólidos reaccionantes que permita la interdifusión atómica. Cabe señalar que para lograr un buen grado de conversión es imprescindible una distribución homogénea de los reactivos en la mezcla de reacción. El procedimiento estándar se compone de las siguientes etapas: molienda (vía seca o húmeda) conjunta de los reaccionantes, peletización (por prensado o aglutinado) y sinterización (temperaturas superiores a los 900°C) [233].

❖ Método por reacciones hidrotermales.

El método de síntesis hidrotérmica consiste en promover la formación de HA a partir de soluciones acuosas a temperaturas elevadas, en el rango de 140 a 500°C. Para alcanzar tales temperaturas sin permitir la evaporación del solvente, la presión también se eleva. Generalmente este proceso se lleva a cabo en autoclaves donde la presión resultante es simplemente la presión de vapor del solvente a la temperatura deseada. Las materias primas de partida que se utilizan son: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, H_3PO_4 , o los fosfatos de calcio $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, así como la propia HA. El pH inicial se ajusta con NH_3 gaseoso, NH_4OH o NaOH . Esta vía se presta para la obtención de HA pura, estequiométrica y con pocos defectos en la red cristalina, en forma de cristales micrométricos de ámbito prismático con caras bien definidas [233].

❖ Método por precipitación.

Los métodos basados en la precipitación de la HA consisten básicamente en mezclar fuentes de iones calcio y fosfato en un medio acuoso. La fuente de calcio puede suministrarse en forma de soluciones acuosas de CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ o a partir de CaCO_3 o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sólido. Como fuentes de fosfatos pueden emplearse soluciones acuosas de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 o NaH_2PO_4 [234]. La regla de Ostwald permite predecir qué compuestos se formarán bajo determinadas condiciones del proceso. Según esta regla, la primera fase que se formará será aquella de mayor solubilidad. Esa fase se transformará seguidamente por disolución y recristalización en las fases menos solubles. La fase finalmente obtenida es el compuesto menos soluble. La consecuencia de esta regla, prevista históricamente y confirmada experimentalmente para los fosfatos de calcio [235], es que para valores de pH superiores a 7, la primera

fase a cristalizar es el fosfato de calcio amorfo (ACP) que se convierte lentamente en HA, mientras que para valores de pH entre 5 y 7 puede ocurrir también la formación de precursores de fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8 \text{H}_2 (\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y el fosfato bicálcico (CaHPO_4) [233].

Dependiendo del tipo y concentración de los reaccionantes, del tiempo de envejecimiento y la temperatura, habrá una variación sustancial en la relación molar Ca/P próximas a la estequiométrica para la HA (1.67) y altas cristalinidades, mientras que procesos rápidos, por ejemplo promovidos por el uso de reaccionantes concentrados, conducen a valores de Ca/P próximos a ACP (1.48) y bajos rangos cristalinos [236]. La HA producida por esta vía se presenta como agregados (entre 1 y $100\mu\text{m}$) de cristales primarios pequeños ($<1\mu\text{m}$). El hábito de estos cristales primarios varía con las condiciones de síntesis, siendo frecuentemente acicular o tabular y en general presentan caras bien definidas. El CO_2 presente en el aire atmosférico es absorbido por la soluciones acuosas alcalinas en forma de ión CO_3^{2-} y acaba incorporándose a la HA, bien en sustitución de los iones PO_4^{3-} o de los iones OH^- del retículo de HA. Esta incorporación se minimiza pero no se evita totalmente, al burbujear nitrógeno gaseoso durante la reacción de síntesis.

Cuando la síntesis se lleva a cabo en presencia de iones potasio o sodio, éstos substituyen parcialmente a los iones Ca^{2+} incorporándose al producto, lo cual no sucede con los iones amonio debido a la gran diferencia de tamaño en relación al ión calcio. El proceso de precipitación se lleva a cabo en régimen semi-continuo, es decir, por adición lenta de los reactivos para evitar variaciones drásticas en las condiciones de reacción. El modo preferible de alimentación de los reaccionantes es la adición simultánea de las fuentes de calcio y de fosfato, no obstante, se adiciona lentamente una de las fuentes sobre la otra previamente colocada en el reactor.

Si el objetivo es obtener material estequiométrico, es preferible adicionar lentamente la fuente de fosfato sobre una solución de calcio manteniendo el pH entre 8 y 9 a una temperatura de 85°C , con lo cual se consigue la nucleación directa de HA, prescindiendo de la fase intermedia de ACP.

❖ Método sol-gel.

Esta técnica se basa en la creación de un enrejado tridimensional, conocido como gel, a partir de una suspensión de partículas coloidales muy pequeñas,

llamada sol [237-238, 233]. El primer paso de este método consiste en el mezclado de los precursores para formar el sol de baja viscosidad. En calidad de precursores generalmente se usan alcóxidos de los elementos deseados, por ejemplo Si, Ca, P, Ti, Al, etc. [238]. Estos alcóxidos se disuelven en solventes orgánicos y a esta solución se añade agua para hidrolizar el alcóxido formar el sol [239]. Entre las partículas del sol comienzan a desarrollarse enlaces que conducen a la formación de un enrejado tridimensional y al aumento de la viscosidad, es decir la gelificación del sistema.

El gel después de secado puede ser el producto final o también puede ser sometido a calcinación o sinterización y la temperatura de procesamiento no sobrepasa por lo general los 150°C, evitándose la descomposición de los productos orgánicos adicionados obligatoriamente al proceso. Calentando a una temperatura mayor, el gel se transforma en vidrio o cerámica con formas predeterminadas. En la preparación de recubrimientos delgados o gruesos sobre sustratos vítreos, cerámicos, metálicos o poliméricos, generalmente se emplean técnicas como “dip-casting”, “spin-coating” o “spray-coating”. Estos recubrimientos obtenidos por el método sol-gel son bastante promisorios para el recubrimiento de sustratos de pequeñas o grandes superficies.

Mediante la técnica sol-gel se obtienen materiales con alta homogeneidad y pureza y pueden emplearse bajas temperaturas de sinterización, gracias a la alta reactividad del gel obtenido [240]. Además de poder conformar cuerpos sólidos, tanto densos como porosos, se pueden obtener fibras, recubrimientos y polvos ultrafinos. La capa resultante suele ser extremadamente densa, compacta y con una fuerte adherencia al sustrato. La clave del buen éxito del enlace parece ser la capa de estructura fina y delgada que puede ser formada, lo que proporciona una capa libre de defecto a nivel atómico y por consiguiente con alta resistencia a la fractura [241-243].

El método sol-gel de fabricación de recubrimientos delgados ofrece ventajas potenciales sobre las técnicas convencionales, tales como bajas temperaturas de procesamiento, recubrimiento de grandes superficies sin mucha complejidad tecnológica y con instalaciones de bajo costo y la posibilidad de obtener recubrimientos de alta pureza, densos, homogéneos, con un adecuado grado de cristalinidad y adherencia al recubrimiento, y con un espesor que puede variar en el rango desde unas decenas de nanómetros hasta varias micras, y el bajo costo de las instalaciones requeridas [244]. Además, la técnica es versátil y permite conseguir un mismo tipo de recubrimiento por diferentes vías o recubrimientos con diferentes composiciones y estructuras. Entre las desventajas se citan el alto costo y

toxicidad de los precursores, la baja productividad del método y un tiempo de procesamiento relativamente largo que es la principal invalidante si se piensa en un proceso a gran escala [245].

Capítulo 3: Metodología.

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan tanto como un cuento de hadas.

Marie Curie (1867-1934).

En este capítulo se presenta el procedimiento seguido para la preparación de las soluciones utilizadas en cada una de las fases del experimento, el manejo de las muestras utilizadas, así como el método experimental para la modificación superficial del sustrato metálico, su caracterización y finalmente el protocolo llevado a cabo para la obtención de polvos de HA sintética. Cabe señalar que se trabajará con placas de Titanio grado 2 (99%) y aleaciones grado 5 (Ti6Al4V), principales sustratos metálicos utilizados en ortopedia y odontología.

3.1 Modificación superficial del sustrato metálico.

3.1.1 Anodizado electroquímico.

Según reportes de Kim y sus colaboradores [246], la formación de HA sobre titanio anodizado, puede ser acelerada utilizando una solución de NaOH (funcionalización vía tratamiento químico) seguida de un tratamiento térmico a altas temperatura (cristalización del óxido), previo a la inmersión del sustrato en solución fisiológica sintética. Es decir, la formación de una capa de titanato de sodio sobre el óxido metálico, la cual posibilite la deposición de iones calcio y fosfatos provenientes de la SFB y de esta manera promover una mejor adhesión celular como prerrequisito importante en las subsecuentes funciones celulares y por ende a la formación del hueso compacto.

Cabe señalar que la técnica aquí descrita para dicha modificación, fue reportada originalmente por Gong y sus colaboradores [247], sin embargo la aplicación de ésta metodología para la evaluación del crecimiento de HA en los intersticios del cristal funcionalizado, fue reportada por S-H Oh y sus colaboradores [135] y de la cual en combinación con otros protocolos reportados [248], partimos para el crecimiento de los óxidos metálicos.

a) Preparación de las placas de titanio.

La figura 15 muestra el esquema del proceso de preparación de las placas metálicas utilizadas como muestras de estudio. Inicialmente, se cortaron las piezas de titanio grado 2 (C.P. (99%) y titanio grado 5 (Ti6Al4V), (ver Tabla 2) en placas de 1cm^2 de área. Posteriormente, se soldó un alambre de cobre en un costado de las placas, esto con la finalidad de crear el electrodo de trabajo para el proceso de anodizado y se cubrió el extremo soldado con recubrimiento epóxico para evitar el contacto del alambre con la solución electrolítica y de esta manera asegurarnos de que dicho metal no intervenga en la reacción electroquímica. Las piezas se pulieron mecánicamente con papel abrasivo (SiC) de grados 280, 320, 400, 600 y 1000 respectivamente. Finalmente y previo al proceso de anodizado, la muestra de interés fue sumergida en la solución de limpieza para remover la capa de óxido formada debido al contacto del electrodo con el oxígeno atmosférico.

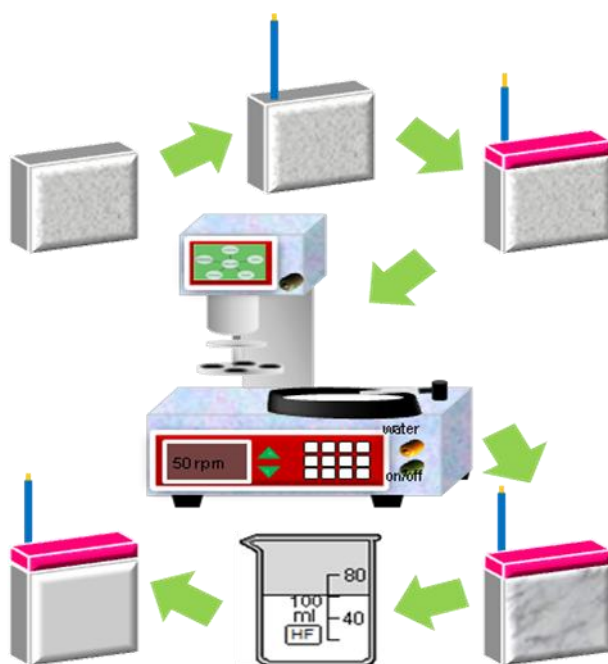


Figura15. Esquema del proceso de preparación de las placas metálicas.

b) Preparación de las soluciones utilizadas.

Se prepararon 4 soluciones de interés, denotadas como solución de limpieza (50ml a 5M de HNO_3 con 10 gotitas de HF), solución de anodizado (100ml al 0.5%w de HF), solución de tratamiento químico (50ml a 5M de NaOH) y solución fisiológica sintética (500ml en agua desionizada, ajustada a un pH de 7.4 utilizando 1ml de HCl concentrado). La Tabla 10 muestra las concentraciones iónicas utilizadas para la preparación de la solución SBF [6].

Tabla 10. Concentraciones iónicas utilizadas para la preparación de la solución SBF [6].

ión	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺²	HCO ₃ ⁻¹	SO ₄ ⁻²	Mg ⁺²	HPO ₄ ⁻²
Concentración (mM/dm ³)	142	5.0	2.5	4.20	0.50	1.5	1.0
Masa pesada (g)	NaCl 4.149	KCl 0.186	CaCl ₂ 0.138	NaHCO ₃ 0.176	Na ₂ SO ₄ 0.035	MgCl ₂ *6H ₂ O 0.152	K ₂ HPO ₄ 0.087

c) Técnica experimental.

El sistema de trabajo consistió de una celda electroquímica con un electrodo de platino como cátodo, el electrodo de titanio (placas (99%) y (6Al4V)) como ánodo y la solución de HF previamente preparada como medio oxidante. La capa de óxido de titanio fue generada mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre electrodos igual a 20 voltios con una fuente de poder *Topward 6303D, dual-tracking DC power supply*, durante 30 minutos. La figura 16 muestra el sistema utilizado para dicho proceso.

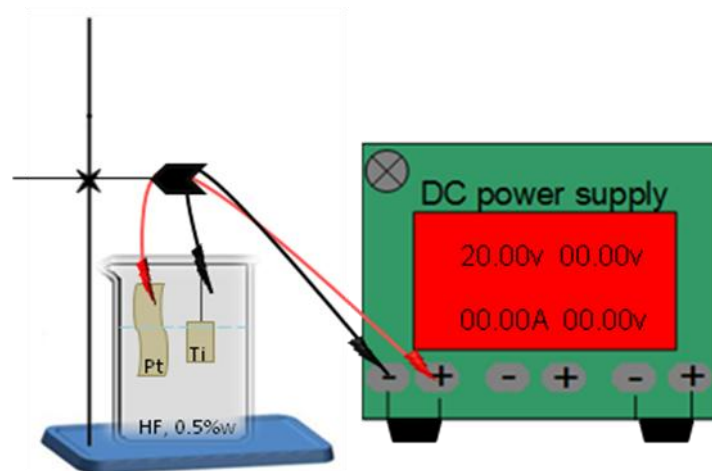


Figura 16. Esquema de montaje experimental: celda electroquímica para anodizado de Ti en HF.

➤ Tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF.

Después que la placa ha sido anodizada y con la finalidad de funcionalizar el sustrato, es decir de proporcionarle esa característica bioactiva, las muestras fueron colocadas en una solución de NaOH(5M) durante 1 hora a 60°. Las placas funcionalizadas se colocaron por inmersión en la solución fisiológica, para inducir la formación de HA sobre el sustrato. Posteriormente, la muestra fue expuesta a 500°C en un horno-mufla durante una hora a fin de mejorar el

arreglo cristalino de la HA. La figura 17 muestra el arreglo previamente descrito.

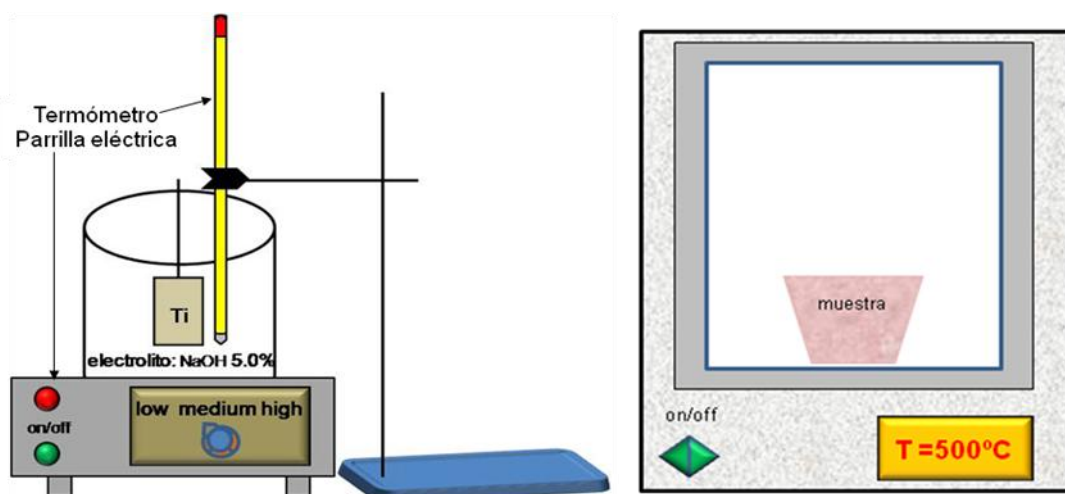


Figura 17. Esquema de montaje experimental, izquierda: tratamiento químico y derecha: tratamiento térmico.

d) Caracterización superficial de las muestras.

La caracterización de la superficie tanto desnuda como modificada se realizó mediante microscopía de fuerza atómica en un equipo *Q-scope 250*. Para caracterizar la degradación que sufre el recubrimiento de HA depositado sobre la superficie del metal anodizado sometidas a la acción corrosiva de la solución fisiológica sintética, se corrieron curvas de impedancia electroquímica, utilizando una celda de tres electrodos conectados a un potencióstato modelo PC1 FAS4-*Gamry Instrument, Inc.*

El espectro se corrió a un rango de frecuencias entre 0.001 y 100000Hz y un potencial de 10mV. En este caso se empleó como electrodo de trabajo la muestra electrodepositada, como contraelectrodo un electrodo de platino y finalmente como electrodo de referencia un electrodo de calomelanos saturado (Figura 18). Posteriormente se hicieron análisis de microscopía electrónica de barrido con la finalidad de estudiar la morfología de la película de óxido así como se obtuvo el espectro de rayos X de electrones dispersados para determinar la composición elemental de la porción de la muestra de estudio, en un equipo MBE marca JEOL-JSM-6360.

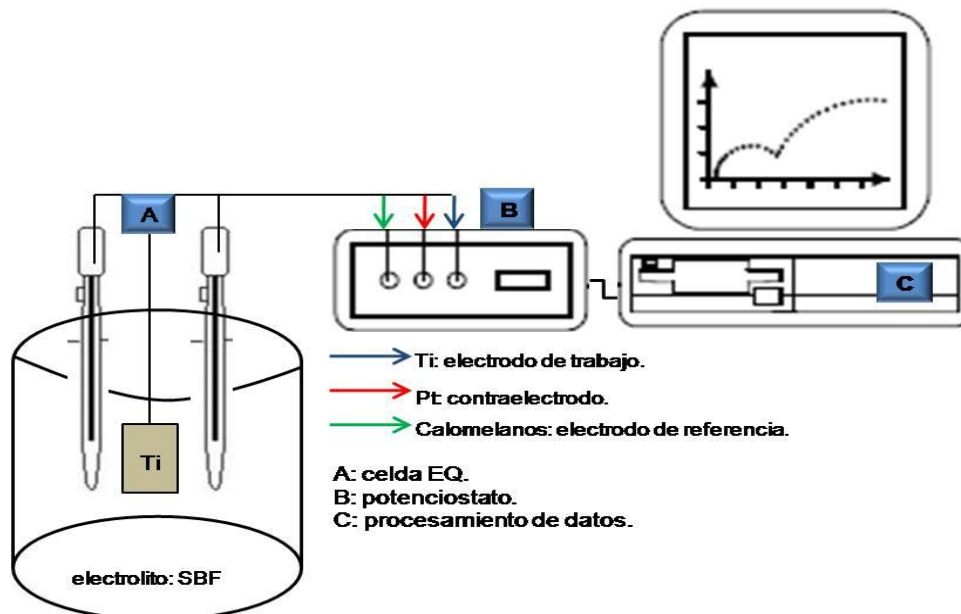


Figura 18. Esquema de montaje experimental: corrida de impedancia electroquímica de Ti en SBF.

3.1.2 Anodizado por pulsos.

A continuación se describe el procedimiento seguido para llevar a cabo la anodización vía un potencial variable (pulsos anódicos y catódicos) de placas metálicas de titanio grado 5 (Ti6Al4V).

a) Preparación de las placas de titanio.

Las placas metálicas fueron preparadas según la metodología mencionada en la sección 3.1.1a de este capítulo, considerando un paso adicional para mejorar la calidad de la superficie metálica dándole un acabado tipo espejo con una solución de alúmina. Finalmente y previo al proceso electroquímico los sustratos fueron desengrasados con acetona y lavados con agua desionizada.

b) Preparación de las soluciones utilizadas.

Se prepararon 4 soluciones de interés para el proceso de anodizado: (0.36M)NH₄F/H₂O(100), (0.36M)NH₄F/H₂O:glicerol(10:90), (0.36M)NH₄F /H₂O:etilenglicol (10:90) y (0.36M)NH₄F /H₂O:di-etilenglicol (10:80) y una de limpieza similar a la que se especifica en el apartado 3.1.1b de este capítulo.

c) Técnica experimental.

El sistema de trabajo consistió básicamente de una celda electroquímica con un electrodo de platino como cátodo, el electrodo de titanio (placas (6Al4V)) como ánodo y la solución de NH_4F +modificador previamente preparada como medio oxidante. La capa de óxido fue crecida mediante la aplicación de pulsos potenciodinámicos a las muestras metálicas en el rango de 120V a -5V durante la parte anódica y catódica del tratamiento superficial con dos fuentes de poder RK80H, *Matsusada Precision* y una unidad electrónica prevista de 2 relays cerámicos, durante un lapso de tiempo de 100 horas. La figura 19 muestra el sistema utilizado para dicho proceso.

La duración de los pulsos anódicos y catódicos se varió en el rango de 9 a 1 hasta 200 a 1. Un tercer paso de desconexión “circuito abierto” fue adicionado justo después del pulso catódico con el fin de permitir posibles reacciones químicas específicas. La influencia tanto de la anchura y la altura de los pulsos anódicos y catódicos, así como de la duración de la reacción química sobre la morfología de la capa de óxido formada fue estudiada con diferentes composiciones de electrolito. El control de los pulsos de potencial se llevo a cabo mediante el software *NI Lab View 8.0* y el registro tanto del voltaje como la corriente en el sistema mediante un sistema de adquisición de datos *NI 6009, Data Acquisition System*. La figura 20 muestra el esquema de los pulsos aplicados para esta metodología.

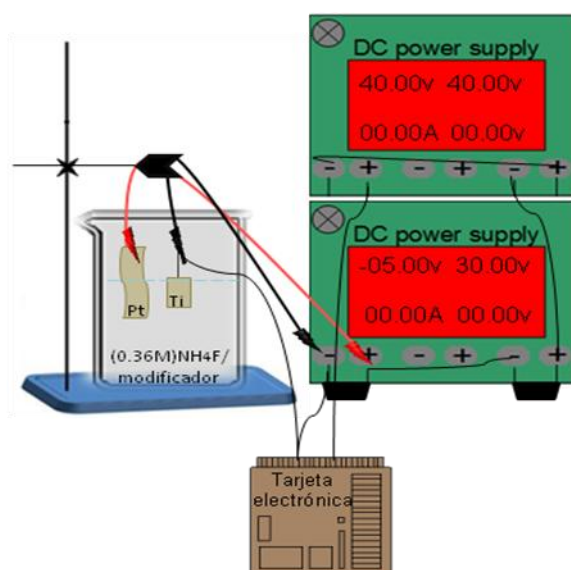


Figura 19. Esquema de montaje experimental: celda electroquímica para anodizado de Ti en NH_4F .

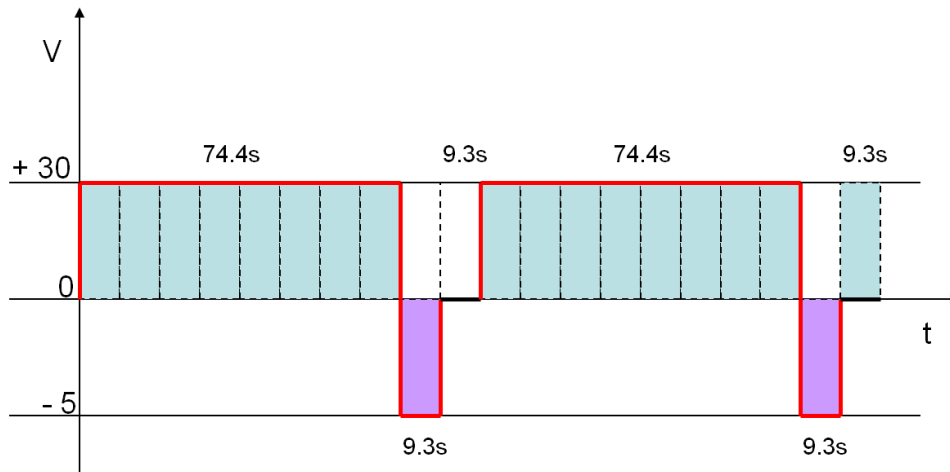


Fig.20 Esquema de pulsos aplicados.

d) Caracterización superficial de las muestras.

El análisis superficial de las placas metálicas en estudio se hizo siguiendo el protocolo de la sección 3.1.1d de este capítulo exceptuando la corrida de impedancia electroquímica. Los análisis de microscopía electrónica y de rayos X de electrones dispersados se efectuaron en un equipo MBE marca JEOL-JSM-6510A.

3.2 Síntesis de HA vía el método de precipitación/combustión.

Los métodos basados en la precipitación de la HA consisten básicamente en mezclar fuentes de iones calcio y fosfato en un medio acuoso conveniente. La fuente de calcio puede suministrarse en forma de soluciones acuosas de CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ o a partir de CaCO_3 o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sólido. Como fuentes de fosfatos pueden emplearse soluciones acuosas de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 o NaH_2PO_4 (Martins Seckler M. et al.).

Según reportes de S. Sasikumar y R. Vijayaraghavan (2006), el cascaron de huevo de gallina contribuye un 11% al peso total del huevo cuyo principal constituyente es el carbonato de calcio CaCO_3 en un 90% del peso total. Actualmente la India es el cuarto productor a nivel mundial de huevo de gallina con una producción anual de 1'732,500 toneladas, si de esta cantidad se considera solo el 11% correspondiente al cascaron, se generan alrededor de 190,000 toneladas de producto de desecho por año. Debido al enorme impacto

ambiental que representan estos insumos, muchos investigadores se han dado a la tarea de utilizar esta materia prima como fuente rica en calcio para la síntesis de productos cálcicos como la HA, sugiriendo en cada caso, métodos viables y económicos para la obtención de dicho material.

3.2.1 Técnica experimental.

El procedimiento aquí descrito para la obtención de la HA es una modificación de la técnica originalmente descrita por S. Sasikumar y R. Vijayaraghavan (2006), basada en la formación de un gel a bajas temperaturas tratado posteriormente a altas temperaturas para la obtención de cristales definidos de HA de orden nanométrico. En ella se permite la reacción de todas y cada una de las especies involucradas a fin de obtener un precipitado con un cierto orden estructural, en el cual las especies de importancia, tales como calcio, fosfato e hidróxido estén presentes y se eviten de la misma manera las fases cristalinas indeseables de otros productos de fosfato como el ACP. Cabe señalar que inicialmente la técnica empleada fue exactamente la descrita por estos autores pero en base a los resultados obtenidos y a la revisión bibliográfica hecha, la modificación propuesta se sustenta en 2 diferentes rutas de síntesis analizadas.

La primera de ellas propuesta por Pedro Melini Batres (2007), en la cual reporta el uso de reactivos de calcio y fosfato para la síntesis de HA por la vía de precipitación, monitoreando parámetros como el pH inicial de las soluciones así como el de la mezcla en reacción, tiempos y temperaturas de agitación, orden de adición de los reactivos, esto con la finalidad de evitar los sólidos no solubles y finalmente el tiempo de envejecimiento o reposo del precipitado. La segunda técnica (García et al., 2006), fundamentada básicamente en la de Melini, considera un paso adicional al final del proceso de síntesis y obtención del polvo precipitado. Este paso consiste en calcinar a temperaturas superiores a los 800°C el polvo obtenido previamente y de esa manera mejorar la estructura cristalina de la HA.

a) Obtención del polvo de cascarones de huevo y síntesis de HA.

A continuación se da a conocer tanto el procedimiento seguido para generar el polvo de cascarones de huevo que será utilizado como materia prima para realizar el proceso de síntesis vía el método combinado de precipitación y

combustión, así como también la ruta de síntesis llevada a cabo para obtener HA cristalina.

Paso 1. Se colocaron 24 cascarones de huevo en un vaso de precipitado de 2L, los cuales se hirvieron durante 30 minutos. Posteriormente se retiraron del fuego y se colocaron en una estufa por 12 horas a una temperatura de 60°C para secarlos. Finalmente se colocaron en un desecador durante 30 minutos para extraer toda la humedad restante. Los cascarones ya secos, se trituraron en un procesador de alimentos convencional. El peso neto obtenido del polvo pulverizado fue de 83.1 gr. Se colectó un espectro infrarrojo del material inicial para verificar que la síntesis se realice satisfactoriamente.

Paso 2. La preparación de las soluciones reaccionantes se llevó a cabo de la siguiente manera: Primero se prepararon 50ml de una solución de hidróxido de amonio y agua en una relación 1:1. Posteriormente se prepararon 100ml de una solución de ácido cítrico 1M. Para esta solución se pesaron 9.3 gramos del sólido, los cuales posteriormente se diluyeron en 10ml de agua y finalmente se aforó en un matraz volumétrico de 100ml de capacidad. De igual manera se preparó una solución de fosfato dibásico de amonio 1M, primeramente pesando 13.2 gramos del sólido, posteriormente diluyendo en 40ml de agua y finalmente aforando a 100ml en un matraz volumétrico de dicha capacidad.

Adicionalmente y para tener bajo control el mecanismo de reacción se midió el pH de las soluciones antes preparadas. El resultado de las mediciones fue: 1.94 y 6.26 para el ácido cítrico y el fosfato respectivamente.

Paso 3. Se tomaron dos muestras del cascarón de huevo previamente tratado de 5gr cada una para la realización de los procesos de síntesis definidos como ruta 1 y ruta 2 (Muestras R1 y R2). Como se muestra en la Figura 18, la ruta 2 representa el proceso de síntesis sin la adición de la solución de ácido cítrico y fue precisamente con esta muestra con la que se trabajó inicialmente.

Paso 4. Para dar seguimiento al proceso, se disolvió el polvo con ácido nítrico concentrado, según el paso 2 del proceso inicial (Figura 18). Se colocaron los 5gr del polvo en un vaso de precipitado de 250ml de capacidad y de manera gradual se adicionaron 17ml de HNO₃ sobre el polvo, observándose la formación de una masa esponjosa como consecuencia de la formación de CO₂ en la mezcla. Habiendo adicionado por completo el ácido y habiendo dejado estabilizar la reacción, se obtuvo una solución granular de color amarillo

oscuro que posteriormente se filtró en repetidas ocasiones con papel filtro del número uno. Finalmente se obtuvieron dos soluciones de apariencia transparente de color amarillo claro y sin residuos granulares cuyos valores de pH fueron: $R_1=0.65$ y $R_2=0.57$ a temperatura ambiente.

Paso 5. Las soluciones preparadas de nitrato de calcio se aforaron a 100ml y 250ml para las muestras R_1 y R_2 respectivamente.

Paso 6. Se tomó una muestra de 0.5ml para cada solución con la finalidad de medir el contenido de calcio volumétricamente utilizando EDTA, según se refiere en el paso #5 del proceso de síntesis (Figura 21). La concentración de Ca^{2+} obtenida fue de 0.70144mol/L.

Paso 7. Las soluciones de calcio y de fosfato se alcalinizaron con hidróxido de amonio hasta un valor de pH=10.

Paso 8. Como inicio del proceso de precipitación, se colocaron 50ml de solución de fosfato en un vaso de precipitado de 500ml, el cual seguidamente se colocó en una parrilla de agitación a velocidad mínima. Posteriormente y bajo agitación vigorosa, se añadió a razón de 1ml/min la solución de calcio. El tiempo de agitación predestinado para la formación del precipitado color blanco fue de 2.5 horas, al término del cual seguirían 5 días de reposo a fin de permitir la completa reacción de las especies en solución y precursoras de la hidroxiapatita.

Paso 9. Habiendo transcurrido un tiempo de reposo de 88.5 horas, el precipitado se filtró a vacío y se hizo el enjuague correspondiente.

Paso 10. La muestra recolectada en el filtro se secó en una estufa a 150°C durante un lapso de tiempo de 4.2 horas. El material sólido obtenido se pesó en una microbalanza analítica, arrojando un valor de 3.4952 gramos. La apariencia del sólido eran pequeñas hojuelas de color blanco. Esta muestra se almacenó aparte para continuar con el proceso de sinterizado y su posterior análisis.

Paso 11. Se tomó una hojuela del sólido secado según el paso anterior, se pulverizó utilizando un mortero y los polvos se colocaron en el infrarrojo para

la obtención de su espectro.

Paso 12. El resto de la muestra se colocó en un horno-mufla a una temperatura de 900°C durante 2 hrs a fin de obtener la HA nanocristalina.

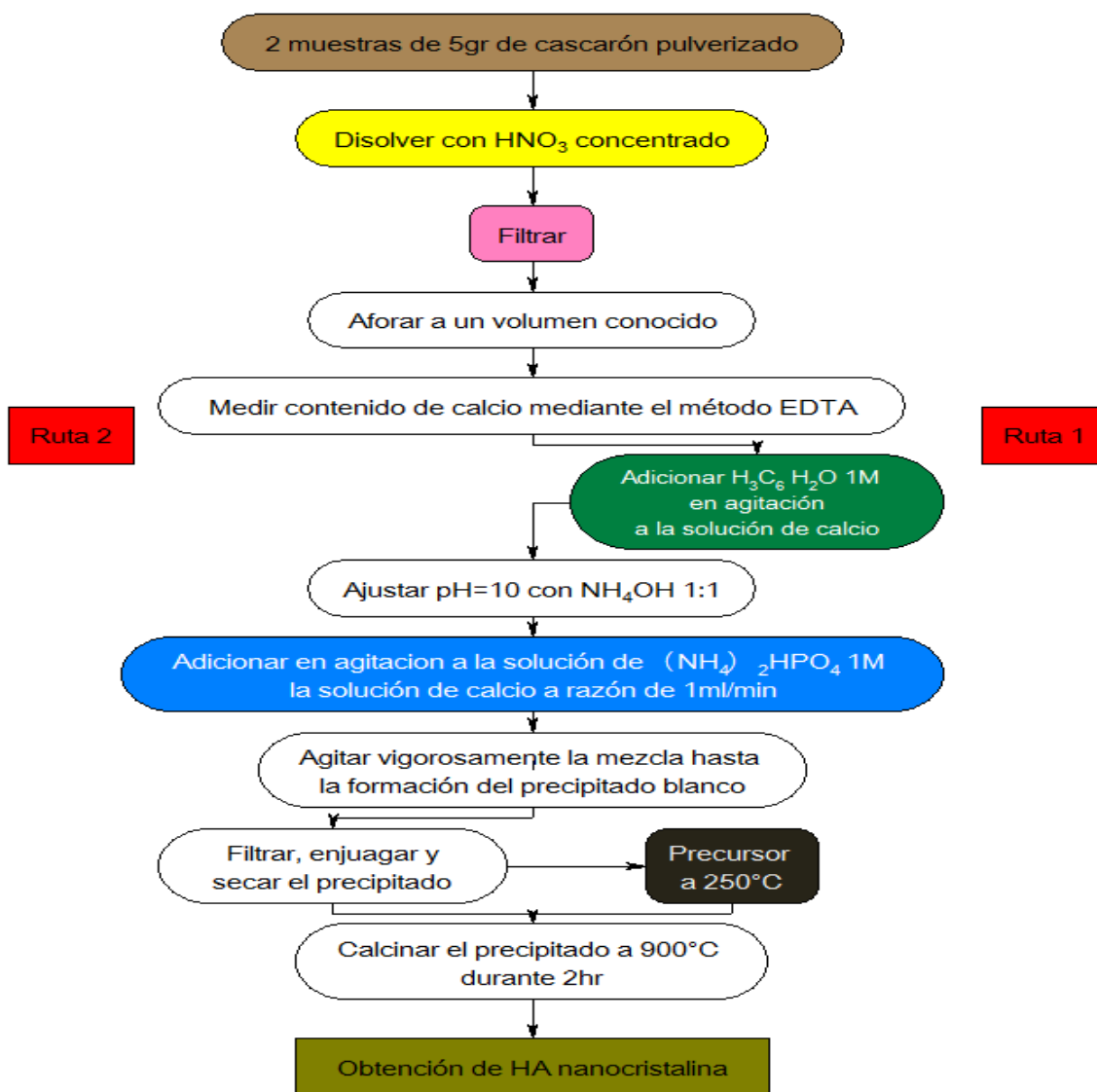


Figura 21. Diagrama de flujo de la síntesis.

b) Análisis de los polvos de HA sintética.

Para hacer el análisis de los polvos de HA obtenidos y verificar tanto su constitución como su pureza, se corrieron espectros IR en un espectrómetro. Dichos análisis se hicieron mediante el protocolo estándar para el manejo del equipo estipulado en el manual.

Capítulo 4: Resultados y discusión.

El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas, su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir y señalar el camino.

Nikola Tesla (1856-1943).

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos para cada fase del proyecto, esto incluye, la modificación del sustrato metálico vía un proceso electroquímico de anodización, así como la síntesis química llevada a cabo mediante un método combinado de precipitación y combustión para la generación de polvos de hidroxiapatita; utilizada esta última como el material cerámico de recubrimiento.

4.1 Recubrimiento biocompatible (HA sintética).

Las Figuras 22 a la 25 muestran los espectros infrarrojos obtenidos durante la síntesis de hidroxiapatita. La figura 22 corresponde a la de la muestra de cascarón de huevo molido inicial, esto es sin tratamiento químico. En ella se aprecia una intensa banda en 1416.08cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo, mientras que la banda media aproximadamente en 870cm^{-1} es asignada a carbonato. Al realizar un comparativo con las librerías del software, se corrobora que el espectro obtenido corresponde a carbonato de calcio (CaCO_3), componente principal del cascarón de huevo.

La figura 23 muestra el espectro del precursor utilizado en la primera ruta de síntesis, calcinado a 250°C , en el cual se pueden observar la presencia de los grupos funcionales característicos para las cerámicas de HA, la banda en 3454.9cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo (OH^-), las bandas en 1341.55cm^{-1} y 1070cm^{-1} corresponden al doble enlace $\text{P}=\text{O}$ y enlace sencillo $\text{P}-\text{O}$, respectivamente, del grupo fosfato. Como se puede apreciar dichas bandas son amplias y poco agudas lo cual pudiera significar un orden cristalográfico pobre presente en el polvo sinterizado a esta temperatura pero que sugiere al mismo tiempo que si bien aún no se genera un arreglo cristalino significativo si están presentes los constituyentes importantes para la obtención de HA sintética.

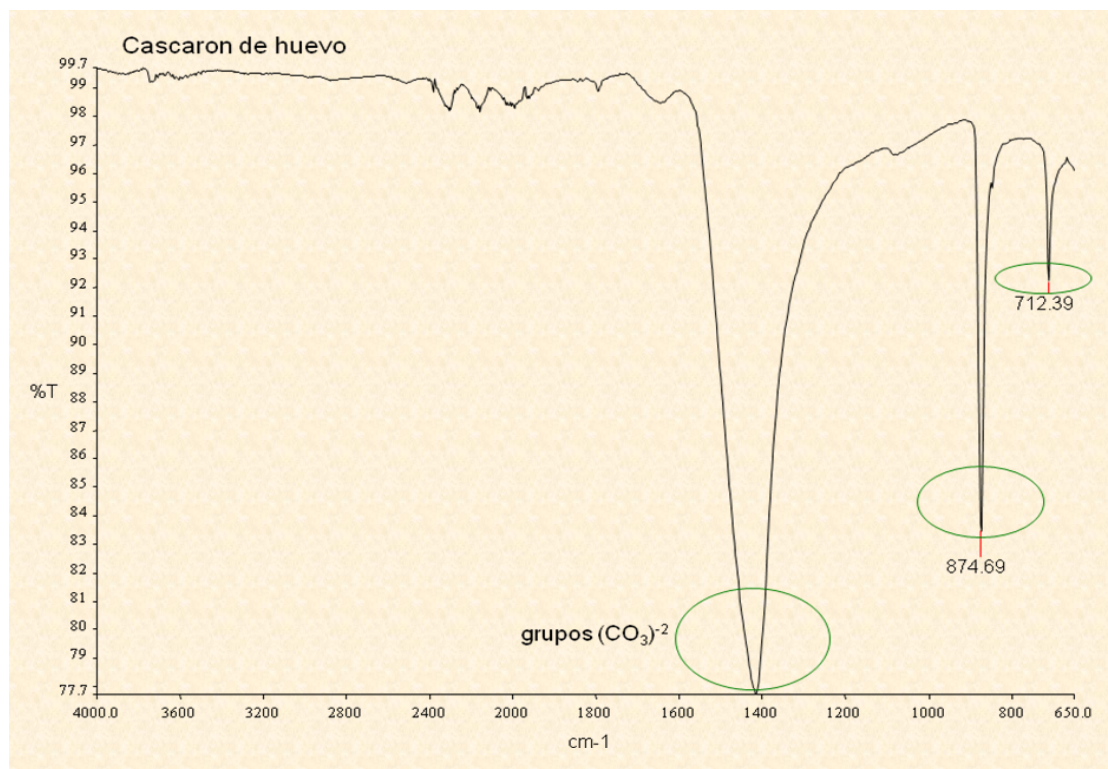


Figura 22. Espectro FT- IR de cascarón de huevo molido.

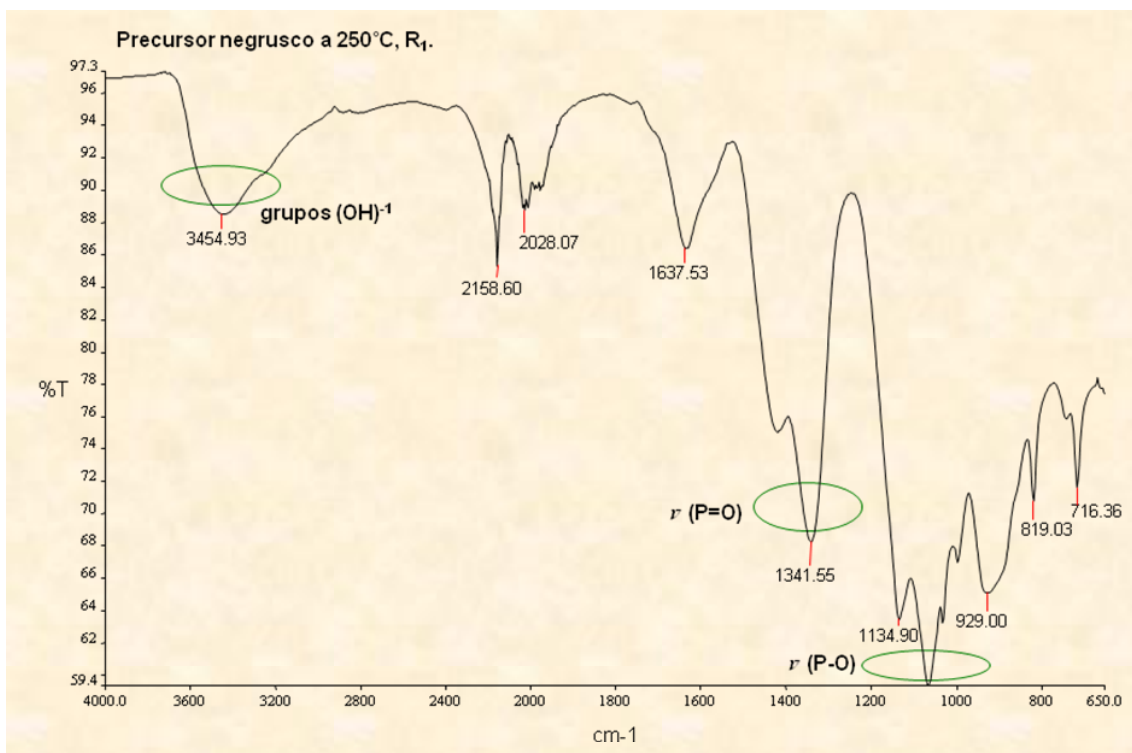


Figura 23. Espectro FT-IR del precursor negrusco a 250°C, obtenido vía la ruta de síntesis 1.

La Figura 24 muestra el efecto de la calcinación a 900°C de la pulpa extraída en el proceso de precipitación (línea negra), la cual ha sido expuesta a esta temperatura sin el lapso de quemado a 250°C por separado sino que se colocó en el horno-mufla aclimatado a temperatura ambiente sin rampas de temperatura adicionales. Como se puede observar los picos o bandas representativas son más agudas y menos amplias lo cual presume una estructura más cristalina y de un posible orden a escala nanométrica.

En las imágenes incluidas al interior del espectro, se aprecia el color blanquizco característico de los polvos de HA sinterizados a altas temperaturas en comparación con el precursor antes mencionado de color negro como consecuencia de la ausencia de los grupos C-O, determinantes en el proceso de combustión. Cabe señalar que el polvo obtenido es de consistencia fina y no presenta grumos.

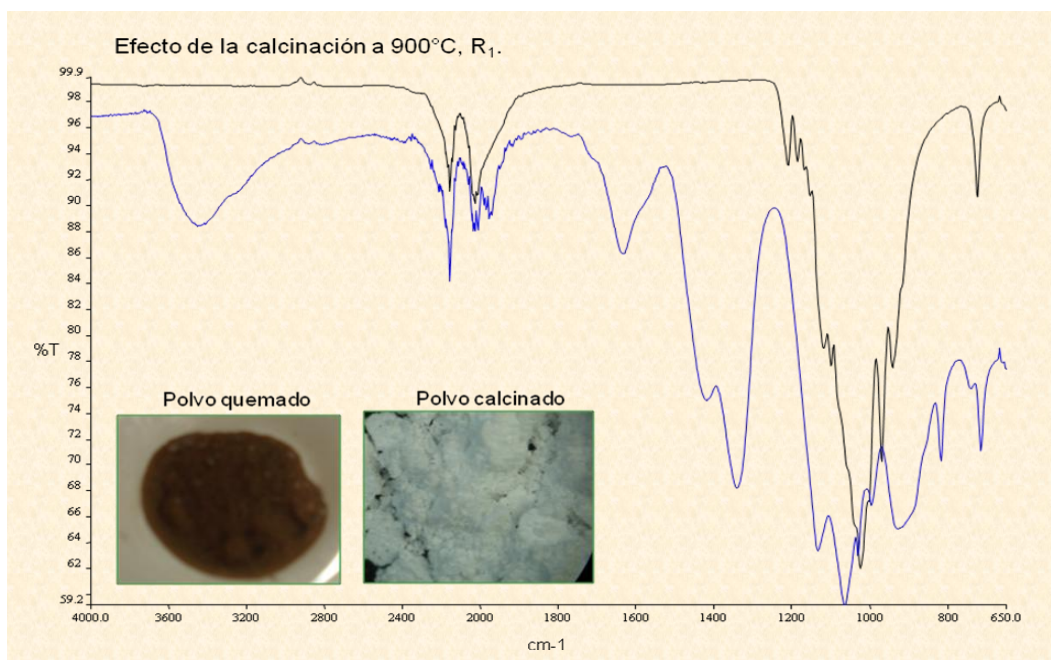


Figura 24. Espectro FT-IR del precursor calcinado a 900°C durante 2hrs.

La Figura 25 muestra el comparativo del proceso de síntesis para la ruta 1 en la cual se puede observar que las bandas de una HA típica están presentes en los polvos sintetizados según la técnica descrita en el capítulo anterior y que de acuerdo al análisis de estos primeros resultados se puede decir que se logró sintetizar HA de buena calidad, misma que puede ser utilizada para posteriores estudios puesto que cuenta con los constituyentes principales como son los iones Ca y P en una relación estequiométrica deseada.

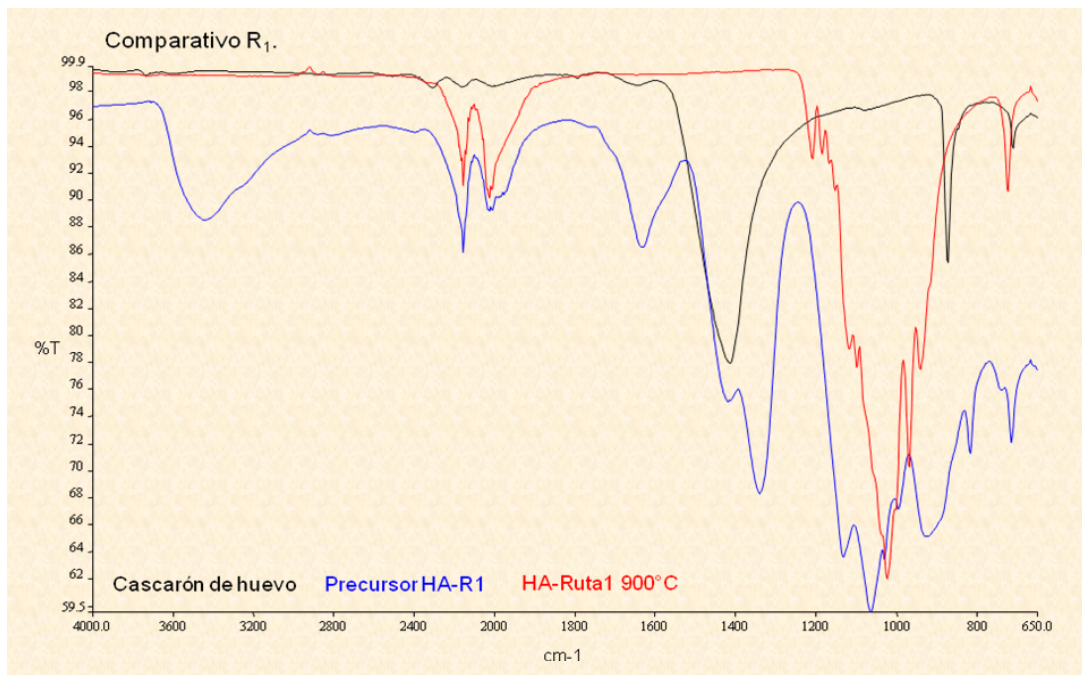


Figura 25. Comparativo de los espectros IR para los polvos tratados a baja y alta temperatura en la ruta de síntesis 1.

Las Figuras 26 a la 28 muestran los espectros infrarrojos de la muestra obtenida vía la ruta de precipitación R₂ (hojuela pulverizada y sinterizado a 900°C), así como su comparativo.

La Figura 26 corresponde a una de las hojuelas obtenidas (pulpa) como resultado del proceso de síntesis, la cual fue secada a 150°C en una estufa y pulverizada para la obtención del espectro. Las vibraciones en la región 900-1200cm⁻¹ se asignan principalmente al estrechamiento simétrico y antisimétrico entre átomos P-O de grupos fosfato, por lo que la intensa banda que aparece en 1017cm⁻¹ se identifica por pertenecer a dicho grupo. Como se había mencionado antes, es de esperar que a tan bajas temperaturas y sin un previo proceso de combustión o calcinado, estén presentes grupos funcionales característicos de una HA típica pero sin un arreglo que defina a la estructura.

La Figura 27 muestra el espectro del polvo calcinado a 900°C en la cual se aprecian bandas mejor definidas para cada uno de los grupos funcionales presentes, como es el caso del pico más significativo a 1070cm⁻¹ correspondiente al fosfato y constituyentes de una HA con arreglo cristalino presumiblemente a nivel nanométrico y por tal motivo sugieren la obtención de una HA sintética de buena calidad en términos de pureza y cristalinidad. Nuevamente en los recuadros inferiores se muestra el color típico del polvo obtenido.

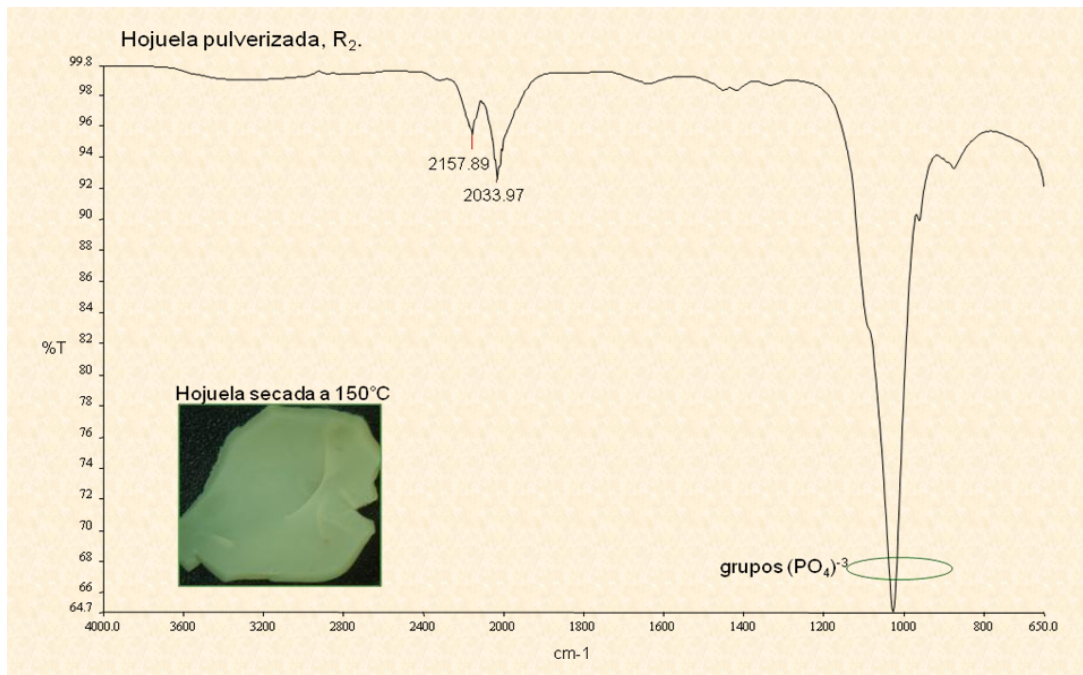


Figura 26. Análisis IR de la hojuela secada a 150°C, obtenida vía la ruta de síntesis 2.

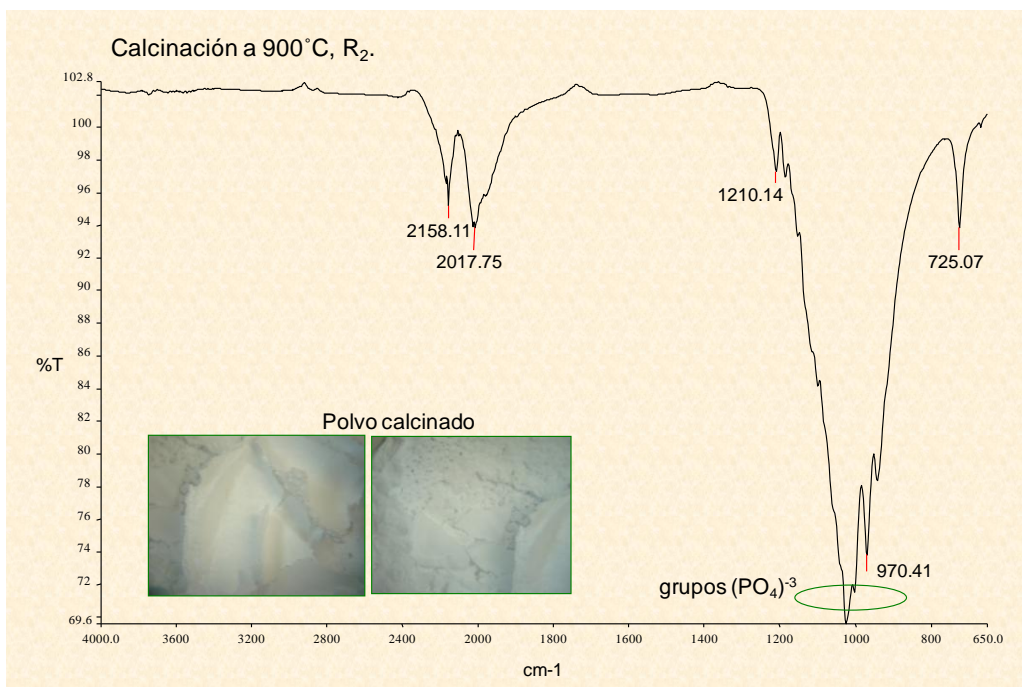


Figura 27. Análisis IR de la muestra calcinada a 900°C.

En la Figura 28 se muestra el comparativo de los espectros obtenidos por las rutas R1(azul) y R2(negro), en donde se aprecia la incorporación satisfactoria del grupo fosfato en esta estructura, representado por la banda alrededor de los 1000 cm⁻¹.

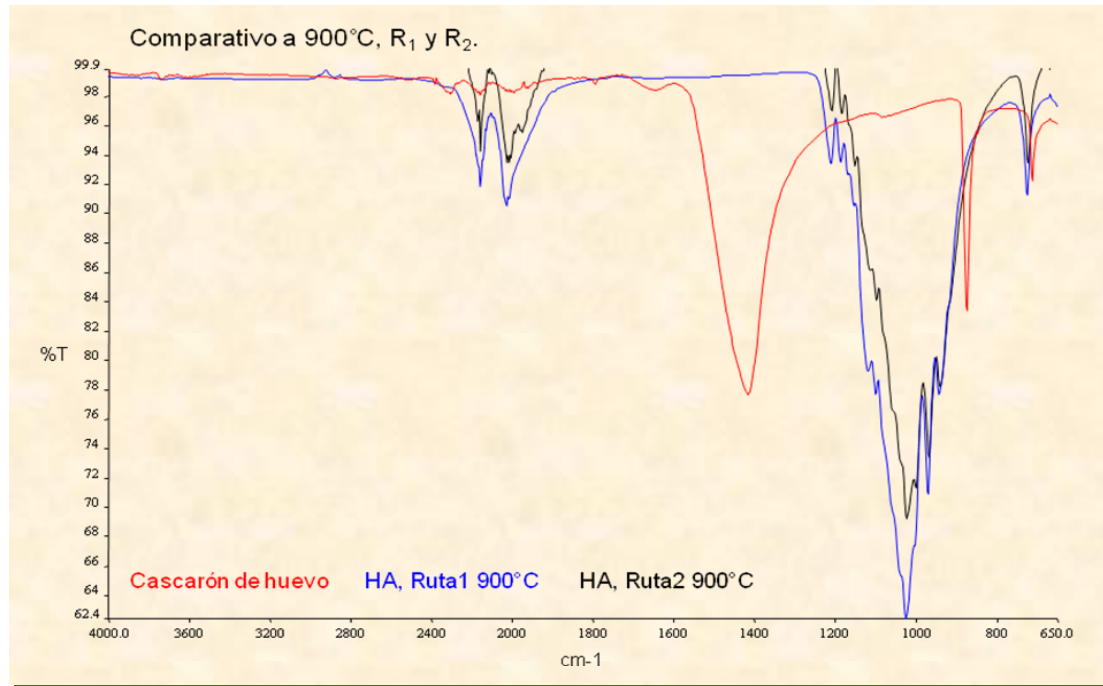


Figura 28. Comparativo de los espectros IR de la muestras obtenidas de ambas rutas de síntesis.

4.2 Modificación superficial del sustrato metálico.

4.2.1 Anodizado de Ti en HF.

La Figuras 29 y 30 muestran los sustratos utilizados en los experimentos de anodizado. Inicialmente se tiene el sustrato desnudo sin modificación y puede observarse que conforme transcurren las fases de tratamiento, existe una coloración tornasol como consecuencia de la deposición de una capa superficial con diferentes espesores.

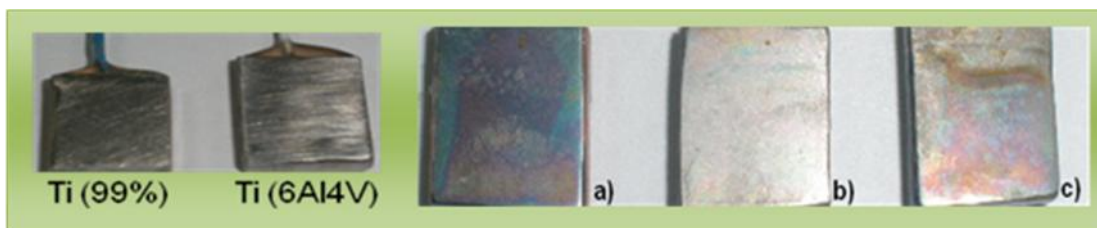


Figura 29. Sustratos metálicos trabajados, izquierda: blancos Ti (99%) y Ti (6Al4V), derecha: placas Ti (6Al4V); a) anodizado sin NaOH, b) anodizado con NaOH y c) anodizado con NaOH y tratamiento térmico.

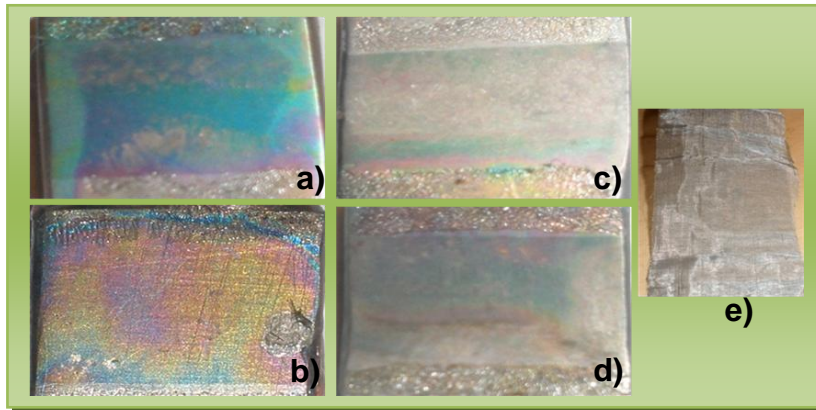


Figura 30. Sustratos metálicos trabajados: a) placa Ti (6Al4V) anodizada sin NaOH, b) placa Ti (6Al4V) anodizada con NaOH y tratamiento térmico, c) placa Ti (99%) anodizada sin NaOH, d) placa Ti (99%) anodizada con NaOH y tratamiento térmico y e) malla de Pt utilizada como cátodo en la celda electroquímica.

En la Figura 31 se muestran las imágenes obtenidas del análisis de fuerza atómica (AFM) para una muestra tratada en la primera fase del experimento en placas de titanio grado 5 denotadas como Ti (6Al4V) (ver Figura 30.a). Dichas imágenes revelan un cambio en la morfología de la superficie como consecuencia del crecimiento anódico de clusters de TiO_2 , formados por estructuras homogéneas, presumidas en un principio por ser nanotubos. Puede observarse que si bien, estos cúmulos son polidispersos, existe un ordenamiento y éstos presentan un diámetro regular entre 200 y 300nm aproximadamente.

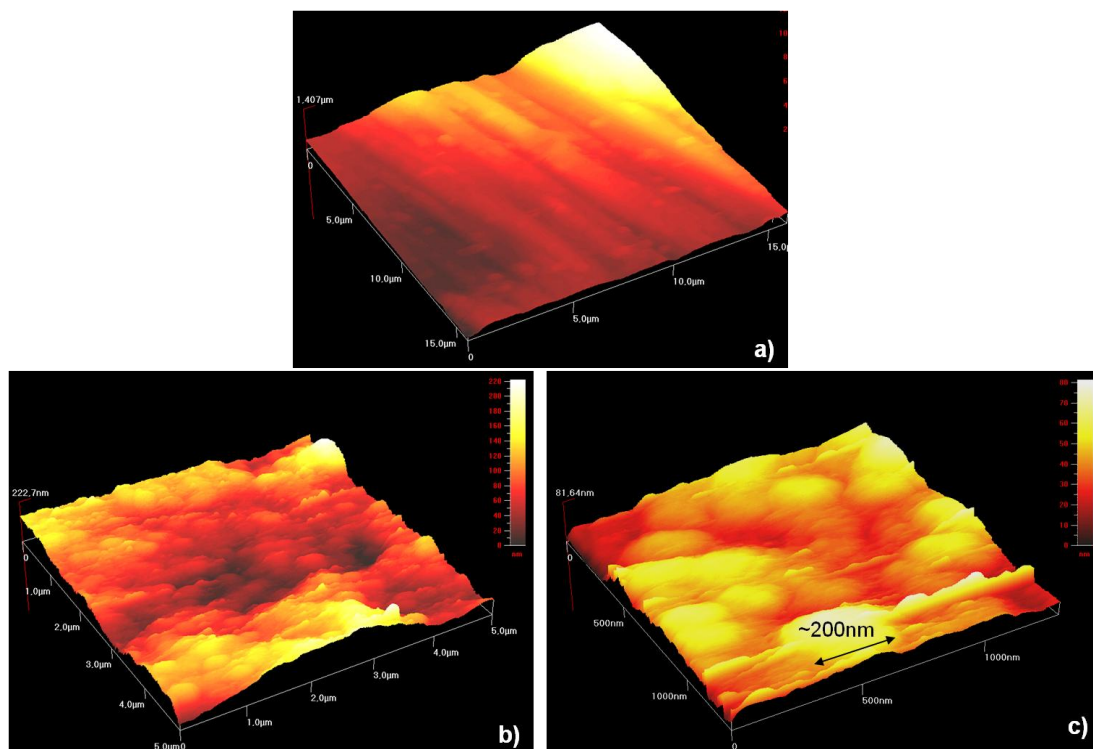


Figura 31. Análisis AFM de la muestra Ti (6Al4V): a) blanco, b) anodizado a escala de $25\mu\text{m}^2$ y c) anodizado a escala de $1\mu\text{m}^2$.

La Figura 32 muestra los comparativos para la muestra después del tratamiento a cuatro fases, de decir, crecimiento anódico, funcionalización, sinterización e inmersión en solución fisiológica sintética durante un periodo de tiempo de 24 horas (ver Figura 30.a-b). Las imágenes superiores corresponden a un crecimiento homogéneo alrededor de las $400\mu\text{m}^2$ y en la inferior nuevamente puede apreciarse el cambio en la morfología de los cúmulos, revelando el tamaño homogéneo presente en ellos y que sugiere el posible ordenamiento de dichas estructuras a una escala nanométrica.

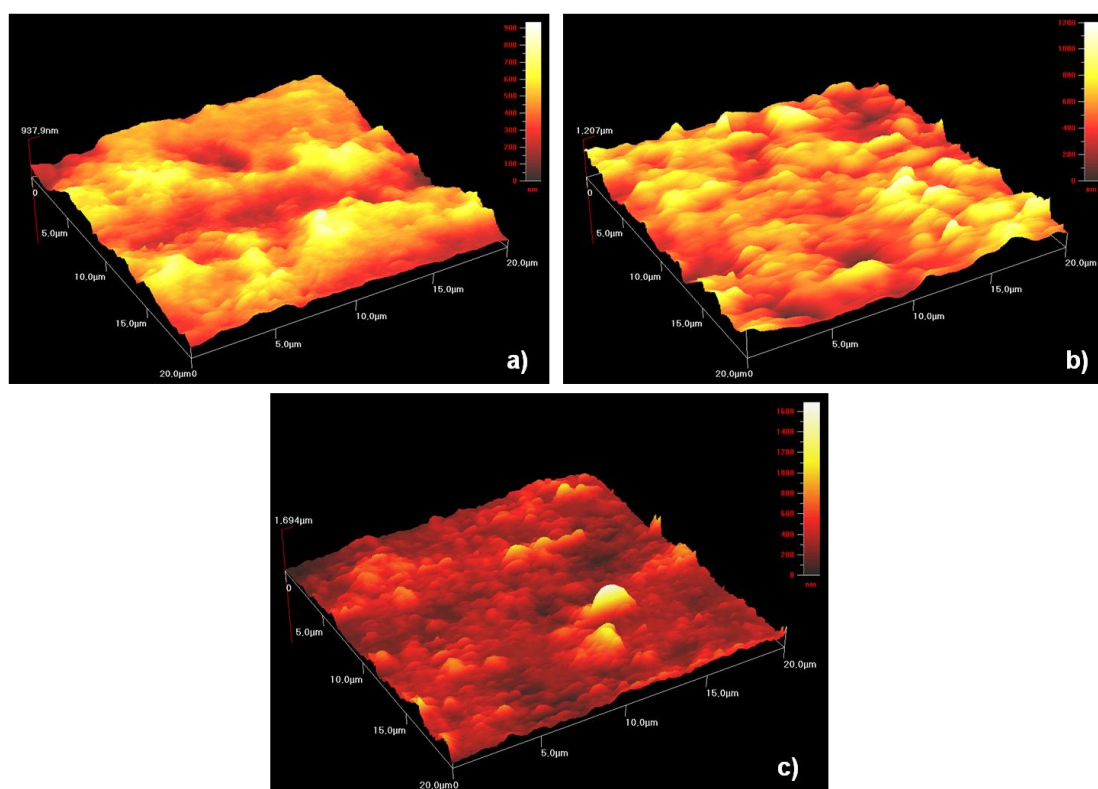


Figura 32. Análisis AFM (secuencia de tratamiento) de la muestra Ti (6Al4V): a) anodizado, b) anodizado con funcionalizado y c) anodizado, tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF.

En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE/EIS) y donde se puede apreciar el comportamiento de la película de óxido crecida sobre los substratos metálicos de Ti (6Al4V) (ver Figura 29.a-c). Las curvas de Nyquist para cada uno de los casos de tratamiento descritos anteriormente indican un comportamiento estable en la película de TiO_2 , la cual no permite procesos de difusión con componentes de la solución y del substrato.

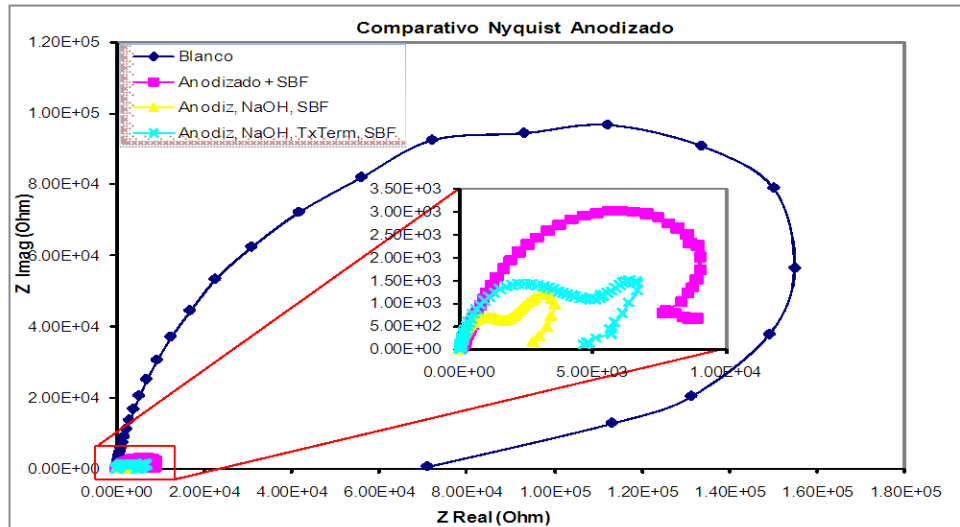


Figura 33. Curva de impedancia para la muestra Ti (6Al4V).

La Figura 34 muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una muestra de Ti (6Al4V) modificada superficialmente vía solo anodización, esto es, sin tratamientos posteriores (ver Figura 30.a). En ella se puede apreciar la morfología de la película de óxido crecida sobre la superficie metálica, la cual posee un arreglo homogéneo de forma porosa que está constituida por estructuras con simetría tubular de TiO_2 con diámetros aproximados de 100nm.

En el recuadro inferior se presenta el espectro de rayos X de electrones dispersados (EDX) para esta misma muestra, en el cual se aprecian los picos asociados con los constituyentes propios del metal y del electrolito utilizado para la prueba, mismo que nos permite suponer que las estructuras formadas sobre la superficie metálica están conformadas por una especie oxidada del metal base.

En la Figura 35 se muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido de una muestra de Ti (6Al4V) anodizada pero tratada químicamente e inmersa posteriormente en solución fisiológica sintética durante un lapso de 3 días (ver Figura 30.b). Como puede observarse, la capa crecida nuevamente presenta una porosidad homogénea en casi toda la superficie del óxido con regiones que muestran una capa adicional depositada sobre esta película anódica que sugiere según los constituyentes de la solución fisiológica, ser HA crecida sobre o en el bulto de los poros tubulares (diámetros ~100nm). Sin embargo podemos apreciar que si bien estos depósitos de fosfato de calcio están presentes en la capa, estos no son homogéneos ni presentan una

tendencia de crecimiento definida, debido posiblemente al tiempo de inmersión o al proceso de funcionalizado; lo que lleva a una no cobertura total de la superficie de los nanotubos de TiO₂ formados. El recuadro inferior corresponde al análisis de rayos X de electrones dispersados de la muestra, en el cual se aprecian además de los picos del metal base, los picos asociados a los elementos de Ca, Na y Cl de la solución fisiológica y que nos permite suponer entonces que dichos depósitos coinciden con el crecimiento de HA sobre los nanotubos.

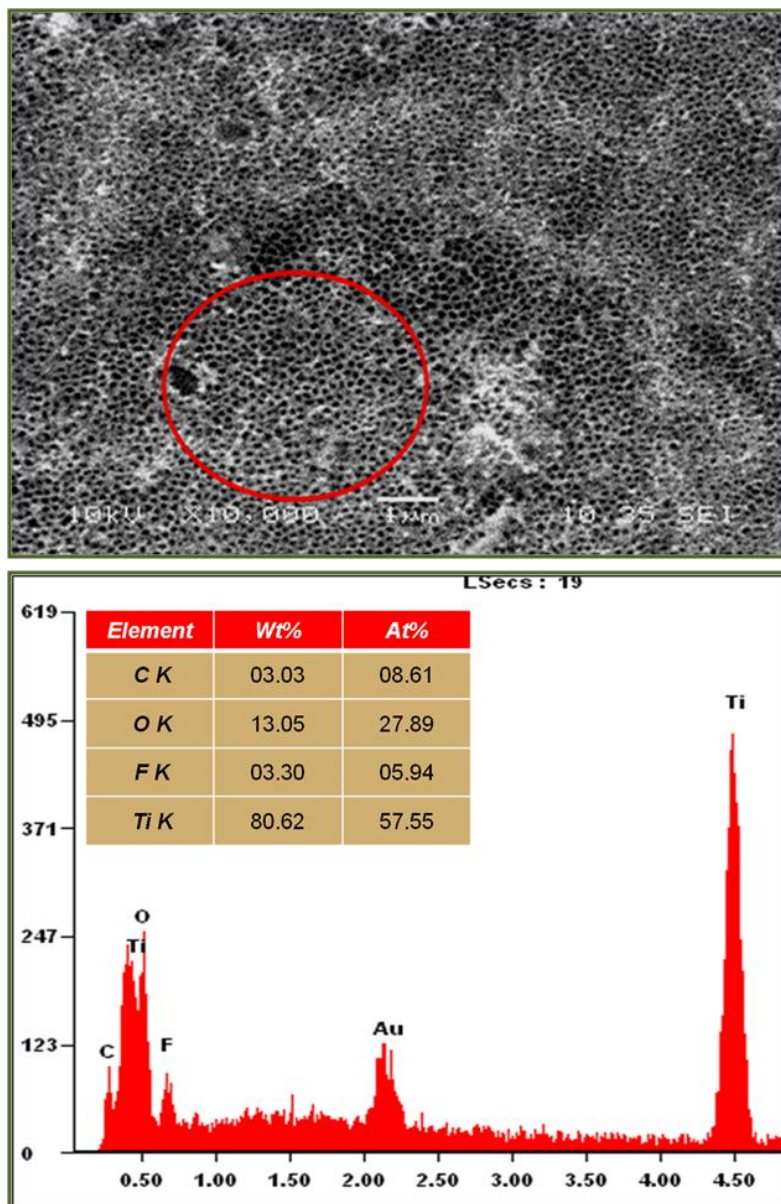


Figura 34. Análisis SEM/EDX de la muestra Ti (6Al4V): anodizado sin tratamientos posteriores.

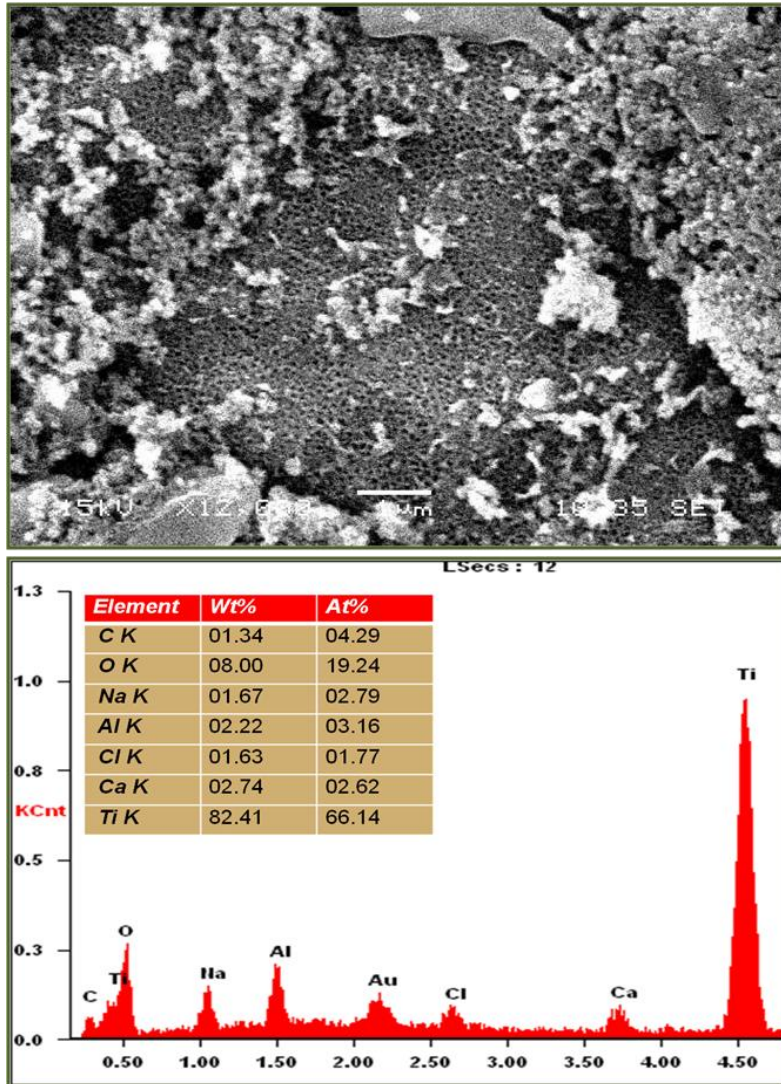


Figura 35. Análisis SEM/EDX de la muestra Ti (6Al4V): anodizado con tratamiento químico e inmersión en SBF (3 días).

En consecuencia, la Figura 36 muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido de una muestra de Ti (6Al4V) anodizada, tratada también químicamente e inmersa posteriormente en solución fisiológica sintética, pero durante un lapso mayor de tiempo de exposición de 5 días. Como se puede observar, los depósitos ahora formados son más homogéneos y cubren casi en su totalidad la película de óxido, se aprecia también una tendencia a crecer o nuclear en el bulbo de las estructuras tubulares y posiblemente a generar una dirección preferencial de crecimiento estructurado.

El recuadro inferior correspondiente al análisis de rayos X de electrones dispersados de la muestra, donde nuevamente se presentan los picos característicos del sustrato metálico y los picos de los elementos de

funcionalización y de la solución sintética; más sin embargo, estos últimos son más agudos y mejor definidos, sugiriendo entonces la presencia de una mayor densidad de iones precipitados y formadores de HA.

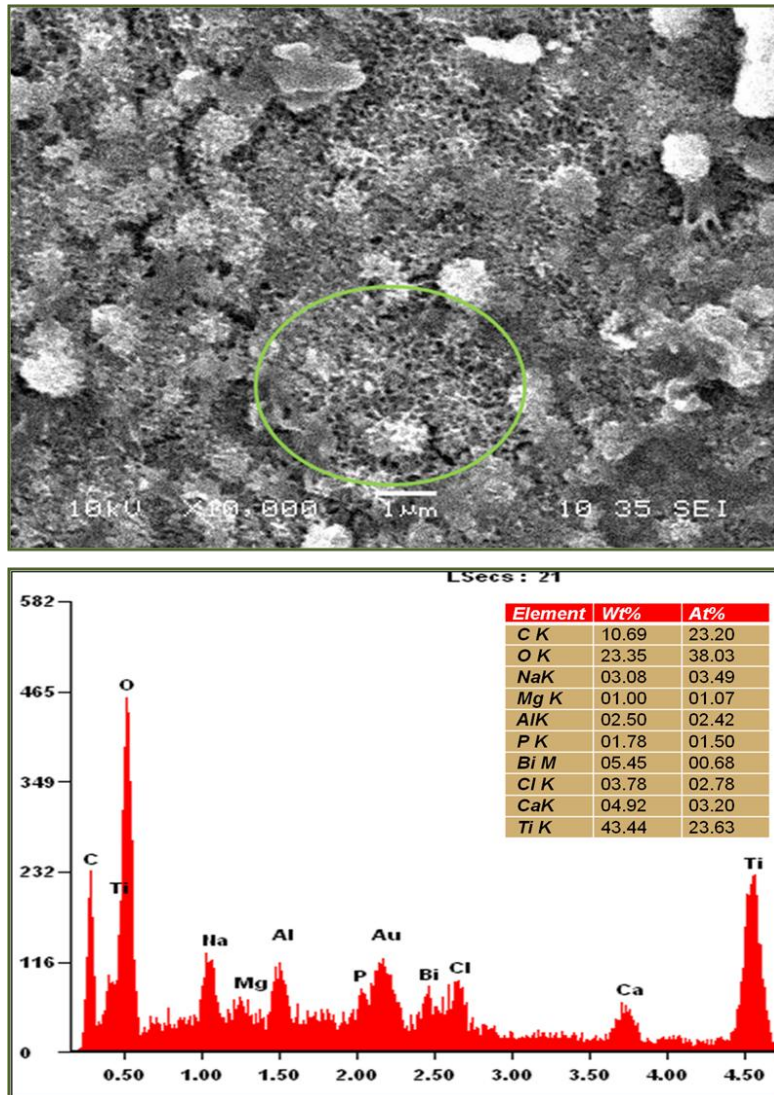


Figura 36. Análisis SEM/EDX de la muestra Ti (6Al4V): anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF.

La Figura 37 muestra las imágenes obtenidas del análisis de fuerza atómica para las muestras tratadas en la segunda fase del experimento en placas de titanio grado 2 denotadas como Ti (99%) (ver Figura 30.a). Dichas imágenes revelan similar al caso de las muestras Ti (6Al4V), un cambio en la composición de la superficie como consecuencia del crecimiento anódico de nanotubos de TiO_2 . Las imágenes superiores corresponden al proceso de anodizado para dos etapas, es decir, anodizado con tratamiento químico y anodizado con tratamientos químicos y térmicos respectivamente. En ellas se puede observar

el cambio en el tamaño del espesor de la capa de la muestra calcinada después de haber sido anodizada y funcionalizada.

Por otro lado, la imagen inferior corresponde a la muestra tratada con todas las etapas, es decir, anodizado, tratamientos químicos y térmicos e inmersión en solución fisiológica sintética durante 5 días, en la cual se puede apreciar el incremento en el grosor de la capa como consecuencia de la formación de depósitos de fosfato de calcio en el óxido cristalino.

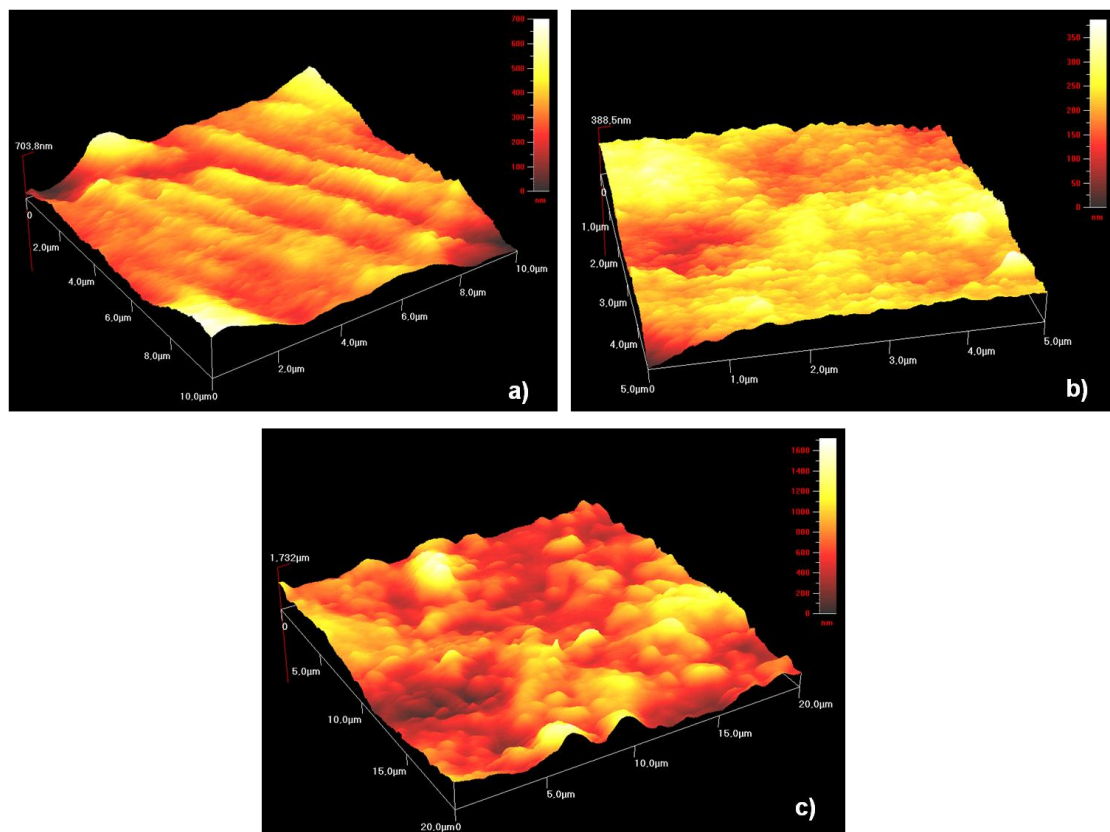


Figura 37. Análisis AFM de la muestra Ti (99%): a) anodizado y tratamiento químico, b) anodizado con tratamientos químico y térmico y c) anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF (5 días).

En la Figura 38 se muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido de una muestra de Ti (99%) anodizada, tratada química y térmicamente e inmersa posteriormente en solución fisiológica sintética, durante un lapso 5 días. Como puede observarse, la capa de HA formada es homogénea, no presenta discontinuidades abruptas que pudieran sugerir una no uniformidad de los depósitos, más sin embargo pueden existir fisuras a escalas más pequeñas. El recuadro inferior corresponde al espectro de de rayos X de electrones dispersados para la muestra, en el cual nuevamente se corrobora la presencia

de las especies reaccionantes en el proceso tanto de anodizado como de funcionalización e inmersión en solución fisiológica sintética y similarmente como en el espectro de la Figura 36, estos son muy agudos y definidos aludiendo pues a una concentración o densidad mayor de estas especies que intervienen en la formación de estos depósitos constituyentes de HA sintética con orden nanométrico en arreglo cristalino.

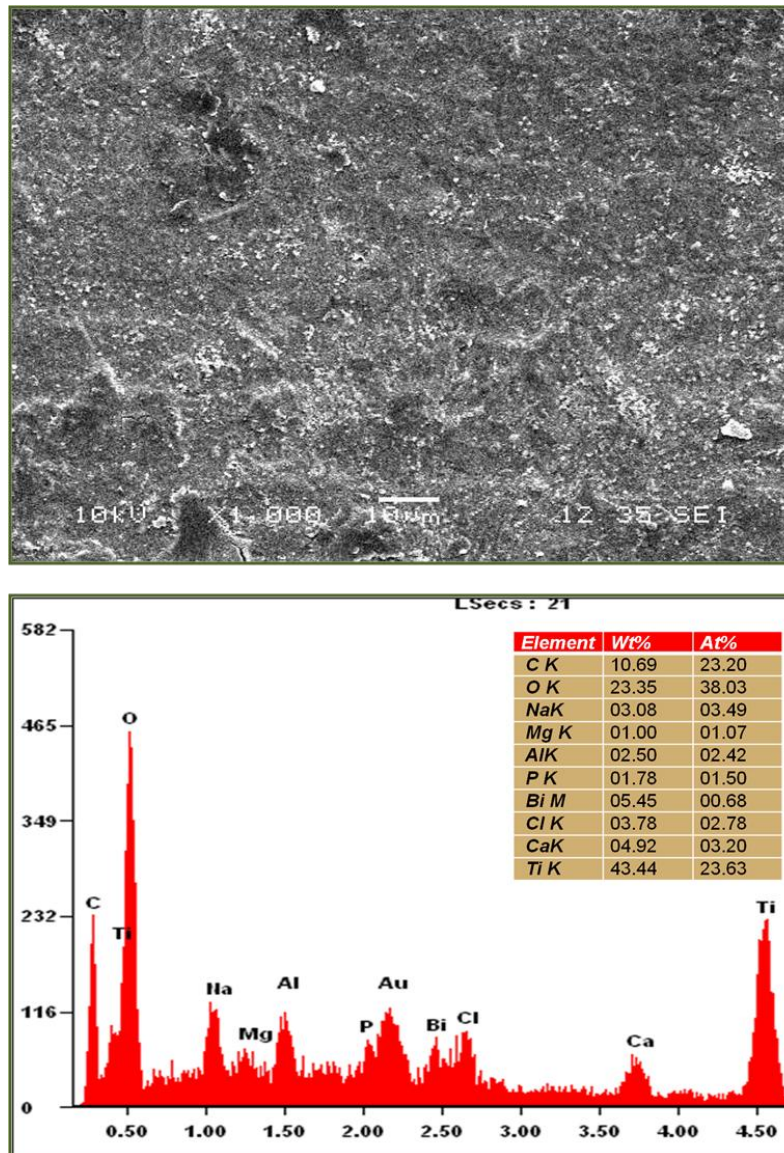


Figura 38. Análisis SEM de la muestra Ti (99%): anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF (5 días).

Por otro lado, la Figura 39 muestra una secuencia a escalas pequeñas de los depósitos generados en la muestra mencionada anteriormente y donde según se observa podemos corroborar el crecimiento estructurado y de orden nanométrico tanto de la película anódica como de la capa de fosfatos de calcio.

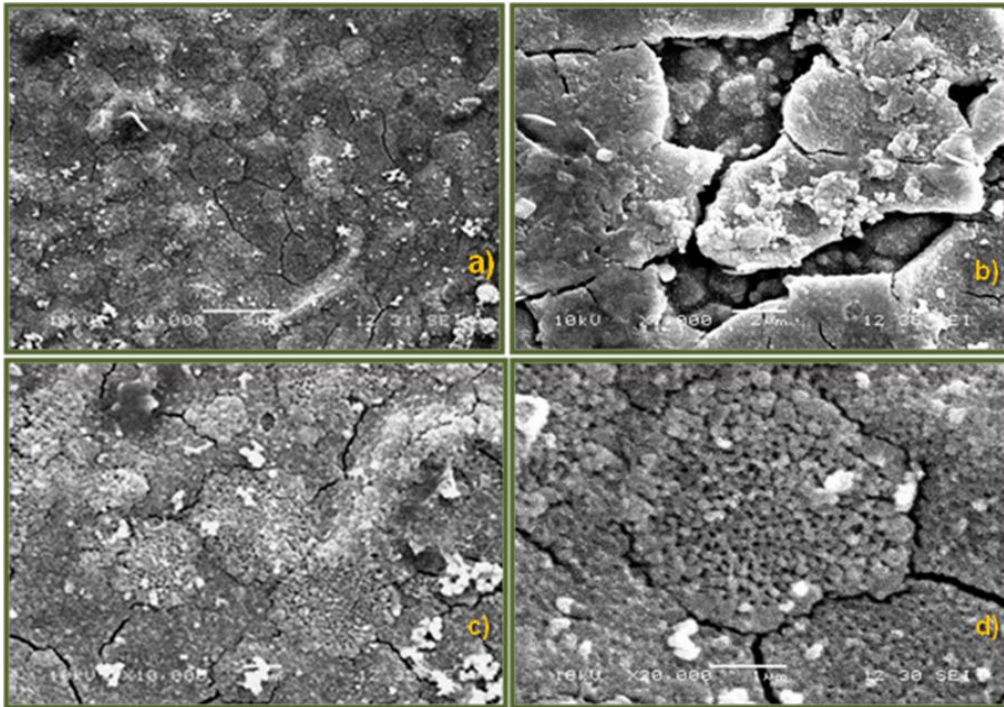


Figura 39. Análisis SEM de la muestra Ti (99%) a escala nanométrica, anodizado con tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF: a) 4000X, b) 7000X, c) 10000X y d) 20000X.

4.1.1 Anodizado de Ti en NH_4F .

La Figura 40 muestra los sustratos metálicos utilizados en los experimentos de anodizado por pulsos invertibles. Como puede observarse, estos fueron montados en un encapsulado de resina para los procesos de pulido y anodizado. La imagen de la izquierda corresponde a la muestra anodizada en NH_4F (electrolito base) con glicerol y la de la derecha con di-etilenglicol como modificador.

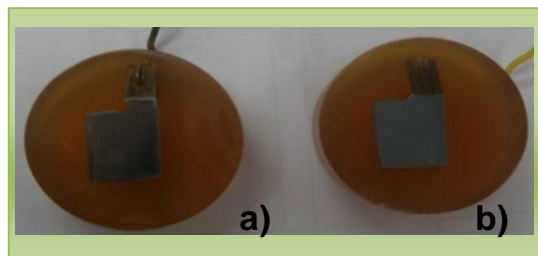


Figura 40. Sustratos metálicos trabajados Ti (6Al4V): a) NH_4F con glicerol y b) NH_4F con di-etilenglicol.

La Figura 41 muestra las imágenes obtenidas del análisis de fuerza atómica (AFM) para las muestras tratadas en la tercera fase del experimento

en placas de titanio grado 5 denotadas como Ti (6Al4V), vía modificación anódica por pulsos. Dichas imágenes revelan similar al caso de las muestras anteriores tanto para Ti (6Al4V) y Ti (99%), un cambio en la composición de la superficie como consecuencia del crecimiento anódico de estructuras homogéneas y más definidas según un orden o dirección de crecimiento, presumidas inicialmente por ser nanotubos de TiO_2 , esto debido a los resultados antes obtenidos.

Las imágenes superiores corresponden de izquierda a derecha al sustrato no modificado y al sustrato modificado vía los pulsos de potencial, para la primera etapa, es decir, anodizado con glicerol como modificador. En las imágenes inferiores se aprecian estructuras como en forma de tubos inclinados muy regulares y homogéneos sobre la superficie del sustrato, las cuales comparando con los resultados obtenidos inicialmente y mostrados en la Figura 41.b es clara la diferencia entre la morfología de la película anódica, debido a la aplicación de una fase anódica de crecimiento del óxido y la fase catódica de disolución del propio óxido que genera una definición de estas estructuras.

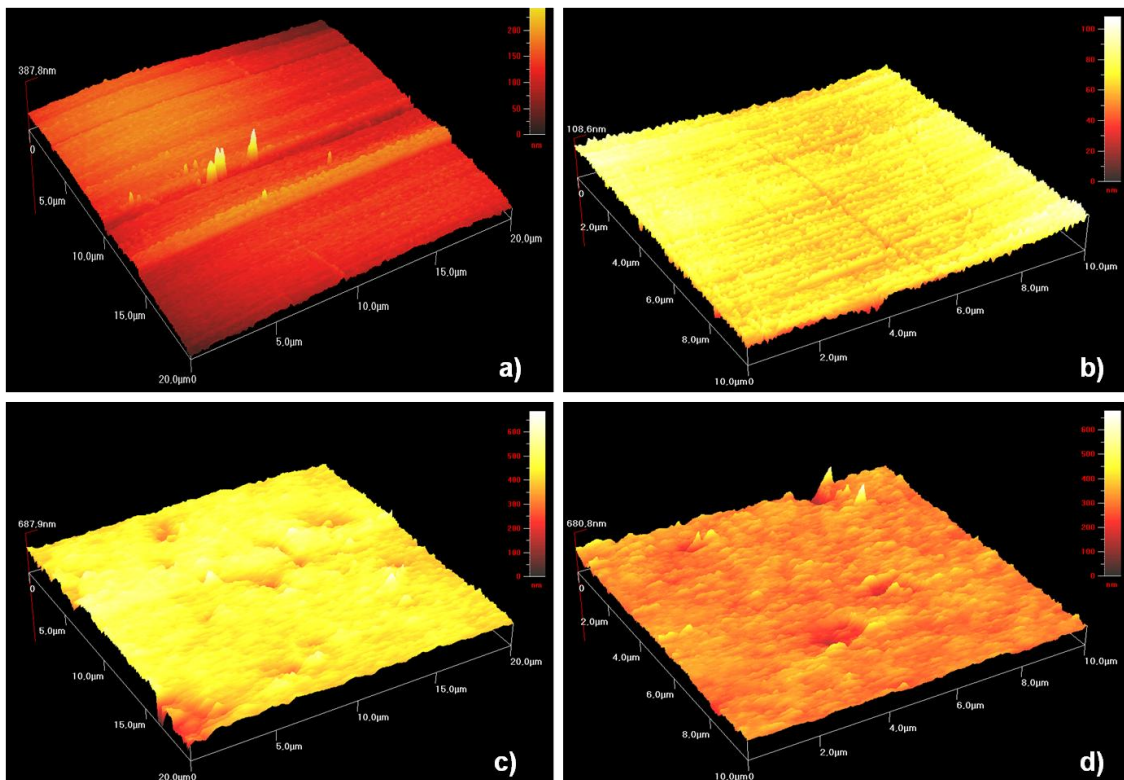


Figura 41. Análisis AFM de la muestra Ti (6Al4V) anodizado con glicerol: a) blanco ($400\mu\text{m}^2$), b) blanco ($100\mu\text{m}^2$), c) anodizado ($400\mu\text{m}^2$) y b) anodizado ($100\mu\text{m}^2$).

En la Figura 42 se muestra las imágenes obtenidas del análisis de fuerza atómica para una muestra de Ti (6Al4V), modificada según la segunda etapa de la metodología, esto es, anodizado con di-etilenglicol como modificador. Nuevamente observamos en las imágenes superiores la capa homogénea formada (derecha) sobre el sustrato metálico (izquierda) con una morfología muy regular y ordenada. Más sin embargo, en las imágenes inferiores son claramente observadas las estructuras tubulares en forma y tamaño, inclusive se puede apreciar en la imagen de la derecha, regiones de $25\mu\text{m}^2$ muy definidas con espesores de capa entre los 100 y 150nm.

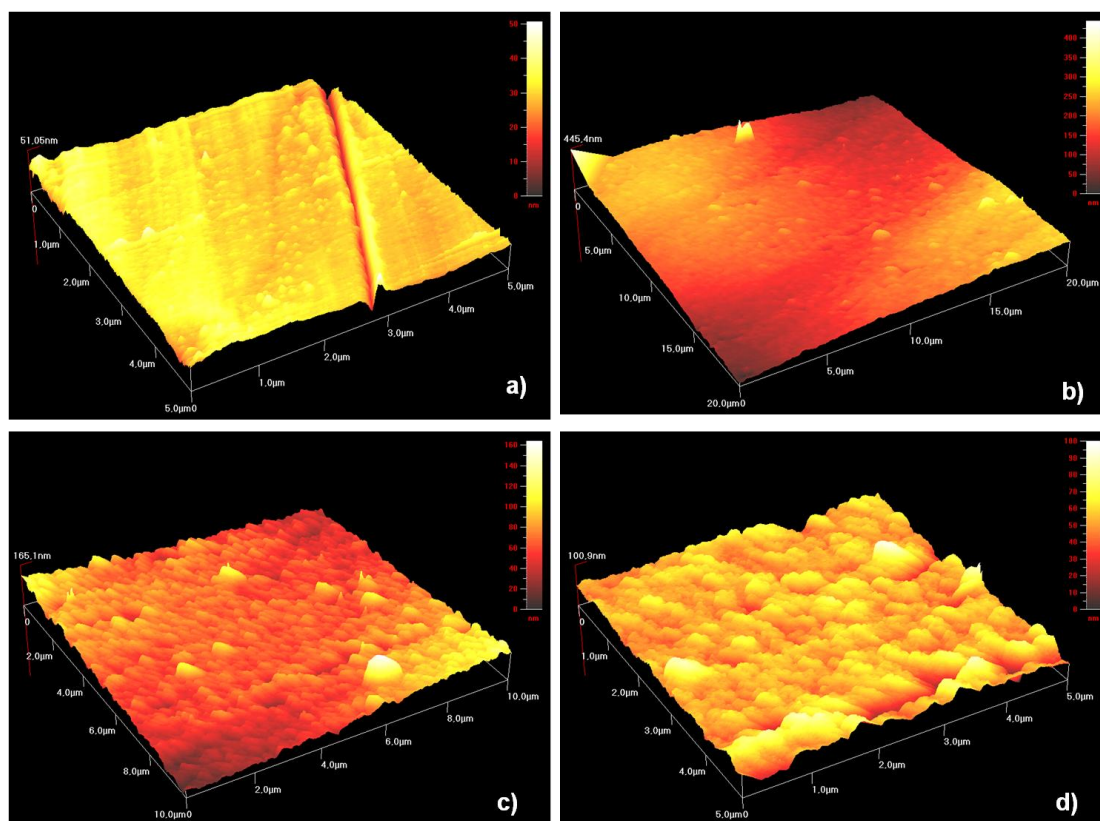


Figura 42. Análisis AFM de la muestra Ti (6Al4V) anodizado con di-etilenglicol: a) blanco ($25\mu\text{m}^2$), b) anodizado ($400\mu\text{m}^2$), c) anodizados ($100\mu\text{m}^2$) y d) anodizado ($25\mu\text{m}^2$).

Por otro lado la Figura 43, corresponde al análisis de microscopía electrónica de barrido de la muestra anterior en la cual se observan los nanotubos de TiO_2 formados sobre la superficie metálica, mismos cuya formación y morfología dependen de la relación de rapidez en la que se lleven a cabo los procesos electroquímicos y la disolución química causada por los iones fluoruro F^- . En general esta relación es controlada por el voltaje aplicado, el cual determina el diámetro de los nanotubos; la concentración de los iones F^- en la solución, determinantes de la longitud de estos y el tiempo de deposición o de duración

de los pulsos. Por otro lado, los demás constituyentes propios de electrolito también juegan un rol importante, por ejemplo los iones amonio NH_4^+ se adsorben sobre la superficie e inhiben la oxidación.

Ahora bien, refiriéndonos precisamente a este tiempo de duración de los pulsos aplicados, es decir, la relación de duración del pulso anódico seguido del catódico mediante un periodo de circuito abierto es precisamente lo que posibilita un cambio en el equilibrio electroquímico del sistema que da como resultado que los procesos de formación y ataque de la película del óxido metálico faciliten el control de los parámetros de grosor y longitud de las estructuras tubulares porosas, generando con ello superficies mas uniformes y estructuradas a nivel nanométrico. Las características geométricas de grosor y longitud de los nanotubos formados para cuando existe un periodo de circuito abierto de 9.3s son aproximadamente de 369nm y 6.3 μm respectivamente.

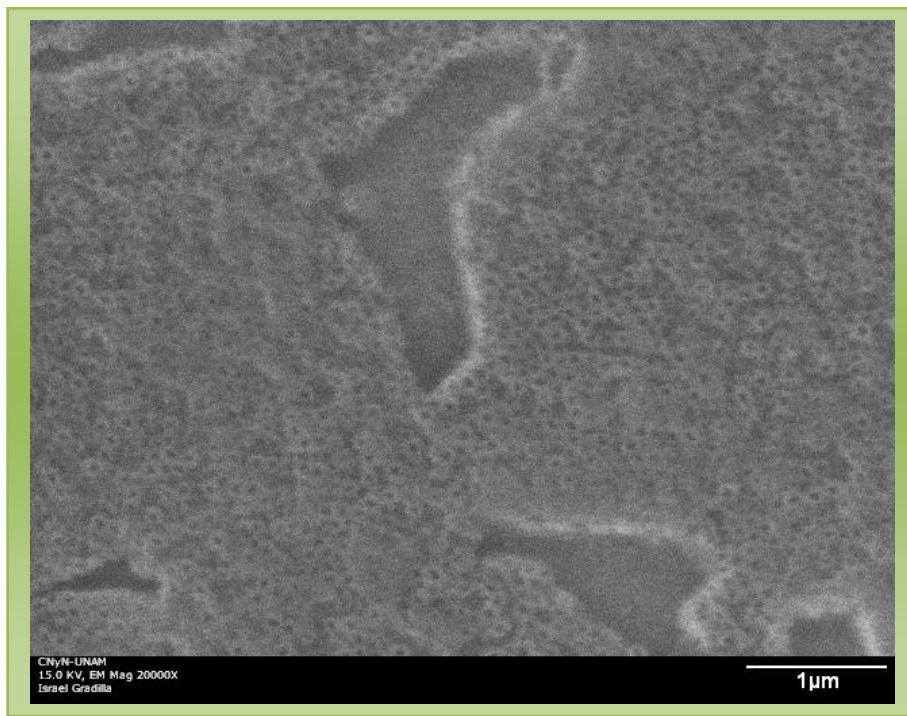


Figura 43. Análisis SEM de la muestra Ti (6Al4V) anodizado con di-etilenglicol.

Capítulo 5: Conclusiones.

Los principios de la física tal y como yo los entiendo, no niegan la posibilidad de manipular las cosas átomo por átomo.

Richard Feynman (1918-1988).

En el presente capítulo se dan a conocer las conclusiones que como resultado del análisis y discusión de la parte experimental se hicieron, así como las recomendaciones que se sugieren a beneficio de los trabajos futuros que se pretenden realizar.

Conclusiones

- Se realizó satisfactoriamente la síntesis de hidroxiapatita por el método de precipitación, utilizando cascarones de huevo como fuente de calcio, permitiendo así la utilización de esos desechos en la síntesis de un cerámico biocompatible para aplicaciones en implantes médicos.
- Los resultados obtenidos con el análisis espectral, indican la adición satisfactoria del grupo fosfato en las hojuelas obtenidas.
- Se logró obtener una película de óxido de titanio utilizando dos técnicas electroquímicas:
 - Anodizado convencional, se obtuvieron estructuras tubulares de dimensiones nanométricas.
 - Anodizado por pulsos, se obtuvieron estructuras tubulares que poseen características geométricas de grosor y longitud aproximadas de 369nm y 6.3 μ m respectivamente, bajo la acción de pulsos potenciodinámicos con fases anódicas y catódicas en el rango de 120v y -5v con un periodo de desconexión de 9.3s. en una solución electrolítica [0.36M] NH₄F con di-etilenglicol como medio modificador. El proceso se llevo a cabo durante 100 horas a temperatura ambiente.
- Las piezas tratadas electroquímicamente, fueron expuestas en solución fisiológica, obteniendo la deposición de una capa adicional de hidroxiapatita.

- Las piezas con hidroxiapatita fueron sometidas a tratamiento térmico, a 900°C, observándose en las microscopías una disminución en el espesor de la capa, la cual se asocia a un reordenamiento de los depósitos de fosfato.
- Los ensayos de EIS indican un comportamiento estable en la película de TiO₂, la cual no permite procesos de difusión con componentes de la solución y del sustrato.

Seguimiento de la investigación.

❖ Obtención y caracterización celular (osteoblastos).

Como indicador de la biocompatibilidad de las prótesis ortopédicas, se propone el uso de la línea de cultivo celular provenientes de tejido óseo (osteoblastos). Las células se manejarán *in vitro*, realizando pruebas de viabilidad en ambiente fisiológico simulado. Los indicadores por monitorear serán las concentraciones de fosfatasa alcalina y osteocalcina, utilizando un espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 25. Asimismo, realizar el monitoreo de la concentración de proteínas y otras funciones enzimáticas.

El medio sintético a utilizar será la solución de Ringer, cuya composición se muestra en la Tabla 11. Dicha solución simula la concentración de sales constituyentes del suero. Dependiendo de las características metabólicas de las células en estudio, se pueden hacer variaciones de pH, adición de nutrientes, minerales, etc., para favorecer el desarrollo óptimo. Los ingredientes son: NaCl (6g), KCl (0.075g), CaCl₂ (0.1g) y NaHCO₃ (0.1g).

NaHCO ₃	NaCl	CaCl ₂	KCl
0.10	6.0	0.10	0.075

Tabla 11. Composición de la solución Ringer (g/L).

❖ Análisis químico.

Realizar ensayos de Espectroscopia de Absorción Atómica para determinar las concentraciones de níquel y titanio en disolución que pudieran liberarse como

producto del proceso de corrosión. Otras sustancias del tipo de nutrientes pueden ser cuantificadas mediante técnicas de volumetría.

❖ Microbalanza de cuarzo.

La microbalanza de cuarzo es una herramienta que puede ser utilizada para el monitoreo in-situ y en tiempo real de la adsorción de macromoléculas y análisis de sus cambios conformacionales. Con esta balanza se podrán realizar los monitoreos de las películas de hidroxiapatita modificada, así como la adhesión que se presente entre ésta(s) y los osteoblastos.

Capítulo 6: Referencias bibliográficas.

En mi opinión, he sido un niño pequeño que, jugando en la playa, encontraba de tarde en tarde un guijarro más fino o una concha más bonita de lo normal. El océano de la verdad se extendía inexplorado delante de mí.

Isaac Newton (1642-1727).

- [1] Guelcher S. A. and Hollinger J. O., *An introduction to biomaterials*, New York, U.S.A.: CRC Press (2006).
- [2] Darimont G. L., Gilbert B. and Cloots R., *Non-destructive evaluation of crystallinity and chemical composition by RAMAN spectroscopy in hydroxyapatite-coated implants*, Mater. Lett. **58**, 71-3 (2003).
- [3] Baltag I., Watanabe K., Kusakari H., Taguchi N., Miyakawa O., Kobayashi M., et al., *Long-term change of hydroxyapatite-coated dental implants*, J. Biomed. Mater. Res. **53**, 76-85 (2000).
- [4] Overgaard S., Lind M., Josephsen K., Maunsbach A. B., Bunger C. and Soballe K., *Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite ceramic coatings on weight-bearing implants: a quantitative and morphological study in dogs*, J. Biomed. Mater. Res. **39**, 141-52 (1998).
- [5] Wang Y., Zhang S., Zeng X., Ma^c L. L., Weng W., Yan W. and Qian M., *Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings*, Acta Biomaterialia **3**, 191-7 (2007).
- [6] Jha L. J., Best S. M., Knowles J. C., Rehman I. and Santos J. D., *Preparation and characterization of fluoride-substituted apatite*, J. Mater. Sci.-Mater. M **8**, 185-91 (1997).
- [7] Barinov S. M., Rustichelli F., Orlovskii V. P., Lodini A., Oscarsson S., Firstov S. A., et al., *Influence of fluorapatite minor additions on behaviour of hydroxyapatite ceramics*, J. Mater Sci.-Mater M **15**, 291-6 (2004).
- [8] Cheng K., Weng W. J., Qu H. B., Du P. Y., Shen G., Han G. R., et al., *Sol-gel preparation and in vitro test of fluorapatite/hydroxyapatite films*, J. Biomed. Mater. Res. **69B**, 33-7 (2004).

-
- [9] Zhang S., Zeng X. T., Wang Y. S., Cheng K. and Weng W., *Adhesion strength of sol-gel derived fluoridated hydroxyapatite coatings*, Surf Coat Technol. **200**, 6350-4 (2006).
- [10] Zhang S., Wang Y. S., Zeng X. T., Cheng K., Qian M., Sun D. E., et al., *Evaluation of interfacial strength and residual stress of sol-gel derived fluoridated hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrates*, Eng Fract. Mech., in press.
- [11] Lee E. J., Lee S. H., Kim H. W., Kong Y. M. and Kim H. E., *Fluoride apatite coatings on titanium obtained by electron-beam deposition*, Biomaterials **26**, 3843-51 (2005).
- [12] Long M. and Rack H. J., *Titanium alloys in total joint replacement: a materials science perspective*, Biomaterials **19**, 1621-39 (1998).
- [13] Kohn D. H., *Metals in medical applications*, Current Opinion Solid State Mater Sci. **3**, 309-16 (1998).
- [14] Kokubo T., Kim H. M. and Kawashita M., *Novel bioactive materials with different mechanical properties*, Biomaterials **24**, 2161-75 (2003).
- [15] Huang Y., Wang Y., Ning C., Nan K. and Han Y., *Hydroxyapatite coatings produced on commercially pure titanium by micro-arc oxidation*, Biomed Mater **2**, 196-201 (2007).
- [16] Gledhill H. C., Turner I. G. and Doyle C., *In vitro dissolution behaviour of two morphologically different thermally sprayed hydroxyapatite coatings*, Biomaterials **22**, 695-700 (2001).
- [17] Gradmann O. and Heimann R. B., *Composition and microstructural changes of engineered plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrates during incubation in protein-free simulated body fluids*, J. Biomed. Mater. Res. **53**, 685-95 (2000).
- [18] Khor K. A. et al., *Microstructure investigation of plasma sprayed HA/Ti6Al4V composites by TEM*, Mater Sci. Eng A **281**, 221 (2000).
- [19] Song W. H., Jun Y. K., Han Y. and Hongs S. H., *Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania*, Biomaterials **25**, 3341-9 (2004).
- [20] Lenka J. et al., *Hydroxyapatite formation on alkali-treated titanium with different content of Na in the surface layer*, Biomaterials **23**, 3095 (2002).

-
- [21] Montenero A. et al., *Hydroxy and fluorapatite films on Ti alloy substrates: sol-gel preparation and characterization*, J. Mater. Sci. **15**, 2791 (2000).
- [22] Kim H.W. et al., *Hydroxyapatite coating on titanium substrate with Titania buffer layer processed by sol-gel method*, Biomaterials **25**, 2533 (2004).
- [23] De Sena L. A., De Andrade M. C., Rossi A. M., and De Almeida G. S., *Hydroxyapatite deposition by electrophoresis on titanium sheets with different surface finishing*, J. Biomed. Mater. Res. A **60** (1), 1-7 (2002).
- [24] Stoch A. et al., *Electrophoretic coating of hydroxyapatite on titanium implants*, J. Mol Struct **596**, 191 (2001).
- [25] Yen S. K., and Lin C. M., *Chalodic reactions of electrolytic hydroxyapatite coating on pure titanium*, Mater Chem Phys **77**, 70-6 (2003).
- [26] Wang J., Layrolle P., Stigter M. and De Groot K., *Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical and cell attachment*, Biomaterials **25**, 583 (2004).
- [27] Marcelo H. et al., *In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness*, J. Mater Sci Mater Med **14**, 511 (2003).
- [28] Maitz M. F. et al., *Promoted calcium-phosphate precipitation from solution on titanium for improved biocompatibility by ion implantation*, Surf Coat Technol **158**, 151-6 (2002).
- [29] Baszkiewicz D. et al., *Influence of the Ca and P-enriched oxide layers produced on titanium and the Ti-6Al-4V alloy by the IBAD methods upon the corrosion resistance of these materials*, Vacuum **70**, 163 (2003).
- [30] Ong J. L., Bessho K., Cavin R. and Carnes D. L., *Bone response to radio frequency sputtered calcium phosphate implants and titanium implants in vivo*, J. Biomed Mater Res **59**, 184 (2002).
- [31] Yang Y. Z., Kim K. H., Agarwal C. M. and Ong J. L., *Effect of post-deposition heating temperature and the presence of water vapour during heat treatment on crystallinity of calcium phosphate coatings*, Biomaterials **24**, 5131 (2003).
- [32] Anselme K. and Bigerelle M., *Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion*, Acta Biomaterialia **1**, 211-22 (2005).

-
- [33] Duerig T., Pelton A. and Stöckel D., *An overview of nitinol medical applications*, Mater Sci. Eng A **273-275**, 149-60 (1999).
- [34] El Medawar L., Rocher P., Hornez J. C., Traisnel M., Breme J. and Hildebrand H. F., *Electrochemical and cytocompatibility assessment of Nitinol memory shape alloy for orthodontic use*, Biomol. Eng. **19 (2-6)**, 153-60 (2002).
- [35] Shevchenko N., Pham M. T. and Maitz M. F., *Studies of surface modified NiTi alloy*, Applied Surface Science **235**, 126-31 (2004).
- [36] Wataha J. C., O'Dell N. L., Singh B. B., Ghazi M., Whitford G. M. and Lockwood P. E., *Relating nickel induced tissue inflammation to nickel release in vivo*, J. Biomed. Mater. Res. **58 (5)**, 537-44 (2001).
- [37] Shih C. C., Lin S. J., Chung K. H., Chen Y. L. and Su Y. Y., *Increased corrosion resistance of stent materials by converting current surface film of polycrystalline oxide into amorphous oxide*, J. Biomed. Mater. Res. **52 (2)**, 323-32 (2000).
- [38] Shih C. C., Lin S. J., Lai S. T., Wu G. J., Kwok C. F., Chen Y. L., Su Y. Y. and Chung K. H., *The cytotoxicity of corrosion products of Nitinol stent wire on cultured smooth muscle cells*, J. Biomed. Mater. Res. **52 (2)**, 395-403 (2000).
- [39] Assad M., Chernyshov A. V., Jarzem P., Leroux M. A., Coillard C., Charette S. and Rivard C.H., *Porous titanium-nickel for intervertebral fusion in a sheep model: part 2. Surface analysis and nickel release assessment*, J. Biomed. Mater. Res. B **64 (2)**, 121-9 (2003).
- [40] Heintz C., Riepe G., Birken L., Kaiser E., Chakfé N., Morlock M., Delling G., Imig H., *Corroded Nitinol wires in explanted aortic endografts: an important mechanisms of failure*, J. Endovasc. Ther **8 (3)**, 248-53 (2001).
- [41] Hassel A. W., *Surface treatment of NiTi for medical applications*, Min Invas Ther & Allied Technol **13 (4)**, 240-7 (2004).
- [42] Wang Y. S., Zhang S., Zeng X. T., Cheng K., Qian M. and Weng W. J., *In vitro behaviour of fluoridated hydroxyapatite coatings in organic-containing simulated body fluid*, Mat Sci Eng C-Bio S, in press.
- [43] Boyan B. D., Dean D. D., Lohmann C. H., Cochran D. L. and Schwartz Z., *Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology*, Annu Rev Mater Res **31**, 371 (2001).

-
- [44] Boyan B. D., Lossdörfer S., Wang L., Zhao G., Lohmann C. H., Cochran D. L. et al., *Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surface with rough microtopographies*, *Euro Cells Mater* **6**, 22-7 (2003).
- [45] Lange R., Lüthen F., Beck U., Baumann A., Rychly J. and Nebe B., *Cell extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material*, *Biomol Eng* **19**, 255-61 (2002).
- [46] Deligianni D. D., Katsala N., Ladas S., Sotiropoulou D., Amedee J. and Missirlis Y.F., *Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption*, *Biomaterials* **22**, 1241-51 (2001).
- [47] Anselme K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*, *Biomaterials* **21**, 667-81 (2000).
- [48] Sinha R.K., Morris F., Shah S. A. and Tuan R. S., *Surface composition of orthopedic implant metals regulates cells attachment, spreading and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro*, *Clean Orthop Relat Res* **305**, 258-72 (1994).
- [49] Howlett C. R., Zreiqat H., Wu Y., McFall D. W. and McKenzie D. R., *Effect of ion modification of commonly used orthopedic materials on the attachment of human bone derived cells*, *J. Biomed Mater Res* **45**, 345-54 (1999).
- [50] Oji M. O. and Wood J. V., *Effects of surface-treated cp Ti and Ti-6Al-4V alloy on the initial attachment on human osteoblast cells*, *J. Mater Sci-Mater Med* **10**, 869-72 (1999).
- [51] Ahmad M., Gawronski D., Blum J., Goldberg J. and Gronowicz G., *Differential response of human osteoblasts-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4*, *J. Biomed Mater Res* **46**, 121-31 (1999).
- [52] Lee T. M., Chang E. and Yang C. Y., *Attachment and proliferation of neonatal rat calvarial osteoblasts on Ti6Al4V: effect of surface chemistries of the alloy*, *Biomaterials* **25**, 23-32 (2004).
- [53] Suh J. Y., Jang B. C., Zhu X., Ong J. L. and Kim K., *Effect of hydrothermally treated anodic oxide films on osteoblasts attachment and proliferation*, *Biomaterials* **24**, 347-55 (2003).
- [54] Mustafa K., Wroblewski J., Hultenby K., Silva Lopez B. and Arvidson K., *Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment*

of cells derived from human mandibular bone: a scanning electron microscopic and histomorphometric analysis, Clean Oral Implant Res **11**, 116-28 (2000).

[55] Mustafa K., Wennerberg A., Wroblewski J., Hultenby K., Silva Lopez B. and Arvidson K., *Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone*, Clean Oral Implant Res **12**, 515-25 (2001).

[56] Lee T. M., Tsai R. S., Chang E., Yang C. I. and Yang M. R., *The cell attachment and morphology of neonatal rat calvarial osteoblasts on the surface of Ti-6Al-4V and plasma sprayed HA coating: effects of surface roughness and serum contents*, J. Mater Sci Mater Med **13**, 341-50 (2002).

[57] Keller J. C., Schneider G. B., Stanford C. M. and Kellog B., *Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment*, Implant Dent **12**, 175-81 (2003).

[58] Xavier S.P., Carvalho P.S.P., Beloti M.M. and Rosa A.L., *Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatment*, J. Dent **31**, 173-80 (2003).

[59] Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P. et al., *The relative influence of the topography and chemistry of Ti-6Al-4V surface on osteoblastic cell behaviour*, Biomaterials **21**, 1567-77 (2000).

[60] Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Dufresne E., Judas D., Lost A. et al., *Qualitative and quantitative study of human osteoblasts adhesion on materials with various surface roughness*, J. Biomed Mater Res **49**, 155-66 (2000).

[61] Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Lost A. and Hardouin P., *Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth*, J. Biomed Mater Res **60**, 529-40 (2002).

[62] Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Ruderman I., Hardouin P. and Lost A., *Improvement in the morphologic of surfaces for cell adhesion: a new process to double human osteoblast adhesion on Ti-based substrates*, Biomaterials **23**, 1563-67 (2002).

[63] Links J., Boyan B. D., Blanchard C. R., Lohmann C. H., Liu Y., Cochran D. L. et al., *Response MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition*, Biomaterials **19**, 2219-32 (1998).

-
- [64] Martin J. Y., Schwartz Z., Hummert T. W., Schraub D. M., Simpson J., Lankford J. et al., *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)*, J. Biomed Mater Res **29**, 389-401 (1995).
- [65] Siebers M. C., Ter Brugge P. J., Walboomers X. F. and Jansen J. A., *Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials: a critical view*, Biomaterials **26**, 137-46 (2005).
- [66] Valdez Salas B., Schorr W. M., Valdez Salas E. and Carrillo B. M., *Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano*, Ciencia y desarrollo en internet, 1-10 (2005).
- [67] Chapter 1: *Overview of biomaterials and their use in medical devices*, Handbook of materials for medical devices-ASTM international (06974G), (2003).
- [68] Rodil S., *Modificación superficial de biomateriales metálicos*, Rev. LatinAm. Metal. Mater **25** (2), 67-83 (2009).
- [69] *Capítulo 1: Introducción*, [en línea]. Recuperado el 02 de febrero de 2012, de http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020146078/1020146078_02.pdf
- [70] Narayan R., *Biomedical Materials*, New York, U.S.A.: Springer (2009).
- [71] Thomas J., *Nanotechnology for bone materials*, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology **1** (3), 336-51 (2009).
- [72] Ramakrishna S., Huang Z. M., Kumar G. V., Batchelor A. W., Mayer J., *An Introduction to Biocomposites: Series on Biomaterials and Bioengineering Vol.1*, Singapore: Imperial College Press (2004).
- [73] Ratner B.D., Hoffman A., S., Schoen F. J., Lemons J. E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, San Diego, U.S.A.: Academic Press (1996).
- [74] Park J., Lakes R. S., *Biomaterials: An introduction. Third Edition*, New York, U.S.A.: Springer (2007).
- [75] Batchelor A. W., Chandrasekaran M., *Service Characteristics of Medical Materials and Implants: Series on Biomaterials and Bioengineering Vol.3*, Singapore: Imperial College Press (2004).
- [76] Shackelford J. F., *Advanced Ceramics Volume 1: Bioceramics*, Singapore: Gordon and Breach Science Publishers (1999).

-
- [77] Duran L., *Composite Materials Research Progress*, New York, U.S.A.: Nova Science Publishers Inc. (2008).
- [78] Yaszemski M. J., Trantolo D. J., Lewandrowski K. U., Hasirci V., Altobelli D. E., Wise D. L., *Biomaterials in Orthopedics*, New York, U.S.A.: Marcel Dekker, Inc. (2004).
- [79] Escamilla R. A., *Corrosión electroquímica de implantes ortopédicos de titanio*, Tesis de Licenciatura: Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California-México (2007).
- [80] Lizarbe M.A., *Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular*, Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp.) **101** (1), 227-49 (2007).
- [81] Mijangos C., Moya J., *Nuevos materiales en la sociedad del siglo XXI*, Madrid: CSIC-Cyan (2007).
- [82] Pareja L. A., García G. C., Abad M. P., Márquez F. M., *Estudio in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos*, IATREIA **20** (1), 12-20 (2007).
- [83] Marchetti E., *Biomateriales en cirugía ortopédica*, EMC **20** (3), 1-4 (2010).
- [84] Climent M. F., *Biomateriales I. Clasificación de los biomateriales*, Rev. R. Acad. Med. Catalunya **8** (3), 139-51 (1993).
- [85] Lindroos V. K., Talvitie M. J., *Recent advances in metal matrix composites*, J. Mater. Pro. Tech. **53** (1-2), 273-84 (1995).
- [86] Ruiz E. M., Delgado M. L., Toralba J. M., *Development of aluminium alloys and metal matrix composites by powder metallurgy*, Advanced Materials Research **23**, 51-58 (2007).
- [87] Toralba J. M., Da Costa C. E., Velasco F., *P/M aluminium matrix composites: an overview*, J. Mater. Pro. Tech. **133** (1-2), 203-6 (2003).
- [88] Toralba J. M., Da Costa C. E., Velasco F., *Materiales compuestos de matriz metálica I parte: tipos, propiedades, aplicaciones*, Rev. Metal. Madrid **36**, 179-92 (2000).
- [89] Witte F., *The history of biodegradable magnesium implants: a review*, Acta Biomaterialia **6** (5), 1680-92 (2010).
- [90] Zhang S. Zhang X., Zhao C., Li J., Song Y., Xie C., Tao H., Zhang Y., He Y., Jiang Y., Bian Y., *Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial*, Acta Biomaterialia **6** (2), 626-40 (2010).

-
- [91] Melini de Paz F., *Calidad y cualidad del titanio para su uso en cirugía ortopédica*, Biomecánica **V (8)**, 64-70 (1997).
- [92] Mareci D., Lucero V., Mirza J., *Effect of replacement of vanadium by iron on the electrochemical behavior of titanium alloys in simulated physiological media*, Rev. Met. Madrid **45 (1)**, 32-41 (2009).
- [93] Ercan B., Webster T. J., *Greater osteoblasts proliferation on anodized nanotubular titanium upon electrical stimulation*, Int. J. Nanomedicine **3 (4)**, 477-85 (2008).
- [94] Long M., Rack H. J., *Titanium alloys in total joint replacement-A materials science perspective*, Biomaterials **19 (18)**, 1621-39 (1998).
- [95] Fernández M., Gil F., *Nuevos materiales en artroplastia total de cadera*, Rev. Ortop. Traumatol. **47**, 434-42 (2003).
- [96] Agrawal C. M., *Reconstructing the human body using biomaterials*, J. of the Minerals, Metals and Materials Soc. **50 (1)**, 31-5 (1998).
- [97] Arismendi J., Agudelo L., Ospina A., *Implantes de superficie lisa o rugosa*, Rev. Internacional de Prótesis Estomatológica (Esp.) **6 (1)**, 203-6 (2004).
- [98] Thomas J., *Nanotechnology for bone materials*, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology **1 (3)**, 336-51 (2009).
- [99] García M. C., González J. L., Escudero M. L., *Estudio de la cinética de oxidación de la superaleación MA956*, Rev. Metal. Madrid **34**, 86-88 (1998).
- [100] Canahua H., Escudero M. L., Ruiz J., *Comparative study of the wear resistance of Al₂O₃-coated MA956 superalloy*, Revista de Metalurgia **36 (5)**, 331-38 (2000).
- [101] Matías J. C., Peón E., *Preparación y caracterización de recubrimientos bioactivos sobre la superaleación MA-956*, Trabajo de diploma: Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana-Cuba (2005).
- [102] Shaw J. A., Kyriakides S., *Thermomechanical aspect of NiTi*, J. of the Mechanics and Physics of Solids **43 (8)**, 1243-81 (1995).
- [103] Elahinia M., Hashemi M., Tabesh M., Bhaduri S., *Manufacturing and processing of NiTi implants: A review*, Progress in materials Science **3 (4)**, 477-85 (2008).

-
- [104] Juan G. E., Pérez G., J., Puértolas R. J., Pérez L. J., Martínez M. A., *Aleación superelástica de níquel-titanio en la reinserción ósea de tejidos blandos*, Rev. S. And. Traum. y Ort. **21 (2)**, 162-68 (2001).
- [105] Michiardi A., Engel E., Planelli J. A., Gil F. J., *Oxidación superficial de aleaciones de Niti para la mejora de la compatibilidad*, Biomecánica **12 (2)**, 71-9 (2005).
- [106] de la Flor L. S., *Simulación numérica y correlación experimental de las propiedades mecánicas en las aleaciones con memoria de forma*, Tesis Doctoral: Departamento de Resistencia de Materiales y Estructuras en Ingeniería, Universidad Politécnica de Cataluña (2005).
- [107] Santamarta M. R., *Caracterización de aleaciones base NiTi producidas por solidificación rápida (melt-spinning)*, Tesis Doctoral: Departamento de Física, Universitat de les Illes Balears (2001).
- [108] Clavijo G. D., Alfonso O. J., Cardozo de M. C., Casadiego T. C., Perea C. A., *Hacia una nueva generación de biomateriales: Primera parte*, Rev. Col. Or. Tra. **24 (3)**, 168-77 (2010).
- [109] Smith W. F., Hashemi J., *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales 4ta edición*, México: Mc GrawHill (2007).
- [110] De Saja J. A., Rodríguez M. A., *Materiales: estructura, propiedades y aplicaciones*, Cengage Learning (2005).
- [111] Suárez B. F., Vélez R. J., *Estudio del modelo de desgaste propuesto por Archard*, DYNA **72 (146)**, 27-43 (2005).
- [112] Razo J. N., Díaz C. F., Sotelo B. F., Melchor M. T., *Prevalencia de alteraciones musculoesqueléticas en jóvenes preparatorianos*, Acta Ortopédica Mexicana **17 (2)**, 60-73 (2003).
- [113] Shanga O., *Epidemiology of rheumatic diseases*, Rheumatology **39 (suppl.2)**, 3-12 (2003).
- [114] Meyer U., Joos U., Mythili J., Stamm T., Hohoff A., Fillies T. et al., *Ultrastructural characterization implant/bone interface of immediately loaded dental implants*, Biomaterial **25**, 1959-67 (2004).
- [115] Cuevas del C. J., Valdés G. G., Elizondo V. F. Pérez O. O., Piña B. M., Leon M. B., *Tratamiento de pérdidas óseas, pseudoartrosis, artrodesis y tumores óseos benignos con un xenoimplante mexicano: estudio clínico*, Cirugía y Cirujanos **77 (4)**, 287-91 (2009).

-
- [116] HeBing C., Gabert S., Pohl M. and Parezanovic I., *High temperature corrosion of NiTi shape memory alloys*, Mat-wiss u Werkstofftech **35**, 332 (2004).
- [117] O'Brien B., Carroll W.M. and Kelly M.J., *Passivation of nitinol wire for vascular implants: a demonstration of the benefits*, Biomater. **23**, 1739 (2002).
- [118] Choi J., Bogdanski D., Köller M., Esenwein S.A. et al., *Calcium phosphate coating of nickel-titanium shape memory alloys*, Biomater. **24**, 3689 (2003).
- [119] Bogdanski D., Esenwein S.A., Prymak O., Epple M. et al., *Inhibition of PMN apoptosis after adherence to dip-coated calcium phosphate surfaces on a NiTi modified by plasma source ion implantation*, Biomater. **25**, 4627 (2004).
- [120] Chen Y. M., Miao X.G., *Thermal and chemical stability of fluorohydroxyapatite ceramics with different fluorine contents*, Biomaterials **26**, 1205-10 (2005).
- [121] Legeros R. Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*, Clin Orthop Relat Res **395**, 81-98 (2002).
- [122] Hing K.A., *Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry*, Int J. Appl Ceram Technol **2**, 184-99 (2005).
- [123] Klaas de Groot, *Clinical applications of calcium phosphate biomaterials: a review*, Ceram Int **19**, 363-6 (1993).
- [124] John A., Varma H.K. and Kumari T.V., *Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system*, J. Biomater Appl. **18**, 63-78 (2003).
- [125] LeGeros R. Z., *Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics*, Clin. Mater **4**, 65-88 (1993).
- [126] Suchanek W. and Yoshimura M., *Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants*, J. Mater Res **13**, 94-117 (1998).
- [127] Vallet R. M., González C. J., *Calcium phosphates as substitution of bone tissue*, Prog Solid State Chem **32**, 1-31 (2004).
- [128] Osborn J. F., Newesely H., *The material science of calcium phosphate ceramics*, Biomaterials **1**, 108-11 (1980).

-
- [129] Benaqqa C, Chevalier J, Saädaoui M., Fantozzi G., *Slow crack growth behavior of hydroxyapatite ceramics*, *Biomaterials* **26**, 6106-12 (2005).
- [130] Vecchio K. S., Zhang X., Massie J. B., Wang M. and Kim C. W., *Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants*, *Acta Biomaterialia* **3**, 910-18 (2007).
- [131] Kaplan D. L., *Mollusc shell structures: novel design strategies for synthetic materials*, *Curr. Opin. Solid State Mater Sci.* **3**, 232-6 (1998).
- [132] Belcher A. M., Wu X. H., Christensen R. J., Hansma P. K., Stucky G. D. and Morse D. E., *Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins*, *Nature* **381**, 56-8 (1996).
- [133] Sudo S., Fujikawa T., Nagakura T., Ohkubo T., Sakaguchi K., Tanaka M. et al., *Structure of mollusc shell framework protein*, *Nature* **387**, 563-4 (1997).
- [134] Lin A., Vecchio K.S. and Meyer M.A., *Mechanical properties and structure of Strombus gigas, Tridacna gigas and Halitos refuscens seashells: a comparative study*, *Mater Sci Eng C* **26**, 1380-9 (2006).
- [135] Oh S-H., Finönes R., Daraio C., Chen L-H., Jin S., *Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes*, *Biomaterials* **26**, 4938-43 (2006).
- [136] Andrade R. M., Estupiñan, H., Peña B. D., Vásquez Q. C., *Comportamiento electroquímico de aleación de Ti6Al4V anodizada en solución de NaH₂PO₄ · 2H₂O*, *Scientia et Technica Año XIII* **36**, 215-20 (2007).
- [137] Valentí J., Guasch J., Sevilla P., Gil F. J., *Anodización del titanio para la mejora ante la degradación química del material quirúrgico*, *Biomecánica* **12** (1), 24-30 (2004).
- [138] Chen J., *Osteoblasts response to anodized commercially pure Titanium in vitro*, Tesis Doctoral: Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls, Universität zu Tübingen (2005).
- [139] Ellingsen J. E., Lyngstadaas S. P., *Bio-implant Interface: Improving Biomaterials and Tissue Reactions*, Boca Raton, U.S.A.: CRC Press LLC (2003).
- [140] *Theoretical introduction to pulse anodizing*, [en línea]. Recuperado el 10 de febrero de 2012, de www.aluconsult.dk.

-
- [141] Zhao J., Wang X., Chan R., Li L., *Fabrication of titanium oxide nanotube arrays by anodic oxidation*, Solid State Communications **134** (10), 705-10 (2005).
- [142] Afshar A., Vaezi M. R., *Evaluation of electrical breakdown of anodic films on titanium in phosphate-base solutions*, Surface and Coating Technology **186**, 398-404 (2004).
- [143] Sul Y., Johansson C., Jeong Y., Albrektsson T., *The electrochemical oxide growth behavior on titanium in acid and alkaline electrolytes*, Medical Engineering and Physics **23**, 329-46 (2001).
- [144] Wernick S., Pinner R. and Sheasby P. G., *The Surface Treatment and Finishing of Aluminum and its Alloys 5 Ed.*, Teddington-Middlesex, England: Finishing Publications LTD. (1987).
- [145] Chanmanee W., Watcharenwong A., Ramannair C., Kajitvichyanukul P., de Tacconi N., Rajeshwrar K., *Formation and characterization of self-organized TiO₂ nanotube arrays by pulse anodization*, 213th ECS Meeting (2008).
- [146] Chanmanee W., Watcharenwong A., Ramannair C., Kajitvichyanukul P., de Tacconi N., Rajeshwrar K., *Titania nanotubes from pulse anodization of titanium foils*, Electrochemistry Communications **9** (8), 2145-49 (2007).
- [147] Cai J., Liu M., Zhang X., *Mechanism for Pulsed Anodizing of Titanium Alloy and Resistance of the Anodizing Coating to Galvanic Corrosion*, Materials Protection **3**, (2009).
- [148] Chanmanee W., Watcharenwong A., Ramannair C., Kajitvichyanukul P., de Tacconi N., Rajeshwrar K., *Formation and characterization of self-organized TiO₂ nanotube arrays by pulse anodization*, J. Am. Chem. Soc. **130** (3), 965-74 (2008).
- [149] Yin Y., Qiu W., Yang L., *Selection of anodizing electrolyte formula and electric wave form for Titanium alloys*, Materials for Mechanical Engineering **12**, (2005).
- [150] Yokoyama K., Konno H., Takahashi H. and Nagayama M., *Anodic oxidation of aluminum utilizing current recovery effect*, AES 2nd.: International Symposium on Pulse Plating, Rosemont Ill USA-Oct. 6-7 (1981).
- [151] Yokoyama K., Konno H., Takahashi H. and Nagayama M., *Advantages of Pulse Anodizing*, Plating and Surface Finishing **69**, 62-5 (1982).

-
- [152] Kuroda K., Shidu H., Ichino R., Okido M., *Formation of Titania/Hydroxyapatite composite films by pulse electrolysis*, Materials Transactions **48** (3), 322-27 (2007).
- [153] Kuroda K., Shidu H., Ichino R., Okido M., *Osteoinductivity of Titania/Hydroxyapatite composite films formed using pulse electrolysis*, Materials Transactions **48** (3), 328-31 (2007).
- [154] Raja K. S., Misra M., Paramguru K., *Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium*, Materials Letters **59**, 2137-41 (2005).
- [155] Iwasaki M., Kudo K., Shimada K., Matsuzaki K., Hamanishi C., *Bone-bonding ability of anodized Titanium plate loaded with Hydroxyapatite particles*, Mater. Res. Soc. Symp. Proc.: Mechanics of Biological and Biomedical Materials **1132**, Z08-08 (2009).
- [156] Saitou M., Mori M., Kawamoto S., *Power-law behaviour of reaction impedance in Titanium anodizing*, The Open Corrosion Journal **2**, 221-24 (2009).
- [157] Mor G. K., Varghese O.K., Paulose M., Shankar K., Grimes C. A., *A review on highly ordered, vertically oriented TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications*, Sol. Energy Mater. **90** (14), 2011-75 (2006).
- [158] Grimes C. A., Mor G. K., *TiO₂ nanotube arrays: Synthesis, Properties and Applications*, New York, U.S.A.: Springer (2009).
- [159] Prakasam H. E., Shankar K., Paulose M., Varghese O. K., Grimes C. A., *A new benchmark for TiO₂ nanotube array growth by anodization*, J. Phys. Chem. C **111** (20), 7235-41 (2007).
- [160] Yoriya S., Prakasam H. E., Varghese O. K., Shankar K., Paulose M., Mor G. K., LaTempa T. J., Grimes C. A., *Initial studies on the hydrogen gas sensing properties of highly-ordered high aspect ratio TiO₂ nanotube-arrays 20 μ m to 222 μ m in length*, Sens. Lett. **4** (3), 334-39 (2006).
- [161] Paulose M., Shankar K., Yoriya S., Prakasam H. E., Varghese O. K., Mor G. K., LaTempa T. J., Fitzgerald A., Grimes C. A., *Anodic growth of highly ordered TiO₂ nanotube arrays to 134 μ m in length*, J. Phys. Chem. B **110** (33), 16179-84 (2006).
- [162] Yoriya S., Paulose M., Varghese O. K., Mor G. K., Grimes C. A., *Fabrication of vertically oriented TiO₂ nanotube arrays using dimethyl sulfoxide electrolytes*, J. Phys. Chem. C **111** (37), 13770-76 (2007).

-
- [163] Su Z., Zhou W., *Formation Mechanism of porous anodic Aluminium and Titanium Oxides*, Adv. Mater. Commun. **20** (19), 3663-67 (2008).
- [164] Macak J. M., Hildebrand H., Marten U., Schmuki P., *Mechanistic aspects and growth of large diameter self-organized TiO₂ nanotubes*, J. Electroanal. Chem. **621**, 254-66 (2008).
- [165] Su Z., Zhou W., *Formation, microstructures and crystallization of anodic titanium oxide tubular arrays*, J. Mater. Chem. **19** (16), 2301-9 (2009).
- [166] Yoriya S., Grimes C., *Self-assembled TiO₂ nanotube arrays by anodization of Titanium in Diethylene Glycol: Approach to extended pore widening*, Langmuir **26** (1), 417-20 (2010).
- [167] Lee W., Scholz R., Gösele U., *A continuous process for structurally well-defined Al₂O₃ nanotubes based on pulse anodization of Aluminum*, Nano Lett. **8** (8), 2155-60 (2008).
- [168] Shankar K., Mor G. K., Prakasam H. E., Varghese O. K., Grimes C. A., *Self-assembled hybrid polymer-TiO₂ nanotube array heterojunction solar cells*, Langmuir **23** (24), 12445-9 (2007).
- [169] Mor G. K., Varghese O.K., Paulose M., Shankar K., Grimes C. A., *A review on highly ordered, vertically oriented TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications*, Sol. Energy Mater. Cells **90** (14), 2011-75 (2006).
- [170] Lehmann V., Gösele U., *Porous silicon formation: A quantum wire effect*, Apply. Phys. Lett. **58** (8), 856-58 (1991).
- [171] Jessensky O., Muller F., Gösele U., *Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina*, Apply. Phys. Lett. **72**, 1173-75 (1998).
- [172] Zwilling V., Aucouturier, Darque E., *Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media: An electrochemical approach*, Electrochim. Acta **45** (6), 921-29 (1999).
- [173] Chanmanee W., Watcharenwong A., Ramannair C., Kajitvichyanukul P., Tacconi N., Rajeshwar K., *Formation and Characterization of Self-Organized TiO₂ Nanotube Arrays by Pulse Anodization*, J. Am. Chem. Soc. **130** (3), 965-74 (2008).
- [174] Shankar K., Mor G. K., Prakasam H. E., Yoriya S., Paulose M., Varghese O. K., Grimes C. A., *Highly-ordered TiO₂ nanotube arrays up to 220 μm in length: use in water photoelectrolysis and dye-sensitized solar cells*, Nanotechnology **18** (6), 065707 (2007).

-
- [175] Beranek R., Hildebrand H., Schmuki P., *Self-organized Porous Titanium Oxide Prepared in H₂SO₄/HF Electrolytes*, *Electrochem. Solid-State Lett.* **6** (3), B12-B14 (2003).
- [176] Macak J. M., Tsuchiya H., Taveira L., Aldabergerwa S., Schmuki P., *Smooth Anodic TiO₂ Nanotubes*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (45), 7463-65 (2005).
- [177] Paramasivam I., Macak J. M., Selvam T., Schmuki P., *Electrochemical synthesis of self-organized TiO₂ nanotubular structures using an ionic liquid (BMIM-BF₄)*, *Electrochim. Acta* **54** (2), 643-48 (2008).
- [178] Macak J. M., Taveira L. V., Tsuchiya h., Sirotna K., Macak J., Schmuki P., *Influence of different fluoride containing electrolytes on the formation of self-organized titania nanotubes by Ti anodization*, *J. Electroceram.* **16** (1), 29-34 (2006).
- [179] Raja K. S., Misra M., Paramguru K., *Formation of self-ordered nanotubular structure of anodic oxide layer on titanium*, *Electrochim. Acta* **51** (1), 154-65 (2005).
- [180] Mohapatra S., Misra M., Mahajan V. K., Raja K. S., *Design of a Highly Efficient Photoelectrolytic Cell for Hydrogen Generation by Water Splitting: Application of TiO_{2-x}C_x Nanotubes as a Photoanode and Pt/TiO₂ Nanotubes as a Cathode*, *J. Phys. Chem. C* **111** (24), 8677-85 (2007).
- [181] Zhao J., Wang X., Chen R., Li L., *Fabrication of titanium oxide nanotube arrays by anodic oxidation*, *Solid State Commun.* **134** (10), 705-10 (2005).
- [182] Zhao J., Wang X., Sun T., Li L., *In situ templated synthesis of anatase single-crystal nanotube arrays*, *Nanotechnology* **16** (10), 2450-4 (2005).
- [183] Xie Y., Zhou L., Huang H., *Enhanced photoelectrochemical current response of titania nanotube array*, *Mater. Lett.* **60** (29-30), 3558-60 (2006).
- [184] de Tacconi N. R., Chenthamarakshan C. R., Yogeewaran G., Watcharenwong A., de Zoysa S., Basit N. A., Rajeshwar K., *Nanoporous TiO₂ and WO₃ films by anodization of Titanium and Tungsten substrates: Influence of process variables on morphology and photoelectrochemical response*, *J. Phys. Chem. B* **110** (50), 25347-55 (2006).
- [185] Wever D. J., Veldhuizen A. G., Sanders M. M., Schakenraad J. M., Horn V., *Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of nickel-titanium alloy*, *Biomaterials* **18** (16), 1115-20 (1997).

-
- [186] Wataha J. C., Lockwood P. E., Schedle A., *Effect of silver, copper, mercury and nickel ions on cellular proliferation during extended low-dose exposures*, J. Biomed. Mater. Res. **52** (2), 360-64 (2000).
- [187] Virtanen S., *Corrosion of Biomedical Implants Materials*, Corrosion Rev. **26** (2-3), 147-71 (2008).
- [188] López G. D., *Biodeterioro y corrosión de implantes y prótesis metálicas*, Medicina (Buenos Aires) **53** (3), 260-74 (1993).
- [189] Diaz M., Sevilla P., Galan A. M., Escolar G., Engle E., Gil F. J., *Evaluation of ion release, cytotoxicity and platelet adhesion of electrochemical anodized 316L stainless steel cardiovascular stents*, J. Biomed. Mater. Res. B-Appl. Biomater. **87B** (2), 555-61 (2008).
- [190] Virtanen S., Milosev I., Gomez B. E., Trebse R. Sab J., Konttinen Y. T., *Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions*, Acta Biomaterialia **4** (3), 468-76 (2008).
- [191] Wataha J. C., O'Dell N. L., Singh B. B., Ghazi M., Whitford G. M. Lockwood P. E., *Relating nickel induced tissue inflammation to nickel release in vivo*, J. Biomed. Mater. Res. **58** (5), 537-44 (2001).
- [192] Witte F., Fischer J., Nellesen J., Crostack H. A., Kaese V., Pisch A., Beckmann F., Windhagen H., *In vitro and in vivo corrosion measurement of magnesium alloys*, Biomaterials **27** (7), 1013-18 (2006).
- [193] Milosevski M., Milosevska D., Spaseska J. Bossert J., Boccaccini A. R., *Preparación y propiedades de materiales cerámicos bioinertes en el sistema Al_2O_3 - TiO_2 - SiO_2* , Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio **38** (6), 455-60 (1998).
- [194] Vallet R. M., *Biocerámicas*, Anales de Química **99** (2), 167-75 (2003).
- [195] Elliott J. C., *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Amsterdam: Elsevier (1994).
- [196] Kumta P. N., Sfeir C., Lee D.-H. Olton D., Choi D., *Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization*, Acta Biomaterialia **1**, 65-83 (2005).
- [197] Suchanek W., Yoshimura M., *Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants*, J. Mater. Res. **13** (1), 94-117 (1998).
- [198] Legeros R. Z., *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Basel: Karger (1991).

[199] Gaona L. M., *Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica*, Tesis Doctoral: Facultat de Química-Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica, Universitat de Barcelona (2007).

[200] Annual Book of ASTM Standards, *Standard Specification for Composition of Hydroxyapatite for Surgical Implants: ASTM F1185-03*, American Society for Testing Materials **13.01**, (2003).

[201] Dorozhkin S. V., *Review: Amorphous calcium (ortho) phosphates*, Acta Biomaterialia **6**, 4457-75 (2010).

[202] Dorozhkin S. V., *Review: Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates*, Acta Biomaterialia **6**, 715-34 (2010).

[203] Donnay G., Pawson D. L., *X-ray diffraction studies of echinoderm plates*, Science **166** (3909), 1147-50 (1969).

[204] W. White E., N. Weber J., A. White R., *Materials useful for prosthetic devices and the like*, US Patent **3890107**, June 17 (1975).

[205] Roy D. M., *Porous biomaterials and methods of making same*, US Patent **3929971**, December 30 (1975).

[206] Esparza L. M., Echavarría A., Suárez R., Herrera N., *Hidroxiapatita macroporosa obtenida en la Universidad de Antioquia: Síntesis, caracterización y comparación con el hueso esponjoso y calcinado de bovino*, Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia **30**, 109-24 (2003).

[207] Leroy N., Bres E., *Structure and substitutions in fluorapatite*, European Cells and Materials **2**, 36-48 (2001).

[208] Rodríguez M. R., Gómez M. J., Rodríguez C. R., Bardoní F. F., *Biomaterial de restauración ósea*, Rev. Cubana Invest. Bioméd. **18** (3), sep.-dic. (1999).

[209] Gonzalez R., Melo M. C., Perez R. A., Rodriguez A., *Hidroxiapatita porosa HAP-200: Principales características Físico-químicas*, Química Nova **16** (6), 509-12 (1993).

[210] Arias F. J., *Nuevos enfoques para mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de compuestos cálcicos para su uso como substitutos óseos*, Revista electrónica Veterinaria **8** (12), 1695-7504 (2007).

-
- [211] García G. M., Reyes G. J., *La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica*, Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas **9 (2)**, 90-5 (2006).
- [212] Pan H., Zhao X., W. Darvell B., W. Lu W., *Apatite-formation ability-Predictor of 'bioactivity'?*, Acta Biomaterialia **6**, 4181-8 (2010).
- [213] Petricca S., Marra K., Kumta P., *Chemical synthesis of poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications*, Acta Biomaterialia **2**, 277-86 (2006).
- [214] Elliott J. C., Wilson R. M., Dowker S. E., *Apatite Structures*, Adv. X-ray Analysis **45**, 172-81 (2002).
- [215] Hernández T. R., Palma C. R., Piña B. M., *Hidroxiapatita y sus aplicaciones*, Rev. Mex. Fís. **45 (S1)**, 144-7 (1999).
- [216] Yasuda H., Mahara S., Umakoshi Y., *Microstructure and mechanical property of hydroxyapatite/calcium-deficient hydroxyapatite composites prepared by a colloidal process*, Materials Transactions **42 (11)**, 2392-7 (2001).
- [217] Estupiñán D. H., Peña B. D., Vásquez Q. C., Laverde C. D., Lozano U. L., Jaimes J. C., *Efecto de la adición de biovidrio e hidroxiapatita en ácido poli-L-láctico sobre la adsorción superficial de fosfatos*, AVANCES-Investigación en Ingeniería **12**, 33-42 (2010).
- [218] Nair M., Varma H., Kumary T. Babu S. S., John A., *Cell interaction studies with novel bioglass coated hydroxyapatite porous blocks*, Trends Biomater. Artif. Organs **19 (2)**, 108-14 (2006).
- [219] Wang Y., Zhang S., Zeng X., Ma^c L., Weng W., Yan W., Qian M., *Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings*, Acta Biomaterialia **3**, 191-7 (2007).
- [220] Snyders R., Music D., Sigumonrong D., SchelInberger B., Jensen J., Schneider J. M., *Experimental and ab initio study of the mechanical properties of hydroxyapatite*, Appl. Phys. Lett. **90**, 193902-4 (2007).
- [221] Ivonnet G. I., Cordiví F. C., Ferro del Pino E., García M. J., Fuentes F. G., *Perfeccionamiento de la tecnología para la producción de hidroxiapatita a escala de banco*, Trabajo de Diplomado: Facultad de Ingeniería Química-Centro de Biomateriales, Instituto Superior Politécnico de La Habana,1-58 (2005).

[222] Gómez O. J., Elizondo V. N., Guerrero V. H., *Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita*, Ingenierías **7 (24)**, 46-50 (2004).

[223] Hernández T. R., Palma C. R., Piña B. Ma., *Hidroxiapatita y sus aplicaciones*, Rev. Mex. Fís. **45 (1)**, 144-7 (1999).

[224] Fernigrini P., Cámara O. R., Oliva F. Y., *Síntesis y caracterización de distintas apatitas: Su utilización como biomaterial*, 2^{do}. Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales-Asociación Argentina de Materiales, 16-17 Oct. (2008).

[225] Londoño M., Echavarría A., De la Calle F., *Características cristalológicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas*, Rev. EIA **5**, 109-18 (2006).

[226] Almirall A., Delgado J. A., Alfonso A., *Fosfatos de calcio porosos: Métodos de preparación*, VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería: Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana (2007).

[227] Vang X. J., Liang C. Y. Cai Y. L., Hu K., Wei Q., Cui Z. D., *Recombinant human-like collagen modulated the growth of nano-hydroxyapatite on NiTi alloy*, Mater. Sci. Eng. C **29**, 25-8 (2009).

[228] Rubio E., Gaspariano O. B., Mendoza A. D., Rodríguez L. V., *Crecimiento biomimético de hidroxiapatita sobre colágeno: Participación de estudiantes en proyectos que desarrolla el CUV con el sector productivo*, [en línea]. Recuperado el 10 de febrero de 2012 de http://www.amemi.org/Docs/simposia_materiales/carteles/126_crecimiento_biomimetico.pdf

[229] González P. R., Ferreira A., Noris S. K., Feijoo J., *Caracterización de la interacción colágeno-hidroxiapatita*, XII Coloquio Venezolano de Polímeros-Universidad de Oriente, Cumana 2007: Rev. Iberoam. Polim. **9 (3)**, 300-2 (2008).

[230] Peña B. D., Estupiñán D. H., Córdoba T. E., Martínez R., Vásquez Q. C., *Recubrimientos de quitosano/fosfato de calcio obtenidos por electrodeposición sobre una aleación de titanio*, Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia **54**, 15-23 (2010).

[231] Cheng X., Li Y., Zuo Y., Zhang L., Li J., Wang H., *Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration*, Mater. Sci. Eng. C **29**, 29-35 (2009).

[232] Peniche C., Solís Y., Davidenko N., García R., *Chitosan/hydroxyapatite-based composites*, Biotecnología Aplicada **27**, 202-10 (2010).

-
- [233] Villora J. M., Callejas P., Barba M. F., *Métodos de Síntesis y comportamiento térmico del hidroxapatito*, Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio **41** (5), 443-50 (2002).
- [234] Martins S. M., García C. R., Silas D., Giulietti M., Rodríguez R. C., *Técnicas de obtención de hidroxapatita y otros fosfatos de calcio*, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Divisao de Química Predio **36**, 1-8 (2008).
- [235] Garcia C., Paucar C., Gaviria J., *Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxapatita por la ruta de precipitación*, DYNA **73** (148), 9-15 (2006).
- [236] Thamaraiselvi T. V., Prabakaran K., Rajeswari S., *Synthesis of hydroxyapatite that mimic bone minerology*, Trends Biomater. Artif. Organs **19** (2), 81-3 (2006).
- [237] Matías J. C., Peón E., *Preparación y caracterización de recubrimientos bioactivos sobre la superaleación MA-956*, Trabajo de diploma: Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana-Cuba (2005).
- [238] Benvenuto E., Moro C., Costa T., *Materiais híbridos a base de Silica obtidos pelo metodo Sol-Gel*, Quim. Nova **32** (7), 1926-33 (2009).
- [239] González J., Pérez J., Ruiz F., Martínez J., *Vidrios SiO₂ nanocompuestos preparados por Sol-Gel: Revisión*, Soc. Mex. de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales A.C. **11**, 11-6 (2000).
- [240] Vijayalakshmi U., Rajeswari S., *Preparation and characterization of microcrystalline hydroxyapatite using Sol-Gel method*, Trends Biomater. Artif. Organs **19** (2), 57-62 (2006).
- [241] Brinker C. J., Scherrer G. M., *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Boston, U.S.A.: Academic Press (1990).
- [242] Zelinsky B. J., Uhlmann D. R., *Gel Technology in Ceramics*, Academic Press Inc. (1990).
- [243] Ballare J., *Recubrimientos protectores y bioactivos por sol-gel sobre aleaciones para uso clínico y odontológico*, Tesis de Maestría: Facultad de Ingeniería-Asociación Argentina de Materiales, Universidad Nacional de Mar de Plata (2003).
- [244] Peón A. E., Soares S. M., Rodrigues de A. F., Ágata de S. L., Galván S. J., de Almeida S. G., *Comparative study of hydroxyapatite coatings obtained by*

Sol-Gel and electrophoresis on titanium sheets, *Matéria* (Río de Janeiro) **12 (1)**, 156-63 (**2007**).

[245] Peón A. E., Fernández E. E., García A. M., Galván S. J., Escudero M. L., *Preparación de recubrimientos de hidroxiapatita a partir de precursores de tipo Sol-Gel*, III Congreso Internacional de Biomateriales BIOMAT'03: Centro de Materiales, Universidad de la Habana (**2003**).

[246] Kim H. M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T., *Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment*, *J. Biomed Mater. Res.* **32 (3)**, 409-17 (**1996**).

[247] Gong D., Grimes C. A., Varghese O. K., Hu W., Singh R. S., Chen Z., Dickey E. C., *Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation*, *J. Mater. Res.* **16 (12)**, 3331-34 (**2001**).

[248] Li S., Zhang G., Guo D., Yu L., Zhang W., *Anodization fabrication of highly ordered TiO₂ nanotubes*, *J. Phys. Chem. C* **113**, 12759-65 (**2009**).

Apéndices.

La colaboración intelectual entre dos individuos puede producir una fusión entre ambas esferas de conciencia de un grado tan increíble que lleguen incluso a fundirse dando una unidad empírica.

Erwin Schrödinger (1887-1961).

En esta sección se dan conocer los productos académicos obtenidos en el proceso doctoral.

➤ Trabajos presentados en coloquios y congresos.

1. Soto M., Carrillo M., *Efecto de la modificación superficial de substratos metálicos de Nitinol de uso ortopédico y su impacto en la osteoadhesión*, Coloquio del Instituto de Ingeniería, Mexicali, B. C., México (**Diciembre 2008**).
2. Soto M., Carrillo M., K. Zlatev R., Valdez B., *Síntesis de nano-hidroxiapatita sobre biomateriales de uso ortopédico*, nanoMex'09 Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología, Ensenada B. C., México (**Noviembre 2009**).
3. Soto M., Carrillo M., K. Zlatev R., Valdez B., *Síntesis de nano-hidroxiapatita sobre substratos de Titanio anodizado*, 1er Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Mexicali, B. C., México (**Noviembre 2009**).
4. Soto M., Carrillo M., *Análisis del factor de crecimiento derivado de plaquetas en la osteointegración*, 2do Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Mexicali, B. C., México (**Noviembre 2010**).

5. Soto M., Carrillo M., K. Zlatev R., S. Stoytcheva M., Valdez B., *Anodización potencioestática con pulsos invertibles para formación de nanotubos de TiO₂ auto-organizados*, XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica, México D. F., México (**Mayo 2011**).

➤ **Artículo publicado.**

1. Soto M., Carrillo M., K. Zlatev R., S. Stoytcheva M., Valdez B., *Titanium nanotubes formation by reversible pulses anodization*, ECS Transaction **36 (1)**, 549-556 (**2011**).

Productos académicos

Efecto de la modificación superficial de substratos metálicos de Nitinol de uso ortopédico y su impacto en la osteoadhesión

Mónica Isabel Soto Tapiz* y Mónica Carrillo Beltrán**

Instituto de Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

* Estudiante de Doctorado, Biomateriales

** Directora de tesis

Mexicali, Baja California, México

e-mail: monitita@hotmail.com

monica@iing.mxl.uabc.mx

RESUMEN

El objetivo de los implantes ortopédicos es restaurar la integridad estructural y la funcionalidad de tejidos fuertemente dañados, minimizar las complicaciones debidas a estructura fallida del implante, aflojamiento, etc.; así como mejorar la calidad de vida del paciente. Los implantes metálicos recubiertos con *Hidroxiapatita* (HA) combinan las ventajas de la bioactividad de la hidroxiapatita con las excelentes propiedades mecánicas de los substratos metálicos, los cuales se hacen más atractivos para aplicaciones médicas.

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ha sido ampliamente usada como un sustituto de hueso debido a su biocompatibilidad, ya que sus componentes minerales son similares a los del hueso y dientes del cuerpo humano. Se han desarrollado muchas rutas para sintetizar HA usando métodos de hidrólisis, hidrotermales o de precipitación, caracterizándose este último por su simplicidad, bajo costo y aplicación a nivel industrial.

En esta primera etapa del proyecto, se dan a conocer los resultados obtenidos para la síntesis química de HA por la ruta de la precipitación, haciendo reaccionar soluciones precursoras de calcio (solución de cascarones de huevo de gallina) y fosfato de amonio dibásico, bajo el control de parámetros como pH, orden de adición de los reactivos, temperatura, tiempo de reposo del precipitado y tratamiento térmico.

Palabras clave: Hidroxiapatita, Síntesis, Precipitación, Biocompatibilidad.

I. INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX aparecieron los *Materiales Funcionales*, es decir; aquellos materiales que cumplen con una función específica en los sistemas modernos electrónicos, eléctricos, ópticos, mecánicos, y también en el cuerpo humano. Los *Biomateriales* son por excelencia, materiales funcionales y su principal aplicación, incluyendo las aleaciones metálicas, es reparar o reconstruir las partes del cuerpo humano que han sufrido daño o se han perdido, con lo cual se busca mitigar el sufrimiento, restituir las funciones naturales y prolongar la vida (Valdez Salas et al., 2005).

Los biomateriales cumplen funciones básicas en el cuerpo humano, asegurándose de esta manera la calidad de vida del paciente o de quien haya sufrido un accidente traumático y se sugiera el uso de implantes ortopédicos, reguladores de sistemas cardiovasculares y biosensores. El conocimiento y la aplicación de los biomateriales, involucran un amplio espectro de disciplinas de estudio tales como medicina, biología, química, física, mecánica, metalurgia, ingeniería, informática y computación; así como numerosas áreas de actividad profesional que se llevan a cabo en diversas instituciones públicas o privadas (Valdez Salas et al., 2005).

Los Biomateriales se clasifican según su composición química en metálicos, plásticos, cerámicos y compuestos, según su origen en naturales y sintéticos y según su estructura en sólidos y porosos, así como si puede o no ser implantables. Los biomateriales deben cumplir con tres exigencias elementales: primero, ser biocompatibles, segundo, resistir a la corrosión de los fluidos corporales y tercero, cumplir la función biológica o mecánica planeada. Tres de las aplicaciones principales de los biomateriales son: *implantes ortopédicos* (reparación del sistema óseo), *materiales dentales* y *dispositivos anticonceptivos* (Valdez Salas et al., 2005).

El objetivo de los implantes ortopédicos es restaurar la integridad estructural y la funcionalidad de tejidos fuertemente dañados, minimizar las complicaciones debidas a estructura fallida del implante, aflojamiento, etc.; así como mejorar la calidad de vida del paciente (Guelcher S.A. y Hollinger J.O., 2006). Los implantes metálicos recubiertos con *Hidroxiapatita* (HA) combinan las ventajas de la bioactividad de la hidroxiapatita con las excelentes propiedades mecánicas de los substratos metálicos, los cuales se hacen más atractivos para aplicaciones médicas.

Los recubrimientos de HA sirven también como capa protectora de los substratos metálicos en contra de la corrosión biológica. Sin embargo, la HA pura presenta problemas de estabilidad a corto plazo, tal bioresorción resulta en implantes fallidos e implantes flojos (Wang Y. et al., 2007).

Los materiales bioactivos inducen la misma reacción que el mineral natural del hueso, mientras los bioinertes no provocan tal reacción. Dentro de las cerámicas

bioactivas se encuentran las cerámicas de fosfato de calcio como la hidroxiapatita, el β -fosfato tricálcio y el fosfato bifásico de calcio, las cuales han sido ampliamente utilizadas debido a su composición mineral similar con el hueso, su bioactividad (formación material de hueso tipo apatita sobre su superficie e interfase biomaterial CaP-hueso) y su osteoinductividad (capacidad para proveer la base indicada en la formación de hueso) (Vecchio K.S. et al, 2007).

Tradicionalmente las cerámicas han sido fabricadas por síntesis de polvos de CaP a altas temperaturas, donde las propiedades mecánicas y estructurales son controladas por diversos factores tales como la composición de los polvos cerámicos, la temperatura de síntesis y el tiempo de síntesis (Vecchio K.S. et al, 2007).

Actualmente la HA cuya composición química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, puede fabricarse de forma tal que simule las propiedades del tejido óseo, en cuanto a composición, morfología y propiedades mecánicas. Así mismo pueden prepararse materiales con diferentes porcentos de porosidad, siendo este factor muy importante pues esta estructura porosa facilita el crecimiento del tejido óseo en el interior del material y por tanto es esencial para la estabilización del implante (Ivonnet González et al, 2005).

El hueso está constituido por una matriz orgánica compuesta principalmente por fibras de colágeno, una fase mineral y agua. La fase mineral esta formada principalmente por pequeños cristales de HA y otros fosfatos de calcio. La HA es el miembro mas importante de la fase mineral y pertenece a una familia de minerales denominados *apatitas*. Durante mucho

tiempo las apatitas fueron objeto de estudio para obtenerlas de forma sólida, pero la carencia de métodos había impedido el estudio y desarrollo de potenciales aplicaciones de esta biocerámica (Ivonne González et al, 2005).

A la fecha, los métodos más comunes para obtener la HA por vía sintética son:

- Por hidrólisis.
- Reacciones en estado sólido.
- Reacciones hidrotermales.
- Proceso sol-gel.
- Precipitación.

Los métodos basados en la precipitación de la HA consisten básicamente en mezclar fuentes de iones calcio y fosfato en un medio acuoso conveniente. La fuente de calcio puede suministrarse en forma de soluciones acuosas de CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ o a partir de CaCO_3 o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sólido. Como fuentes de fosfatos pueden emplearse soluciones acuosas de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 o NaH_2PO_4 (Martins Seckler M. et al.).

Según reportes de S. Sasikumar y R. Vijayaraghavan (2006), el cascarón de huevo de gallina contribuye un 11% al peso total del huevo cuyo principal constituyente es el carbonato de calcio CaCO_3 en un 90% del peso total. Actualmente la India es el cuarto productor a nivel mundial de huevo de gallina con una producción anual de 1,732,500 toneladas, si de esta cantidad se considera solo el 11% correspondiente al cascarón, se generan alrededor de 190,000 toneladas de producto de desecho por año.

Debido al enorme impacto ambiental que representan estos insumos, muchos

investigadores se han dado a la tarea de utilizar esta materia prima como fuente rica en calcio para la síntesis de productos cálcicos como la HA, sugiriendo en cada caso, métodos viables y económicos para la obtención de dicho material.

El procedimiento aquí descrito para la obtención de la HA es una modificación de la técnica originalmente descrita por S. Sasikumar y R. Vijayaraghavan (2006), basada en la formación de un gel a bajas temperaturas tratado posteriormente a altas temperaturas para la obtención de cristales definidos de HA de orden nanométrico. En ella se permite la reacción de todas y cada una de las especies involucradas a fin de obtener un precipitado con un cierto orden estructural, en el cual las especies de importancia, tanto calcio, fosfatos como hidróxidos estén presentes y se eviten de la misma manera las fases cristalinas indeseables de otros productos de fosfato como el ACP. Cabe señalar que inicialmente la técnica empleada fue exactamente la descrita por estos autores pero en base a los resultados obtenidos y a la revisión bibliográfica hecha, la modificación propuesta se sustenta en 2 diferentes rutas de síntesis analizadas. La primera de ellas propuesta por Pedro Melini Batres (2007), en la cual reporta el uso de reactivos de calcio y fosfato para la síntesis de HA por la vía de precipitación, monitoreando parámetros como el pH inicial de las soluciones así como el de la mezcla en reacción, tiempos y temperaturas de agitación, orden de adición de los reactivos, esto con la finalidad de evitar los sólidos no solubles y finalmente el tiempo de envejecimiento o reposo del precipitado. La segunda técnica (García et al., 2006), fundamentada básicamente en la de Melini, considera un paso adicional al final del proceso de síntesis y obtención del polvo

precipitado. Este paso consiste en calcinar a temperaturas superiores a los 800°C el polvo obtenido previamente y de esa manera mejorar la estructura cristalina de la HA.

En esta primera etapa del proyecto, se dan a conocer los resultados obtenidos para la síntesis química de HA por la ruta de la precipitación, haciendo reaccionar soluciones precursoras de calcio CaNO_3 (solución de cascarones de huevo de gallina CaCO_3 y ácido nítrico HNO_3), hidróxido de amonio NH_4OH y fosfato de amonio dibásico, bajo el control de parámetros como pH de las soluciones reaccionantes, así como el de la mezcla, orden de adición de los reactivos (en función de la solubilidad de los iones presentes), temperaturas y tiempos de agitación y de reposo del precipitado.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 Procedimiento.

1).-Se colocaron 24 cascarones de huevo en un vaso de precipitado de 2L, los cuales se hirvieron durante 30 minutos. Posteriormente se retiraron del fuego y se colocaron en una estufa por 12 horas a una temperatura de 60°C para secarlos. Finalmente se colocaron en un desecador durante 30 minutos para extraer toda la humedad restante. Los cascarones ya secos, se trituraron en un procesador de alimentos convencional. El peso neto obtenido del polvo pulverizado fue de 83.1 gramos. Se colectó un espectro infrarrojo del material inicial para verificar que la síntesis se realice satisfactoriamente.

2).-La preparación de las soluciones reaccionantes se llevó a cabo de la siguiente manera: Primero se prepararon

50ml de una solución de hidróxido de amonio y agua en una relación 1:1. Posteriormente se prepararon 100ml de una solución de ácido cítrico 1M. Para esta solución se pesaron 9.3 gramos del sólido, los cuales posteriormente se diluyeron en 10ml de agua y finalmente se aforó en un matraz volumétrico de 100ml de capacidad. De igual manera se preparó una solución de fosfato dibásico de amonio 1M, primeramente pesando 13.2 gramos del sólido, posteriormente diluyendo en 40ml de agua y finalmente aforando a 100ml en un matraz volumétrico de dicha capacidad. Adicionalmente y para tener bajo control el mecanismo de reacción se midió el pH de las soluciones antes preparadas. El resultado de las mediciones fue: 1.94 y 6.26 para el ácido cítrico y el fosfato respectivamente.

3).-Se tomaron dos muestras de 5gr cada una para la realización de los procesos de síntesis definidos como ruta 1 y ruta 2. Como se muestra en la figura 1, la ruta 2 representa el proceso de síntesis sin la adición de la solución de ácido cítrico y fue precisamente con esta muestra con la que se trabajó inicialmente.

4).-Para dar seguimiento al proceso, se disolvió el polvo con ácido nítrico concentrado, según el paso 2 del proceso inicial (vea Figura 1). Se colocaron los 5gr del polvo en un vaso de precipitado de 250ml de capacidad y de manera gradual se adicionaron 17ml de HNO_3 sobre el polvo, observándose la formación de una masa esponjosa como consecuencia de la formación de CO_2 en la mezcla. Habiendo adicionado por completo el ácido y habiendo dejado estabilizar la reacción, se obtuvo una solución granular de color amarillo oscuro que posteriormente se filtró en repetidas ocasiones con papel filtro del número uno. Finalmente se obtuvieron dos

soluciones de apariencia transparente de color amarillo claro y sin residuos granulares cuyos valores de pH fueron: $R_1=0.65$ y $R_2=0.57$ a temperatura ambiente.

5).-Las soluciones preparadas de nitrato de calcio se aforaron a 100ml y 250ml para las muestras R_1 y R_2 respectivamente.

6).-Se tomó una muestra de 0.5ml para cada solución con la finalidad de medir el contenido de calcio volumétricamente utilizando EDTA, según se refiere en el paso #5 del proceso de síntesis (vea Figura 1). La concentración de Ca obtenida fue de 940mg/L.

7).-Las soluciones de calcio y de fosfato se alcalinizaron con hidróxido de amonio hasta un valor de pH=10.

8).-Como inicio del proceso de precipitación, se colocaron 50ml de solución de fosfato en un vaso de precipitado de 500ml, el cual seguidamente se colocó en una parrilla de agitación a velocidad mínima. Posteriormente y bajo agitación vigorosa, se añadió a razón de 1ml/min. la solución de calcio. El tiempo de agitación predestinado para la formación del precipitado color blanco fue de 2.5 horas, al término del cual seguirían 5 días de reposo a fin de permitir la completa reacción de las especies en solución y precursoras de la hidroxiapatita.

9).-Habiendo transcurrido un tiempo de reposo de 88.5 horas, el precipitado se filtró a vacío y se hizo el enjuague correspondiente.

10).-La muestra recolecta en el filtro se secó en una estufa a 150°C durante un lapso de tiempo de 4.2 horas. El material sólido obtenido se pesó en una microbalanza analítica, arrojando un valor de 3.4952 gramos. La apariencia del sólido eran pequeñas hojuelas de color blanco. Esta

muestra se almacenó a parte para su posterior análisis.

11).-Se tomó una hojuela, se pulverizó utilizando un mortero y los polvos se colocaron en el infrarrojo para la obtención de su espectro.

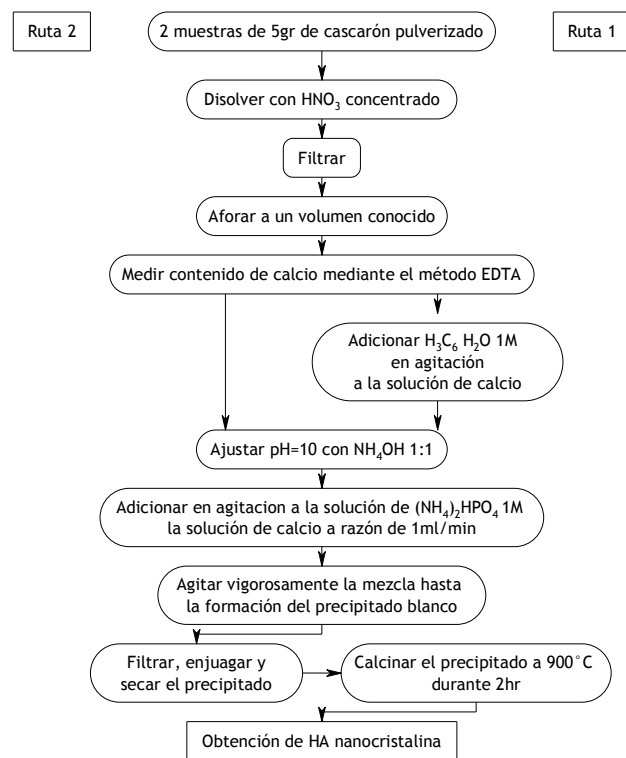


Figura 1. Diagrama de flujo de la síntesis.

III. RESULTADOS

La figura 2 muestra las hojuelas de sólido obtenido por la ruta de precipitación. Obsérvese el color blanco característico antes mencionado.



Figura 2. Hojuelas del sólido sintetizado.

Las figuras 3, 4 y 5 muestran los espectros infrarrojos de la muestra de cascarón de huevo molido inicial, esto es sin tratamiento químico y la muestra obtenida vía la ruta de precipitación, así como su comparativo.

La figura 3 muestra una intensa banda en 1416.08cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo, mientras que la banda media $\approx 870\text{ cm}^{-1}$ es asignada a carbonato. Al realizar un comparativo con las librerías, se corrobora que el espectro obtenido corresponde carbonato de calcio (CaCO_3), componente principal del cascarón.

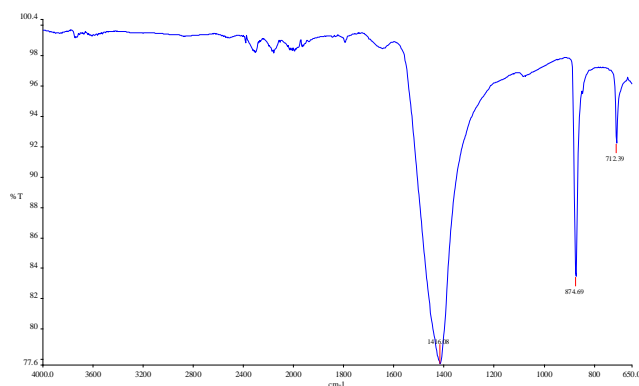


Figura 3. Espectro IR de la muestra inicial de cascarón de huevo molido.

La figura 4 corresponde a las hojuelas obtenidas como resultado del proceso de síntesis, las cuales fueron pulverizadas para la obtención del espectro. Las vibraciones en la región $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ se asignan principalmente al estrechamiento simétrico y antisimétrico entre átomos P-O de grupos fosfato, por lo que la intensa banda que aparece en 1017 cm^{-1} se asigna a dicho grupo.

En la figura 5 se muestra el comparativo de ambos espectros en el cual se aprecia la incorporación satisfactoria del grupo fosfato en esta estructura.

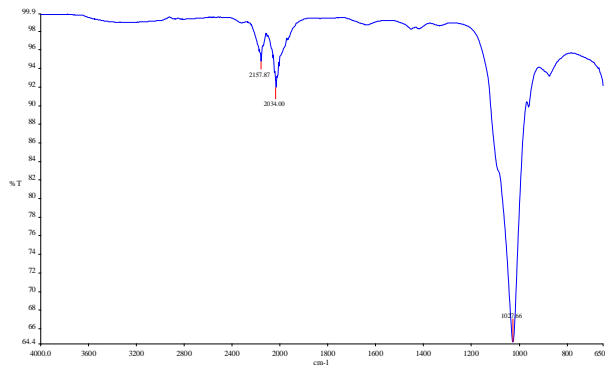


Figura 4. Espectro IR de la muestra de HA sintetizada.

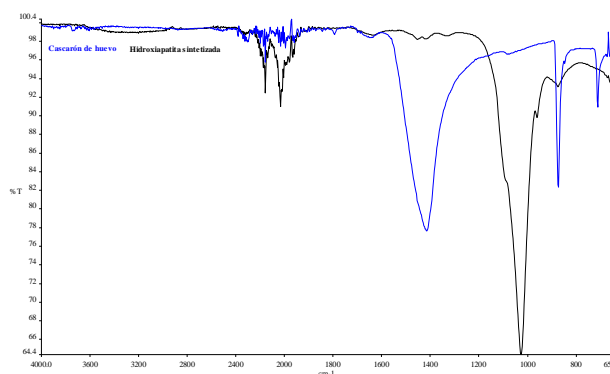


Figura 5. Espectro IR comparativo de las muestras inicial y HA sintetizada.

IV. DISCUSION

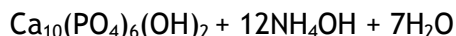
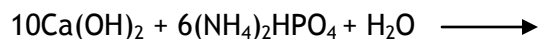
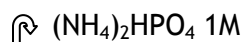
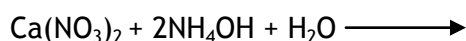
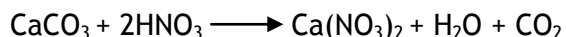
El análisis hecho para las muestras sugiere que la ruta de precipitación considerada arroja resultados satisfactorios para la síntesis de hidroxiapatita. Cabe señalar que estos resultados corresponden solamente a una de las dos rutas propuestas inicialmente; el sólido obtenido será sometido a un proceso de redisolución, recristalización y calcinación, a fin de verificar si existe una mejoría en la cristalinidad, la cual se verificará mediante espectroscopia de Rayos-X de electrones dispersados (EDX).

Con la finalidad de verificar el efecto del ácido cítrico en el producto obtenido, se realizará también el proceso de síntesis

especificado como ruta 1, en la cual se adiciona ácido cítrico a la solución de nitrato de calcio.

V. CONCLUSIONES

- La síntesis de hidroxiapatita por la vía de precipitación es un método sencillo de implementar, ya que permite trabajar con pequeñas cantidades.
- El utilizar cascarones de huevo como fuente de calcio permite la utilización de esos desechos en la síntesis de un cerámico biocompatible para aplicaciones en implantes médicos.
- Los resultados obtenidos con el análisis espectral, indican la adición satisfactoria del grupo fosfato en las hojuelas obtenidas.
- La ruta de síntesis planteada nos permite seguir la estequiometría siguiente:



VI. AGRADECIMIENTOS

- A mi asesor de tesis la Dra. Mónica Carrillo Beltrán por su apoyo en la realización de esta primera etapa en mi formación dentro del área químico-biológica y por la impartición del

conocimiento necesario para mi aprendizaje.

- Al director del instituto el Dr. Benjamín Valdez Salas por su apoyo y valiosa aportación de ideas en la fase experimental.
- A mis compañeros de semestre por las enriquecedoras charlas sostenidas en clase y laboratorio.

VII. REFERENCIAS

Ivonne G.I., Cordivi F.C., Ferro del Pino E., García M.J.A. y Fuentes E.G. Perfeccionamiento de la tecnología para la producción de hidroxiapatita a escala de banco - Trabajo de diplomado para optar por el título de ingeniero químico 2005: 1-58.

García C., Paucar C. y Gaviria J. Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxiapatita por la ruta e precipitación - Dyna 2006: 148 9-15.

Guelcher S.A. y Hollinger J.O. An introduction to biomaterials - New York: CRC Press 2006.

Martins S.M, García C.R., Silas D., Giuliatti M. y Rodríguez R.C. Técnicas de obtención de hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio - Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Divisão de Química, Predio 36: 1-8.

Melini Batres P.P. Síntesis de hidroxiapatita para la fabricación de implantes de hueso - Boletín electrónico 2007: No.06 1-7.

Valdez Salas B., Schorr W.M., Valdez Salas E. y Carrillo B.M. Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano - Ciencia y desarrollo en Internet 2005: 1-10.

Vecchio K.S., Zhang X., Massie J.B., Wang M. y Kim C.W. Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants - Acta Biomaterialia 2007: 3 910-918.

Wang Y., Zhang S., Zeng X., Ma^c L.L., Weng W., Yan W. and Qian M. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings - Acta Biomaterialia 2007: 3 191-197.

Síntesis de nano-hidroxiapatita sobre biomateriales de uso ortopédico

Mónica Isabel Soto Tapiz^{1,*}, Mónica Carrillo Beltrán¹, Benjamín Valdez Salas², Roumen Zlatev³.

¹Laboratorio de Procesos Biotecnológicos y Biopelículas, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California-Campus Mexicali.

²Laboratorio de Corrosión y Materiales, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California-Campus Mexicali.

³Laboratorio de Electroquímica Aplicada, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California-Campus Mexicali.

* monitita@hotmail.com (estudiante de doctorado del Programa MYDCI).

Palabras clave: Hidroxiapatita, Síntesis, Precipitación, Anodización, Nanotubos, Biocompatibilidad.

Resumen. El objetivo de los implantes ortopédicos es restaurar la integridad estructural y la funcionalidad de tejidos fuertemente dañados, minimizar las complicaciones debidas a estructura fallida del implante, aflojamiento, etc.; así como mejorar la calidad de vida del paciente. Los implantes metálicos recubiertos con *Hidroxiapatita* (HA) combinan las ventajas de la bioactividad de la hidroxiapatita con las excelentes propiedades mecánicas de los substratos metálicos, los cuales se hacen más atractivos para aplicaciones médicas.

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$) ha sido ampliamente usada como un sustituto de hueso debido a su biocompatibilidad, ya que sus componentes minerales son similares a los del hueso y dientes del cuerpo humano. Se han desarrollado varias rutas para sintetizar HA usando métodos de hidrólisis, hidrotermales o de precipitación, caracterizándose este último por su simplicidad, bajo costo y aplicación a nivel industrial. Los recubrimientos de HA sirven también como capa protectora de los substratos metálicos en contra de la corrosión biológica. Sin embargo, la HA pura presenta problemas de estabilidad a corto plazo, tal bioresorción resulta en implantes fallidos e implantes flojos [1].

A la fecha, los métodos más comunes para obtener la HA por vía sintética son: hidrólisis, reacciones en estado sólido, reacciones hidrotermales, proceso sol-gel y precipitación. Los métodos basados en la precipitación de la HA consisten básicamente en mezclar fuentes de iones calcio y fosfato en un medio acuoso conveniente. La fuente de calcio puede suministrarse en forma de soluciones acuosas de CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$,

CaCO₃ o Ca(CH₃COO)₂ o a partir de CaCO₃ o CaSO₄*2H₂O sólido. Como fuentes de fosfatos pueden emplearse soluciones acuosas de (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ o NaH₂PO₄ [2].

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos para la síntesis de nano-hidroxiapatita (nano-HA) por la vía de precipitación, utilizando una solución fisiológica sintética como fuente de calcio y fósforo. La nano-HA fue depositada sobre nanotubos de TiO₂ previamente obtenidos por anodizado de placas de titanio. La caracterización de los nanotubos y de la nano-HA se realizó mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), microscopia de fuerza atómica (AFM), microscopia de barrido electrónico (SEM), así como cuantificación de las especies iónicas remanentes en la solución fisiológica. La biocompatibilidad de este cerámico, en combinación con factores de crecimiento plaquetario, será evaluada mediante el monitoreo de líneas celulares óseas.

Agradecimientos. Dra. Mónica Carrillo Beltrán (directora de tesis), Dr. Benjamín Valdez Salas (co-autor) y Dr. Roumen Zlatev (co-autor), Instituto de Ingeniería-UABC.

Referencias.

[1] Wang Y., Zhang S., Zeng X., Ma^c L.L., Weng W., Yan W. and Qian M., *Acta Biomaterialia*. **3**, 191-197 (2007).

[2] Martins S.M, García C.R., Silas D., Giulietti M. y Rodríguez R.C., Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Divisão de Química, Predio **36**, 1-8 (2008).

Síntesis de nano-hidroxiapatita sobre sustratos de Titanio anodizado

Mónica Isabel Soto Tapiz

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos y Biopelículas, Instituto de Ingeniería,
Universidad Autónoma de Baja California-Campus Mexicali

moni_tita@hotmail.com

Mónica Carrillo Beltrán¹, Benjamín Valdez Salas², Roumen Zlatev³

¹Laboratorio de Procesos Biotecnológicos y Biopelículas, ²Laboratorio de Corrosión y Materiales, ³Laboratorio de Electroquímica Aplicada, Instituto de Ingeniería,

Universidad Autónoma de Baja California-Campus Mexicali

{monica, benjamin, roumen}@iing.mxl.uabc.mx

Abstract

The present work shows the results obtained for the synthesis of nano-hydroxyapatite (nano-HA) through a precipitation process, utilizing a synthetic body fluid (SBF) as source of calcium and phosphorus. The nano-HA was placed on nanotubes of TiO₂ previously obtained by anodization of plates of titanium. The characterization of the nanotubes and of the nano-HA was carried out by means of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) tests and atomic force microscopy (AFM). The biocompatibility of this ceramic in combination with platelets derivatives growth factor (PDGF) will be evaluated by monitoring of bone cell lines.

Key words: hydroxyapatite, anodization, functionalization, TiO₂-nanotubes, biocompatibility.

Resumen

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos para la síntesis de nano-hidroxiapatita (nano-HA) por la vía de precipitación, utilizando una solución fisiológica sintética (SFS) como fuente de calcio y fósforo. La nano-HA fue depositada sobre nanotubos de TiO₂ previamente obtenidos por anodizado de placas de titanio. La caracterización de los nanotubos y de la nano-HA se realizó mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y microscopía de fuerza atómica (AFM). La biocompatibilidad de este cerámico en combinación con factores de crecimiento plaquetarios (PDGF), será evaluada mediante el monitoreo de líneas celulares óseas.

Palabras clave: hidroxiapatita, anodización, funcionalización, TiO₂-nanotubos, biocompatibilidad.

1. Introducción

Desde los años ochenta, las aleaciones de titanio han sido ampliamente utilizadas en la manufactura de aparatos de uso biomédico (implantes ortopédicos y dentales) debido a

sus características de biocompatibilidad, resistencia a la corrosión mediante la formación de una película de óxido protectora, ligereza, maleabilidad mecánica, comportamiento osteointegrativo, entre otras. La película de óxido formada sobre la superficie del metal, principalmente TiO_2 , juega un papel muy importante por su alta estabilidad termodinámica y efecto pasivante, al actuar como un inhibidor de la liberación de iones. Por otra parte, la generación de una superficie con características bioactivas, permite el pronto crecimiento del hueso hacia y desde esta superficie, posibilitando al recubrimiento a cumplir con la tarea de regeneración ósea deseada, al mismo tiempo que al implante, a cumplir la función mecánica planificada. Dentro de las metodologías utilizadas para la generación de esta película sobre el sustrato metálico, se encuentran procesos de sand blasting, oxidación electroquímica, recubrimientos de fosfatos y tratamientos químicos [1], [2]. Sin embargo, atendiendo a las necesidades tecnológicas de nuestros días, compuestos estructurados a nano-escala han sido ampliamente estudiados debido a su aplicación en áreas como óptica y electrónica, en donde las películas delgadas de TiO_2 exhiben propiedades foto-catalíticas importantes las cuales ofrecen potenciales aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, nanotubos de óxido de titanio pueden ser preparados por varias técnicas tales como método sol-gel, deposición electroforética y anodizado, cuyos parámetros importantes, son la adhesión e integridad de esta capa.

Según reportes de Kim y sus colaboradores [3], la formación de HA sobre titanio anodizado, puede ser acelerada utilizando una solución de NaOH (funcionalización vía tratamiento químico) seguida de un tratamiento térmico a altas temperatura (cristalización del óxido), previo a la inmersión del sustrato en solución fisiológica sintética. Es decir, la formación de una capa de titanato de sodio sobre el óxido metálico, la cual posibilita la deposición de iones calcio y fosfatos provenientes de la solución fisiológica sintética (SFS) y de esta manera promover una mejor adhesión celular como prerequisite importante en las subsecuentes funciones celulares y por ende a la formación del hueso compacto.

En esta segunda etapa del proyecto, se muestra los resultados obtenidos para la síntesis de nano-HA por la vía de precipitación, utilizando SFS como fuente de calcio y fósforo. La nano-HA fue depositada sobre nanotubos de TiO_2 previamente obtenidos por anodizado electroquímico de placas de titanio (aleaciones grado 2 y 5

respectivamente). La caracterización de los nanotubos y de la nano-HA se realizó mediante espectroscopía de impedancia electroquímica, microscopia de fuerza atómica (AFM) y microscopia de barrido electrónico (SEM). La biocompatibilidad de este cerámico en combinación con factores de crecimiento plaquetarios, será evaluada mediante el monitoreo de líneas celulares óseas.

2. Materiales y Métodos

En esta sección se presenta el procedimiento seguido para la preparación de las soluciones utilizadas en cada una de las fases del experimento, el manejo de las muestras utilizadas, así como el método experimental para la modificación superficial del sustrato metálico. Cabe señalar que la técnica aquí descrita para dicha modificación, fue reportada originalmente por Gong y sus colaboradores [4], sin embargo la aplicación de ésta metodología para la evaluación del crecimiento de HA en los intersticios del cristal funcionalizado, fue reportada por S-H Oh y sus colaboradores [1] y de la cual en combinación con otros protocolos reportados [5], partimos para el crecimiento de estos óxidos metálicos.

2.1. Preparación de las soluciones

Se prepararon 4 soluciones de interés, denotadas como solución de limpieza (50ml a 5M de HNO₃ con 10 gotas de HF), solución de anodizado (100ml al 0.5%w de HF), solución de tratamiento químico (50ml a 5M de NaOH) y solución fisiológica sintética (500ml en agua desionizada, ajustada a un pH de 7.4 utilizando 1ml de HCl concentrado). La tabla 1 muestra las concentraciones iónicas utilizadas para la preparación de la solución SBF [6].

Tabla 1. Concentración iónica y masa pesada para la preparación de solución SBF.

Ión	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺²	HCO ₃ ⁻¹	SO ₄ ⁻²	Mg ⁺²	Cl ⁻¹	HPO ₄ ⁻²
Concentración (mM/dm ³)	142	5.0	2.5	4.20	0.50	1.5	147.8	1.0
Masa pesada (g)	NaCl, 4.149	KCl, 0.186	CaCl ₂ , 0.138	NaHCO ₃ , 0.176	Na ₂ SO ₄ , 0.035	MgCl ₂ *6H ₂ O, 0.152	---	K ₂ HPO ₄ , 0.087

2.2. Preparación de las placas de titanio

Inicialmente, se cortaron las piezas de titanio (aleaciones: Ti grado 2 y Ti grado 5 (Ti6Al4V), ver tabla 2) en placas de 1cm² de área. Posteriormente, se soldó un alambre de cobre en un costado de las placas, esto con la finalidad de crear el electrodo de

trabajo para el proceso de anodizado y se cubrió el extremo soldado con epoxi para evitar el contacto del alambre con la solución electrolítica y de esta manera asegurarnos de que dicho metal no intervenga en la reacción electroquímica. Las piezas se pulieron mecánicamente con papel lija (SiC) de grados 280, 320, 400, 600 y 1000 respectivamente. Finalmente, previo al proceso de anodizado, la muestra de interés fue sumergida en la solución de limpieza para remover la capa de óxido formada debido al contacto del electrodo con el oxígeno atmosférico.

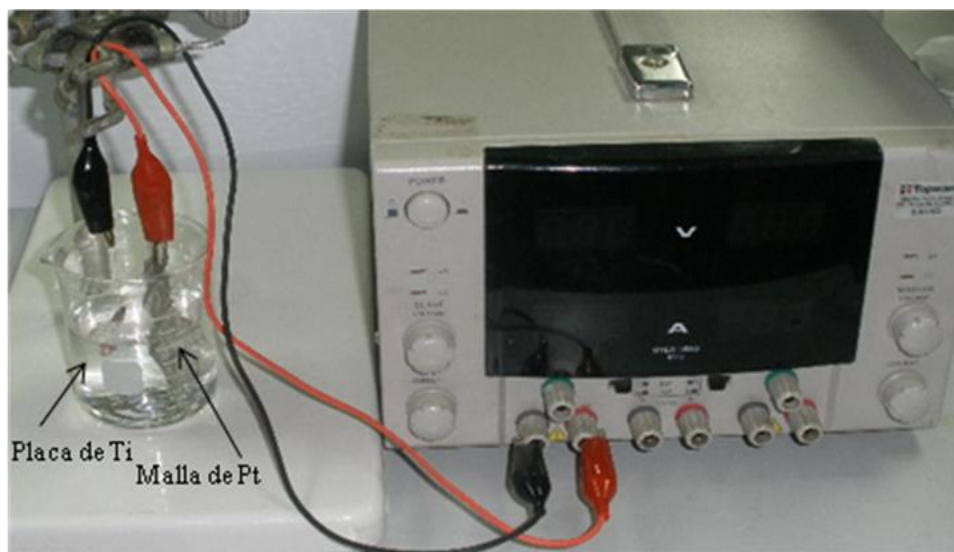
Tabla 2. Propiedades físicas y mecánicas del titanio.

Aleación	Densidad (gr/cm ³)	Resistividad eléctrica (μS/cm)	Conductividad térmica (W/m ^o K)	Tensión de ruptura (MPa)	Límite elástico (MPa)	Elongación (%)
Ti grado 1-4	4.51	56 a 21.5°C	21.9	240-550	170-485	24-15
Ti grado 5, (Ti-6Al-4V)	4.42	171 a 21.5°C	7.2	860	795	10

2.3. Anodizado electroquímico

El sistema de trabajo consistió de una celda electroquímica con un electrodo de platino como cátodo, el electrodo de titanio como ánodo y la solución de HF previamente preparada como medio oxidante. La capa de óxido fue crecida mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre electrodos igual a 20 voltios con una fuente de poder *Topward 6303D, dual-tracking DC power supply*, durante 30 minutos. La figura 1 muestra el sistema utilizado para dicho proceso.

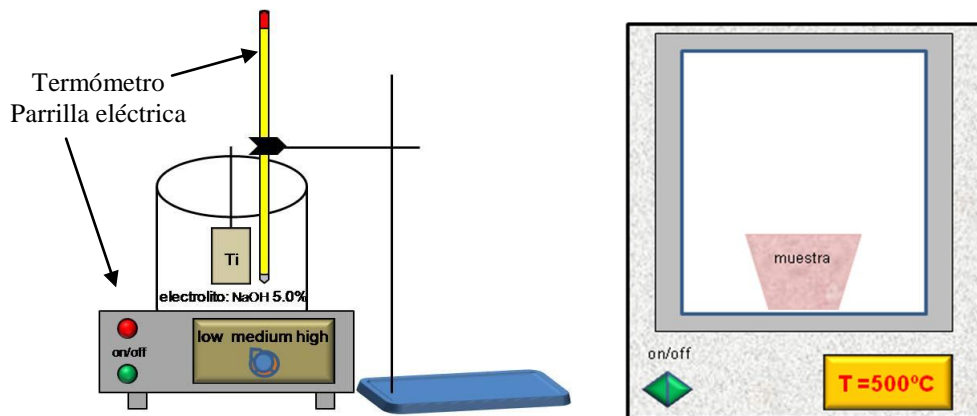
Figura 1. Celda electroquímica.



2.4. Tratamientos químico y térmico e inmersión en SBF

Después que la placa ha sido anodizada y con la finalidad de funcionalizar el sustrato, es decir de proporcionarle esa característica bioactiva, las muestras fueron colocadas en la solución de NaOH durante 1 hora a 60°C de temperatura. Es importante señalar que justo antes de terminar el proceso de anodizado, la solución de tratamiento fue colocada en un parrilla eléctrica para que alcanzara la temperatura indicada y sumergir el sustrato en la solución con las condiciones de trabajo requeridas, (ver figura 2). Por otro lado y con la finalidad de inducir la formación de HA cristalina sobre el sustrato anodizado al ser sumergido en SBF, la muestra fue expuesta a 500°C, en un horno-mufla durante una hora.

Figura 2. Montaje experimental, izquierda: tratamiento químico y derecha: tratamiento térmico.



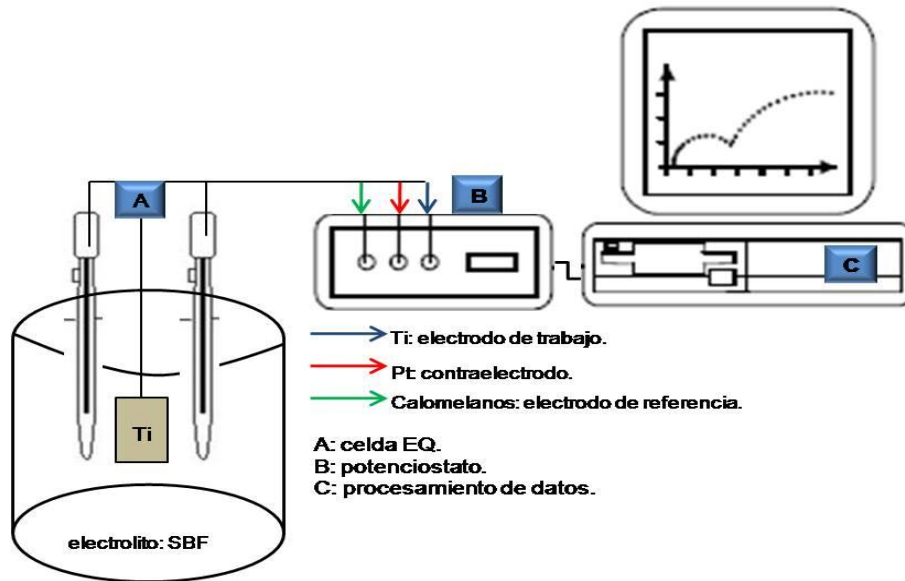
Para evaluar el crecimiento de hueso sobre la superficie bioactiva en términos de la formación de HA, las muestras tratadas térmicamente fueron sumergidas en SFS a diferentes periodos de tiempos (1, 3 y 5 días). Posteriormente, para las pruebas de caracterización, las muestras fueron retiradas, enjuagadas con agua desionizada y secadas a temperatura ambiente.

2.5. Caracterización superficial

La caracterización de la superficie tanto desnuda como modificada se realizó mediante microscopia de fuerza atómica en un equipo *Q-scope 250*. Para caracterizar la degradación que sufre el recubrimiento de HA depositado sobre la superficie del metal anodizado sometidas a la acción corrosiva de la solución fisiológica sintética, se corrieron curvas de impedancia electroquímica, utilizando una celda de tres electrodos conectados a un potencióstato *Gamry Instrument, Inc*. El espectro se corrió a un rango de frecuencias entre 0.001 y 100000Hz y un potencial de 10mV. En este caso se empleó como electrodo de trabajo la muestra electrodepositada, como contraelectrodo un

electrodo de platino y finalmente como electrodo de referencia un electrodo de calomelanos saturado, (ver figura 3).

Figura 3. Corrida de impedancia electroquímica.



3. Discusión de Resultados y Conclusiones

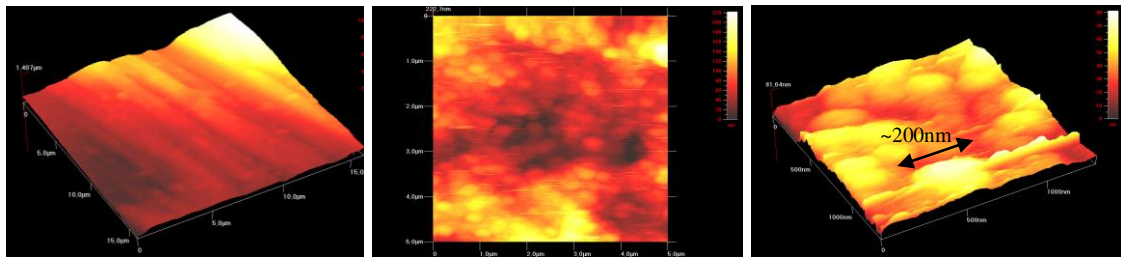
La figura 4 muestra los sustratos utilizados en los experimentos. Inicialmente se tiene el sustrato desnudo sin modificación y puede observarse que conforme transcurren las fases de tratamiento, existe un color característico como consecuencia de la presencia de una capa superficial con diferentes espesores.

Figura 4. Izquierda: blancos Ti grado 2 y 5, derecha: a) anodizado sin NaOH, b) anodizado con NaOH y c) anodizado con NaOH y tratamiento térmico.



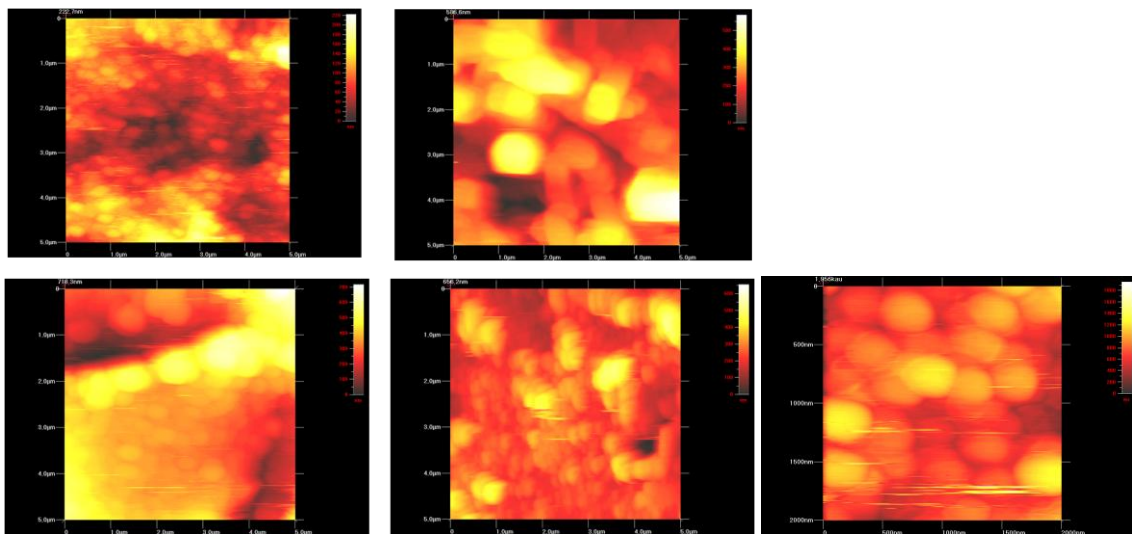
La figura 5 muestra las imágenes obtenidas del análisis de fuerza atómica para las muestras tratadas en la primera fase del experimento. Dichas imágenes revelan un cambio en la composición de la superficie como consecuencia del crecimiento anódico de clusters de TiO_2 , formados por estructuras tubulares, presumidas en un principio por ser nanotubos. Puede observarse que si bien, estos cúmulos son polidispersos, existe un ordenamiento como consecuencia del tratamiento térmico y presentan un diámetro regular entre 200 y 300nm aproximadamente.

Figura 5. Análisis AFM: a) blanco, b) anodizado y c) anodizado, tratamiento químico y térmico.



La figura 6 muestra los comparativos para las muestras después del tratamiento a cuatro fases, de decir, crecimiento anódico, funcionalización, sinterización e inmersión en SFS durante un periodo de tiempo de 24 horas. Las imágenes de la izquierda corresponden a un crecimiento homogéneo alrededor de las $25\mu\text{m}^2$ y en la de la derecha nuevamente puede apreciarse el cambio en la morfología de los cúmulos, revelando el tamaño homogéneo presente en ellos y que corrobora el ordenamiento de dichas estructuras de orden nanométrico.

Figura 6. Análisis AFM (secuencia de tratamiento): anodizado, funcionalizado, tratamiento térmico e inmersión en SBF.

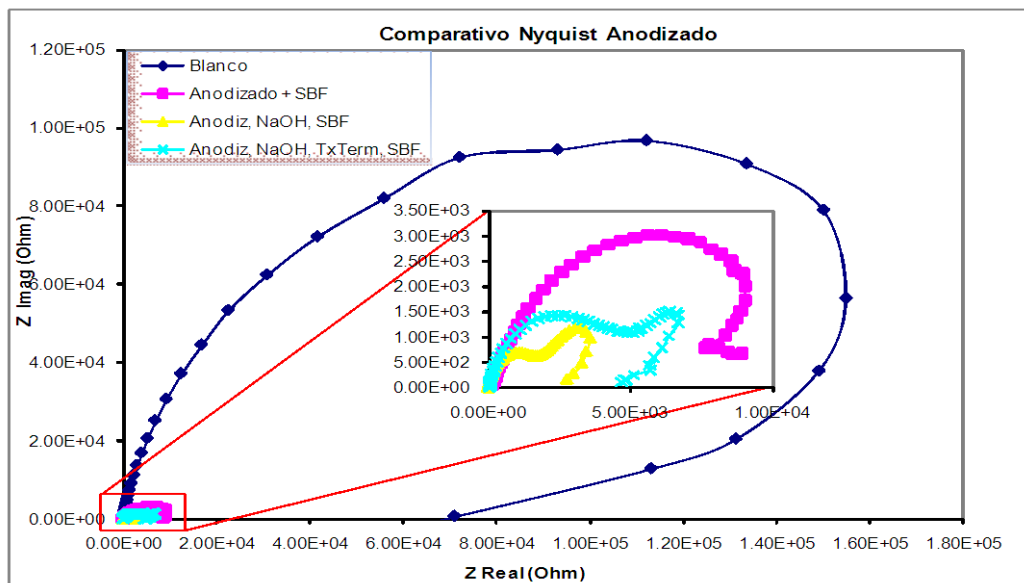


La figura 7 muestra los resultados obtenidos mediante la técnica de EIS y donde se puede apreciar el comportamiento de la película de óxido crecida sobre los sustratos metálicos. Las curvas de Nyquist para cada uno de los casos de tratamiento descritos anteriormente indican un comportamiento estable en la película de TiO_2 , la cual no permite procesos de difusión con componentes de la solución y del sustrato.

Al mismo tiempo puede apreciarse que para el régimen de bajas frecuencias, existen una serie de puntos aleatorios descritos por un comportamiento inductivo del

sistema (coincidentes con resultados de otros autores, [7]) que pueden ser atribuidos a procesos de absorción en la interface recubrimiento/electrolito y que pudieran revelar en su análisis sobre las características osteointegrativas y de biocompatibilidad del sustrato recubierto al estar en contacto tanto con la solución fisiológica como con las proteínas osteogénicas.

Figura 7. Curva de impedancia.



Finalmente y en virtud de los resultados obtenidos, se concluye que se logró obtener una película de óxido de titanio conformada por estructuras tubulares de dimensiones nanométricas. También se observó un reordenamiento de dicha estructura por efecto del tratamiento térmico, así como también, la formación de depósitos de hidroxiapatita sobre dicho sustrato metálico. Los ensayos de EIS indican un comportamiento estable en la película de TiO_2 , la cual no permite procesos de difusión con componentes de la solución y del sustrato.

Agradecimientos

A los doctores Mónica Carrillo Beltrán (directora de tesis), Benjamín Valdez Salas (co-autor) y Roumen Zlatev (co-autor), Instituto de Ingeniería, UABC-Campus Mexicali.

Referencias

[1] Oh, S-H., R. Finñones, R., Daraio, C., Chen, L-H., Jin, S., “Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes”, *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4938-4943, 2006.

- [2] Andrade R., M. J., Estupiñan, H. A., Peña B., D. Y., Vásquez Q., C., “Comportamiento electroquímico de aleación de Ti6Al4V anodizada en solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ”, *Scientia et Technica Año XIII*, vol. 36, pp. 215-220, 2007.
- [3] Kim, H. M., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T. “Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment”, *J. Biomed Mater Res*, vol. 32, nº 3, pp. 409-417, 1996.
- [4] Gong, D., Grimes, C. A., Varghese, O. K., Hu, W., Singh, R. S., Chen, Z., Dickey, E. C., “Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation”, *J. Mater. Res.*, vol. 16, nº 12, pp. 3331-3334, 2001.
- [5] Li, S., Zhang, G., Guo, D., Yu, L., Zhang, W., “Anodization fabrication of highly ordered TiO_2 nanotubes”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, pp. 12759-12765, 2009.
- [6] Cortés, D. A., Medina, A., Escobedo, J. C., Escobedo, S., López, M. A., “Uso de sistemas bioactivos en la formación de apatita en la superficie de aleaciones base cobalto”, *Bol. Soc. Esp. Ceram. V.*, vol. 43, nº 5, pp. 863-868, 2004.
- [7] García, Y. O., Estupiñan, H. A., Peña B., D. Y., Vásquez Q., C., “Evaluación electroquímica de recubrimientos de fosfatos de calcio sobre Ti6Al4V mediante espectroscopía de impedancia electroquímica”, *Scientia et Technica Año XIII*, vol. 36, pp. 255-260, 2007.

Análisis del factor de crecimiento derivado de plaquetas en la osteointegración

Mónica Isabel Soto Tapiz* (Estudiante), Mónica Carrillo Beltrán (Director de Tesis)
*E-mail: moni_tita@hotmail.com

Abstract

Growth factors (GF) are small protean fragments biologically assets that belong to the group of the cytokines. Although the GF are produced and segregated by all the cells of the organisms in response to a specific stimulus, where they are found in greater proportion is in the platelets, in the macrophage and between plasmatic proteins. When these substances (cytokines), join with the receivers of the cell membrane, the cell itself active or inhibits its functions. This kind of growth factors are located in the interior of the platelets and many types of they exist, but the two ones that represent more interest to us are: PDGF (platelet derived growth factor) and TGF- β 1 (transforming growth factor betha1) and from these two we are going to focus on the first one in order to obtain a platelet rich plasma (PRP) because this concentrated solution contains the growth factors that are needed. Said plasma will be utilized as the developer of the cell regeneration and therefore of the osteointegration of the superficially modified metallic implant upon being located in the place of interest.

Keywords: PDGF, cytokines, PRP, implant, osteointegration.

Resumen

Los factores de crecimiento (FC) son pequeños fragmentos proteicos biológicamente activos que pertenecen al grupo de las citoquinas. Aunque los FC son producidos y segregados por todas las células del organismo como respuesta a un estímulo específico, donde se encuentran en mayor proporción es en las plaquetas, en los macrófagos y entre las proteínas plasmáticas. Cuando estas sustancias (citoquinas) se unen a los receptores de la membrana celular, la célula se activa o inhibe sus funciones. Los factores de crecimiento plaquetario se localizan en el interior de las plaquetas y existen muchos tipos, pero los que más nos interesan son fundamentalmente dos: PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y TGF- β 1 (factor de crecimiento transformador beta uno) y dentro de estos dos nos vamos a centrar en los primeros a fin de obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) que es donde se encuentran los factores de crecimiento plaquetarios requeridos. Dicho plasma será utilizado como promotor de la regeneración celular y por ende de la osteointegración del implante metálico modificado superficialmente al ser localizado en el sitio de interés.

Palabras clave: factores de crecimiento derivado de plaquetas, citoquinas, plasma rico en plaquetas, implante, osteointegración.

1. Introducción

Los factores de crecimiento se definen como mediadores biológicos naturales que regulan la proliferación, diferenciación y quimiotaxis celular, así como la síntesis de la matriz extracelular. Estas propiedades, demostrables *in vitro*, han llevado a proponer que estos factores desempeñan un papel importante en la regeneración de tejidos blandos y duros [1]. Desde hace varios años, los estudios relacionados con dicha regeneración se han dirigido a investigar cuál es el efecto de los factores de crecimiento sobre las células y el rol que cumplen en los mecanismos que gobiernan la curación de heridas así como la formación de tejido nuevo. Estos factores de crecimiento son sintetizados por los megacariocitos (célula gigante multinucleada) y almacenados principalmente en los gránulos alfa de las plaquetas, mismas que están involucradas intrínsecamente en los procesos de hemostasis, inflamatorio y saneamiento de heridas. Las plaquetas viajan a través del torrente sanguíneo durante un periodo de 8 a 10 días acarreando factores de crecimiento, los cuales son liberados a la par con factores de coagulación en áreas específicas de tejido dañado para su posterior reconstitución.

Una vez activadas, las plaquetas secretan un gran número de proteínas tales como fibronectina, fibrina y vitronectina, así como una serie de factores de crecimiento que están involucrados en la regeneración musculoesquelética; dentro de los cuales se puede mencionar: proteínas morfogenéticas de hueso (regeneradoras de tejido óseo), factor de crecimiento derivado de plaquetas (facilita la formación de colágeno tipo I), factor de crecimiento de fibroblastos (inhibe a los osteoclastos), factor de crecimiento transformante- β (induce la formación de tejido conjuntivo), factor de crecimiento similar a la insulina (genera la curación de heridas), factor de crecimiento epitelial (induce la diferenciación celular) y el factor de crecimiento vascular endotelial (propicia la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos)¹.

Se ha descrito que al iniciarse el proceso de cicatrización, cuando se forma el coágulo y las plaquetas se degranulan, éstas y otros factores de crecimiento son liberados, es decir, que entre más plaquetas existan en el sitio de la herida, se liberará un número mayor de estos factores. Debido a esto y aprovechando las vías normales de curación del cuerpo, las investigaciones a favor de la obtención de un concentrado plaquetario han ido incrementándose y modificándose en virtud de perfeccionar la técnica y el uso de dicho complejo en diversas áreas de la medicina (cirugía oral y maxilofacial, ortopedia, otorrinolaringología, cirugía plástica, neurocirugía, periodoncia, oncología, etc.), cuyo único objetivo es mejorar la calidad de vida del paciente e incluso prolongarla. El plasma rico en plaquetas PRP es un concentrado de plaquetas humanas que posee las características de ser autólogo (proviene del paciente), no tóxico, no inmunorreactivo y además contiene una cuenta plaquetaria cinco veces mayor (1,000,000 plaq/ μ L en 5 mL) que la que se encuentra en la sangre normal (> 150,000 plaq/ μ L), posibilitando una cinética de regeneración tisular a un ritmo más acelerado [2].

El desarrollo del PRP parte en los años 80 con el adhesivo de fibrina, el cual aparece en el ámbito de la investigación en respuesta a la necesidad de mejorar los agentes

¹ Bertram et al., Massachusetts General Hospital.

hemostáticos y los adhesivos quirúrgicos, sobre todo en aquellos órganos en los que resulta muy difícil controlar el sangrado como hígado, riñones, cerebro, en tejidos infectados, quemados o soportes de injertos [3]. Al ser secretados por estas células sanguíneas, los factores de crecimiento actúan directamente sobre una célula blanco y tienen tres tipos de acción específica: autocrina (actuar internamente en la misma célula que lo sintetizó), paracrina (actuar en los receptores de otras células adyacentes o distintas) y endocrina (actuar a través de la sangre desde sitios alejados)². Una vez que un factor de crecimiento se une a una célula blanco receptora, ésta induce un sistema intracelular de transducción de señal que alcanza en última instancia el núcleo y produce una respuesta biológica, y activa un sistema de transcripción de señales que viaja al núcleo unido al ADN e induce la expresión de uno o varios genes nuevos que posteriormente cambian las características de la misma célula.

Por ejemplo, para aplicaciones ortopédicas (tratamiento de fracturas y reconstrucción ósea), estudios in vitro han demostrado que los factores de crecimiento derivados de plaquetas estimulan la proliferación de células de hueso trabecular humano y osteoblásticas, así como una rápida maduración y alta densidad de hueso formado en injertos mandibulares cuando el plasma ha sido añadido en tales promotores óseos ó bien en experimentos llevados a cabo con modelos animales, mismo que muestran una pronta recuperación postoperatoria y mejores condiciones de saneamiento del hueso al formarse una capa fuerte de tejido en el fémur de un ejemplar de rata¹.

Debido a lo anterior, en el presente artículo se presentan los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica hecha en relación a la obtención y uso de los PDGF para el sistema de estudio, esto es, implementar estos agregados plaquetarios a las muestras de titanio modificadas superficialmente (anodizado electroquímico) a razón de obtener sobre la superficie de dicho sustrato, una capa de células osteoprogenitoras que nos permitan analizar el efecto en la respuesta celular y por ende la reconstitución del tejido necesario para fijar el implante a la matriz ósea nativa.

2. Material y Métodos

El hueso comprende la mayor proporción de tejido conectivo del cuerpo y contiene las células que construyen y mantienen una matriz extracelular. La matriz está fisiológicamente mineralizada con microcristales de calcio-fosfato que contienen carbonato, se llama hidroxiapatita y es básico. Durante toda la vida la matriz se encuentra en una regeneración constante como consecuencia de un proceso que se conoce como recambio óseo o remodelación (bone turn-over) en respuesta a estímulos mecánicos y al peso o carga, y a las necesidades de calcio y de otros minerales del organismo. El hueso actúa como reservorio de calcio, mediante la remodelación entrega calcio sin perder calcio él mismo [4]. En esta sección, se presentan los materiales y métodos (encontrados en la literatura) requeridos para llevar a cabo in vitro mediante ensayos de laboratorio dicho proceso de regeneración con la implementación en el sistema de estudio inicial del PRP como promotor óseo.

² Mindan, Anatomía Patológica.

2.1. Obtención del plasma rico en plaquetas

El PRP es obtenido de la sangre autógena a través de un proceso que utiliza el principio de la separación celular por centrifugación diferencial, en el cual se extrae sangre del donante, se separan las distintas fases y se obtienen aquellas de mayor interés según el caso. El protocolo seguido en los ensayos de laboratorio para este proceso fue propuesto por el Dr. Anitua [5], [6] y conlleva a los siguientes pasos:

1. Extracción de la sangre del paciente. Se realiza minutos antes de la cirugía tomando en cuenta que la vida media de las plaquetas a temperatura ambiente es de 2hrs y la cantidad extraída dependerá de el defecto a tratar (aprox. 500cm^3 sabiendo que de cada 10cm^3 de sangre se obtiene aprox. 1cm^3 de PRP).
2. La sangre se coloca en tubos estériles. Para evitar la coagulación, los tubos tiene incorporado citrato sódico al 3.8% (en la proporción exacta respecto a la cantidad de sangre que se incorporará), el cual actúa como anticoagulante idóneo por no alterar los receptores de membrana de las plaquetas.
3. Separación celular. Se centrifuga con un equipo digital durante un periodo de tiempo de aproximadamente 8 minutos a 1800rpm, es importante considerar que la velocidad de centrifugado excesiva reduce drásticamente la cantidad de FC existentes. Como resultado de dicha centrifugación se obtendrá una separación en función de la densidad de sus 3 componentes básicos. La fracción 1 es el plasma pobre en plaquetas (fibrina inactiva, PPGF 0.5cm^3), la fracción 2 corresponde al plasma con número de plaquetas similar a la sangre periférica (PGF, 0.5cm^3), la fracción 3 contiene el plasma rico en plaquetas y FC (PRGF, 0.5cm^3) y finalmente un residuo conocido como serie roja.
4. Obtención de las fracciones por pipeteo. Cada plasma es separado mediante pipeteo muy meticuloso para no crear turbulencias en las fracciones obtenida y se trasladan a tubos estériles previamente etiquetado (R=rico, M=medio, P=pobre) donde se reunirán todos los plasmas iguales de los tubos procedentes del centrifugado, mismos que se almacenan para su posterior utilización.

Cabe señalar que la aplicación de este concentrado en el ámbito médico requiere de una fase quirúrgica en la cual dicho plasma es incorporado al lecho biológico (mezclado o no con un material de injerto) y para lo cual requiere de ser activado antes o después de ser colocado en el sitio de interés a fin de promover la coagulación de las plaquetas y logrando de esta manera que las células liberen el contenido existente en los gránulos alfa. La fase de fibrina sobrante en el tubo de ensayo puede emplearse para la obtención, una vez coagulada la fibrina, da una auténtica membrana reabsorbible que se puede posicionar a modo de barrera entre el material injertado y los tejidos blandos, pero su estabilidad es variable y se reabsorbe muy rápidamente [7].

2.1.1. Almacenamiento y conservación del concentrado plaquetario

La solución anticoagulante-conservante evita la coagulación y proporciona los nutrientes adecuados para que el proceso metabólico de las células sea continuo durante su almacenamiento y conservación. El almacenamiento debe asegurar la integridad (función y viabilidad) de las células sanguíneas, misma que depende de un delicado equilibrio

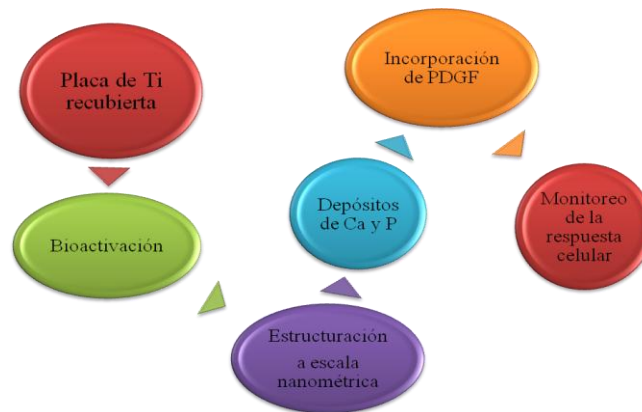
bioquímico de muchos materiales, especialmente la glucosa, los iones hidrógeno (pH), y el trifosfato de adenosina (ATP). Este equilibrio se mantiene mejor en los hematies cuando se almacenan a una temperatura entre 1 y 6 °C, en tanto que las plaquetas y leucocitos mantienen mejor su función almacenados a temperatura ambiente. Los factores de coagulación plasmáticos lábiles se mantienen mejor a una temperatura de -18 °C o inferior. Además, la refrigeración o congelación minimizan la proliferación de bacterias que podrían haberse introducido en la unidad durante la venipuntura o procesamiento [8], [9]. En resumen, para la fracción plaquetaria, los parámetros de conservación se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de conservación del concentrado plaquetario.

Parámetro	Valor óptimo	Valor perjudicial	Consecuencia
Temperatura	18-24°C	Frío	daño morfológico
pH	6.4-7.4	< 6.2	hinchazón, aglutinamiento, lisis
Intercambio gaseoso	bolsa permeable a los gases y mantenerse en agitación continua	> 24 hrs sin agitación	daño irreversible
Viabilidad	7 días (periodo máximo sin riesgo de sepsis en receptores por contaminación bacteriana)		

2.2. Montaje experimental

Haciendo uso de la técnica de obtención de PRP y con la finalidad de lograr la incorporación de células osteoprogenitoras a la matriz bioactiva del implante metálico, se propone el siguiente ensayo de laboratorio (ver esquema 1).



Esquema 1. Ruta crítica para el ensayo de laboratorio.

Así mismo el procedimiento experimental desarrollado para cada uno de los pasos involucrados en el ensayo se muestra a continuación (ver figura 1). Cabe señalar que para la fase de incorporación del PRP, se ha propuesto un paso adicional con la finalidad de obtener sobre la superficie del sustrato modificado una capa topográficamente homogénea de los componentes plaquetarios de interés, que proporcione una mayor área de interacción entre las proteínas promotoras de tejido y las células osteoblásticas, considerando el hecho

antes mencionado de que mientras mayor sea la densidad de células existentes mayor será el número de FC liberados en el sitio de acción.

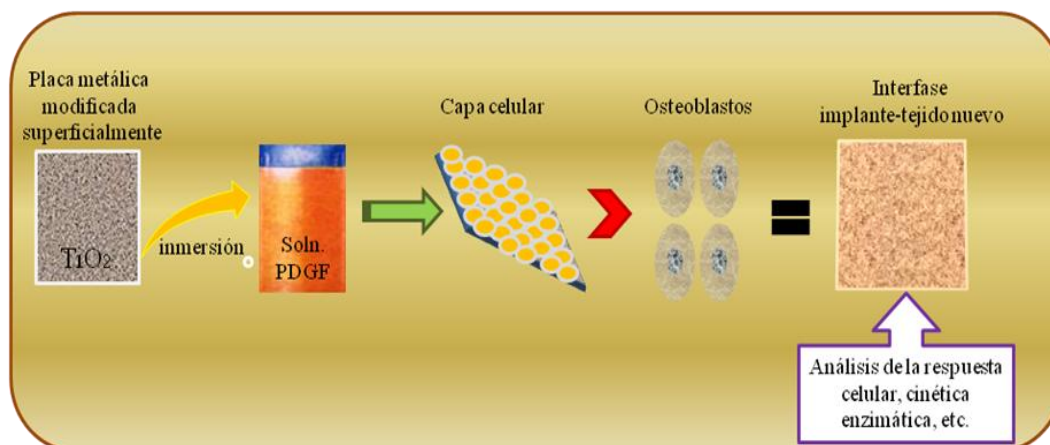


Figura 1. Montaje experimental.

3. Resultados y Discusión

El aumento en la incidencia de patologías óseas, musculares y cartilaginosa está fomentando la investigación y desarrollo de nuevas terapias y tratamientos que permitan una recuperación funcional del paciente, y siempre que sea posible en un periodo más breve de tiempo lo que sin duda originará beneficios tanto de salud como sociales. De forma paralela, otros campos científicos en auge como la medicina regenerativa o la ingeniería de tejidos se cimientan en los mismos principios y objetivos para desarrollar productos seguros y eficaces que creen nuevas opciones terapéuticas en la reparación de tejidos. En líneas generales, este conjunto de nuevas tecnologías tienen en común el uso de factores de crecimiento y proteínas con actividad biológica y su aplicación local en las zonas tisulares dañadas con el objeto de acelerar la reparación y/o regeneración de los tejidos.

No obstante, el éxito final de estos nuevos tratamientos biomédicos radicará en la óptima estandarización, formulación y liberación de los factores de crecimiento así como su perfecta asociación y combinación con diferentes biomateriales y células. Un desafío final será adaptar los diferentes tratamientos y productos biomédicos a cada situación patológica con el fin último de aumentar el éxito terapéutico garantizando al máximo la bioseguridad de los mismos. En este sentido cabe destacar el enorme avance realizado en el estudio, uso y formulación de los factores de crecimiento y proteínas terapéuticas contenidas en las plaquetas. La tecnología del PDGF lleva más de una década en constante evolución y desarrollo, lo que ha convertido al PDGF en un preparado bioseguro, biocompatible, estandarizado y versátil. Hoy en día, esta tecnología ofrece un abanico enorme de posibilidades terapéuticas en muy diversas áreas tales como la implantología oral, la cirugía oral y maxilofacial, la ortopedia, la dermatología, el tratamiento de úlceras crónicas, etc.

4. Conclusiones y Recomendaciones

Como resultado de la revisión bibliográfica referente a la obtención y usos del PRP en el ámbito clínico, es posible extraer una serie de conclusiones que se pueden resumir dependiendo de los parámetros de estudio y objetivo deseado, de la siguiente manera. Pese a que la técnica del uso de un plasma autólogo, no tóxico e inmunorreactivo, es una tecnología de vanguardia puesto que presume tener numerosas aplicaciones en el tratamiento de heridas musculoesqueléticas, la escasez de resultados para modelo humano sugiere una revisión a detalle de los datos obtenidos para sistemas *in vitro*, donde la metodología y criterios usados para el cálculo de indicadores óseos como respuesta celular, actividad enzimática de proteínas osteointegradoras y osteoinductoras, densidad del tejido regenerado, etc., generen resultados *a priori* no reproducibles.

Para nuestro caso, un factor importante en el uso de esta técnica, es la capacidad de la capa o membrana celular formada sobre la superficie del sustrato metálico modificado a la abrasión mecánica como resultado primero de la colocación del implante recubierto en el sitio de interés y segundo, del constante roce o fricción entre las interfases óseas existentes.

Agradecimientos

Al Dr. Roumen Zlatev Koytche por su apoyo de beca.

Referencias

- [1] Niimura, M^a, Fernández, S., “Tratamiento con factores de crecimiento plaquetario de una rotura parcial del flexor digital superficial en un caballo de carreras”, *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, vol. 1, n° 2, pp. 208-214, 2007.
- [2] Romo, J., Gámez, L., Escriva, J., “Factores de crecimiento en cirugía ortopédica”, *Ortho-Tips*, vol. 5, n° 1, pp. 88-92, 1999.
- [3] Reyes, M., Montero, S., Cifuentes, J., Zarzar, E., “Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento”, *Revista Dental de Chile*, vol. 93, n° 2, pp. 25-28, 2002.
- [4] Massardo, L., “Enfermedades óseas metabólicas”, [en línea]. Recuperado el 30 de agosto de 2010, de <http://escuela.med.puc.cl/publ/reumatologia/apuntes/16EnfermedadesOseas.html>
- [5] Anitua, E., Sánchez, M., Nurden, A. T., Nurden, P., Orive, G., Andía, I., “New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies”, *Trends in Biotechnology*, vol. 24, n° 5, pp. 227-234, 2006.
- [6] Dohan, D., Rasmusson, L., Albrektsson, T., “Classification of platelet concentrates: from pure platelet rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet rich fibrin (L-PRF)”, *Trends in Biotechnology*, vol. 27, n° 3, pp. 158-167, 2009.
- [7] Lobato, M^a, Criado, A. (2009, 01 de febrero). “Plasma rico en plaquetas en la clínica dental”, [en línea]. Madrid, España: Gaceta Dental Digital. Recuperado el 10 de septiembre de 2010, de <http://www.gacetadental.com/noticia.asp?ref=2660&pos=165>

[8] Murphy, S. (1990, 24 de agosto). “Procedimiento para almacenar plaquetas sanguíneas”, [en línea]. USA: Thomas Jefferson University. Recuperado el 05 de agosto de 2010, de <http://www.patentesonline.com.mx/procedimiento-para-almacenar-plaquetas-sanguineas-30386.html>

[9] Invenia. “Conservación prolongada de plaquetas sanguíneas”, [en línea]. USA: LIFECELL CORPORATION. Recuperado el 05 de agosto de 2010, de <http://www.invenia.es/oepm:e98105964>



ANODIZACIÓN POTENCIOSTÁTICA CON PULSOS INVERTIBLES PARA FORMACIÓN DE NANOTUBOS DE TiO_2 AUTO-ORGANIZADOS

M. Soto Tapiz, M. Carrillo Beltrán*, R. Koytchev Zlatev, M. Stilianova Stoytcheva, B. Valdez Salas

Instituto de Ingeniería de la UABC, Blvd. Benito Juárez s/n, 21280 Mexicali, B. C., México
*Tel/Fax (686)566-4150, monica@uabc.edu.mx

RESUMEN

Las condiciones óptimas para obtención de nanotubos con grande diámetro y pequeña longitud sobre la superficie del Ti fueron determinados: amplitudes de los pulsos anódicos 120 V y catódicos -5 V; concentración de los iones F^- 1.5% como HF; temperatura 25 °C y tiempo 100 horas en electrolito DEG/HF para obtener un porcentaje máxima de la cobertura de la superficie de Ti nano estructurada con hidroxiapatita la composición química de cual es igual de la composición de los huesos que facilita la aceptación de los prótesis de Ti de cuerpo humano.

Palabras Claves: Ti nanotubos, Anodización por pulsos, Superficie nano estructurada

ABSTRACT

The optimal conditions for nanotubes formation having large diameter and short length on the Ti surface applying pulsed anodization was determinate to be: 120 V anodic pulse; -5 V cathodic one; 1.5% F^- concentration as HF; formation time 100 hours and 25 °C to obtain maximal coverage percentage of the Ti prosthesis with hydroxyapatite facilitating its acceptance by the human body due to the same composition of the hydroxyapatite as those of the bones.

Key Words: Ti nanotubes, Pulsed anodization, Nanostructured surface



1. INTRODUCTION

The nanotubes formed on the Ti surface find its application mainly because of its photo-electro-catalytic properties [1]. On the other hand however its great surface size facilitates the immobilization of materials of biological importance as enzymes and cells but also inorganic material as hydroxyapatite as well. The hydroxyapatite layer helps the acceptance of the Ti prosthesis by the body which recognizes them as “its own part” because of the hydroxyapatite chemical composition, same as the bones one. As stated by Sorachon et al [2] larger pore sizes and shorter length facilitate the fixation of the immobilized substance into the nanotubes, thus improving the interfacial contact with the TiO₂. [3, 4].

The method the most applied for Ti nanotube formation is the anodization in acidic or complex forming electrolytes containing species as NH₄⁺ and F⁻ and modifiers as glycerol, ethylene-glycol, polyethylene-glycol (PEG 400) or mix of them [5-13]. The nanotubes formation itself and its geometrical characteristics: diameter, wall thickness and length depend on the conditions of their formation: solution composition, amplitude of applied potential or current and time of formation [2]. The most important factor determining the nanotube morphology however is the balance between the electrochemical processes (oxide growth with metal etching) and Ti chemical dissolution caused by the acidic or complex-forming electrolyte [14-17]. When the chemical dissolution rate is too high or too low (depending on the F⁻ concentration) nanotubes cannot be formed because of the very rapid or very slow oxide formation. On the other hand when the chemical dissolution is relatively slower compared with the electrochemical oxide layer growth the dissolution becomes the factor determining in the oxide self-assembling. [18].

Some authors reported application of voltage pulses instead of constant voltage or constant current resulting in better defined nanotube morphologies and easier way to control the nanostructured layer parameters [19-29]. The pulse duration ratio of the anodic and cathodic pulses affects the oxide formation – Ti dissolution processes during the nanotubes growth. The surface passivation resulting from the adsorption of NH₄⁺ which inhibits the oxide formation is also affected by the pulse duration ratio and the electrolyte modifiers nature and concentrations as well since the cathodic pulse provokes dissolution of the nanotubes walls removing thus the adsorbed species [18]. As reported Chanmanee et al [18], the cathodic pulse duration

augmentation leads to shorter nanotubes formation having thicker walls thus proving the opportunity to control the nanotubes geometrical characteristics by the pulses duration ratio.

Various processes with controversial effects occur during the nanotube formation by pulsed anodization: anodic oxide formation, electrochemical etching and species adsorption during the anodic pulse, nanotubes wall dissolution during the cathodic pulse, chemical etching during both pulses. Any of these processes is affected by the pulses application but another factor can be used to control the nanotube formation process and hence the nanotubes morphology: “open circuit” period. It will facilitate the chemical etching (corrosion) by F^- and the adsorption of the NH_4^+ as well which inhibit the anodic oxidation. As reported by Sorachon et al [2] these two processes combined with the high voltage application and long deposition time results in large diameter nanotubes formation.

The objective of the present work is studying the effect of the application of “open circuit” period on the nanotube morphology combined with the application of high potential amplitude and long deposition time in order to obtain short nanotubes with large diameters allowing a better coverage of the nanostructured Ti surface with hydroxyapatite.

2. EXPERIMENTAL METODOLOGY

2.1. Specimens, reagents and apparatus

The titanium specimens 1 by 1 cm of F1472 (Ti6Al4V) Ti alloy was applied in all the experiments polished to a mirror quality using sandpaper from 220 to 1500 grit. The degreasing was carried out for 5 min in acetone and after finally washing in ultrapure water the specimens were used immediately. The electrochemical experiments were carried out in 50 ml cell where was immersed the Ti alloy specimen and the large Pt foil cathode, employing a two RK80H power supplies (Matsusada Precision) for the anodic and the cathodic pulses respectively. The voltage and current was registered by NI 6009 Data Acquisition System controlled by NI Lab View 8.0 software.

A homemade pulse forming unit using two relays, for the anodic y cathodic pulses respectively controlled by NI Lab View 8.0 software was employed in the experiments with pulses application. The open circuit period was achieved by switching off the two relays. All the

experiments were carried out at room temperature (25 °C). The electrolytes were prepared by mixing DEG (Sigma) with 48% solution of HF (Merck).

2.2. Preparation of TiO₂ nanotubes and their characterization

The specimen after its drying and the Pt cathode were immersed in the electrochemical cell filled with the electrolyte. The potential was applied under stirring by magnetic stirrer with 300 rpm and acquisition of the data was carried out til the end of the experiments. The formed nanotubes geometrical dimensions were determined by AFM Quesant, model 350 application.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Anodic potential, deposition time and F⁻ concentration optimization

Since every of the three parameters: anodic voltage, deposition time and the F⁻ concentration has its own influence on the size of the formed nanotubes on the Ti surface their optimal values were determined in order to obtain short pores with large diameter which facilitate the hydroxyapatite fixation on the nanostructured Ti. As reported by Sorachon et al [2] and Chanmanee et al [18] the potential amplitude affects mainly the nanotube diameter while the deposition time affects their length which pass through a maximum.

To determine the optimal amplitude of the anodic pulse, preliminary experiments with the application of DC potential in the range from 20 to 120 V vs. the cathode were carried out. DEG/HF electrolyte with F⁻ concentrations from 0.5 to 2 % was employed; the deposition time was in the range between 10 up to 120 hours and the temperature 25 °C. HF was preferred instead of NH₄F to avoid the NH₄⁺ specie adsorption inhibiting the electrochemical oxidation process. The registered curves in coordinates: nanotube diameter / DC anodic voltage are shown in Figure 1. As seen from there the anodic voltage augmentation results increasing nanotubes diameter depending also by the F⁻ concentration. A rising part on the curve appears from 0.5% up to 1.5% F⁻ concentration while its augmentation up to 2 % causes rapid diminution of the formed nanotubes diameter due to the increased chemical dissolution of the electrochemically formed oxide.

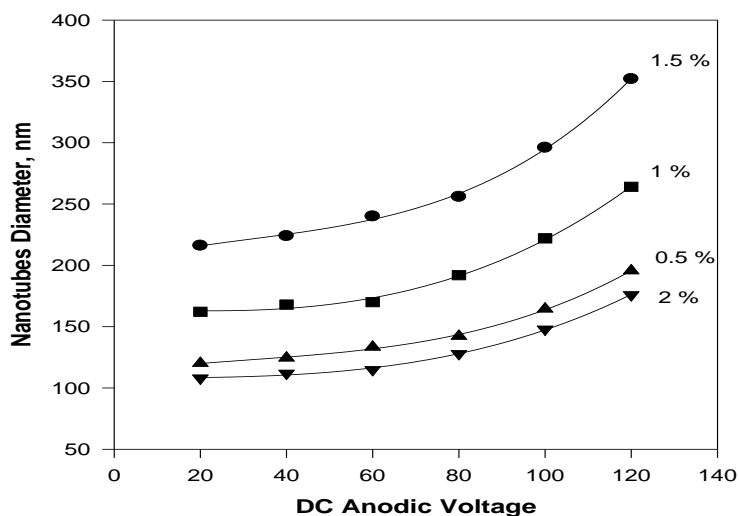


Figure 1. Nanotube diameter as a function of the applied DC anodic voltage for F^- concentrations: 0.5%, 1%, 1.5% and 2% in DEG/HF electrolyte, 100 hours deposition time at 25 °C.

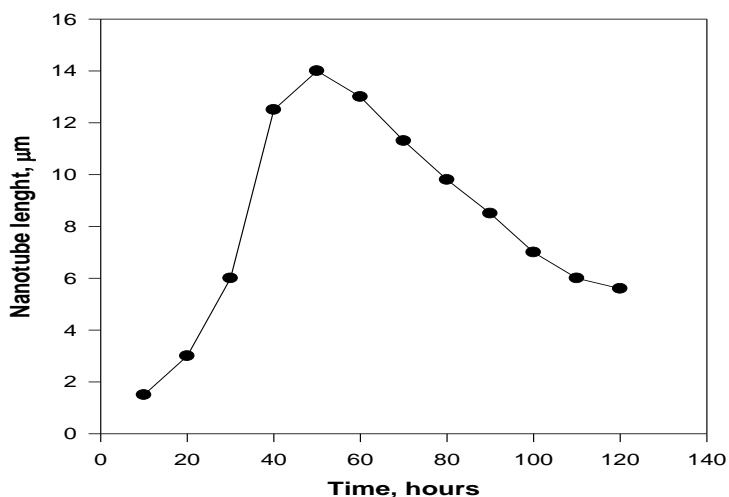


Figure 2. Nanotube length as a function of the deposition time. Applied DC anodic voltage 120 V; F^- concentrations 1.5%; temperature 25 °C

The influence of the deposition time on the formed Ti nanotubes length was determined at the optimal experimental conditions determined above: 1.5 % F^- concentration, 120 V DC applied potential, 25 °C. The deposition time was varied from 10 to 120 hours and the registered curve in coordinates: nanotube length – time is shown in Figure 2. Since the curve passes through a

maximum, short nanotubes can be obtained for very short as well for long deposition times. The diameter of the nanotubes formed in a short time however is much smaller than that obtained for long deposition time and that is why the longer times were preferred.

Thus, the optimal conditions to yield the best nanotubes morphology: short length and large diameter suitable for maximal coverage of the nanostructured Ti surface by hydroxyapatite were determined to be: 120 V DC applied anodic potential, deposition time of 100 hours at the temperature of 25 °C and F⁻ concentration (as HF) of 1.5%.

1.1. Pulses application

Potential pulses with amplitudes of 120 V and -5 V and duration ratio from 9 to 1 up to 200 to 1 for the anodic and the cathodic pulses respectively were applied.

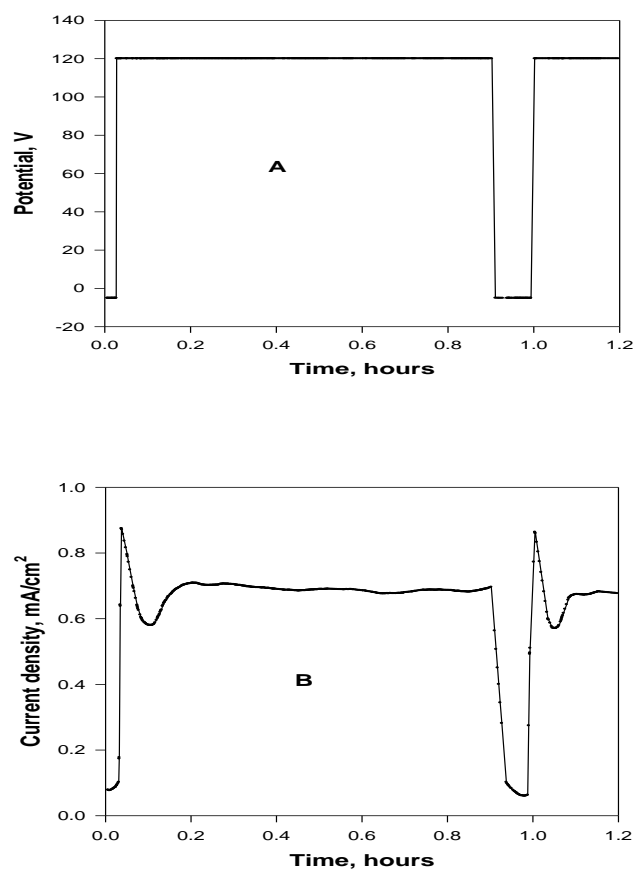


Figure 3. Anodic and cathodic pulse potential (A) and resulting currents (B) at 9 to 1 pulse duration ratio; F⁻ concentrations = 1.5% ; temperature = 25 °C

The potential and its corresponding current waveform are presented in Figure 3A and 3B respectively. The transition from anodic to cathodic current is smooth while a sharp overshoot appear during the opposite transition followed by a longer negative peak. This shape of the curve can be explained with the electrochemical dissolution of the TiO_2 during the negative pulse which creates a fresh Ti surface charged during the anodic pulse application. On the other hand the TiO_2 formed by the reapplication of the anodic potential increase the electrical resistance causing the anodic current diminution and the negative peak appearing. The further establishment of the equilibrium between the anodic oxide formation/electrochemical etching and the chemical dissolution leads to anodic current stabilization up to the next cathodic pulse.

As it was mentioned above the nanotube formation and morphology depends on the rate ratio of the electrochemical processes (oxide formation and electrochemical etching) and the chemical dissolution caused by the F^- . This ratio is controlled in general by the applied voltage F^- concentration and the deposition time. On the other hand however the other electrolyte ingredients also affect it in certain range.

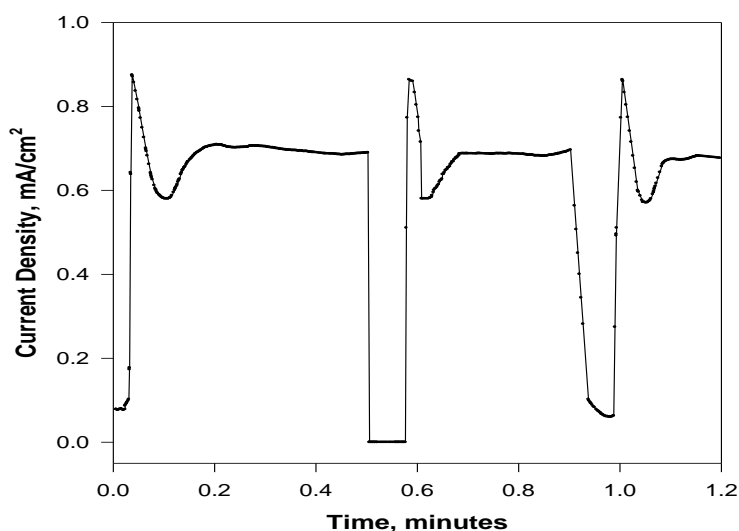


Figure 4. Applied anodic and cathodic pulse potential (A) and resulting currents (B) at 9 to 1 pulse duration ratio, F^- concentrations = 1.5% and temperature = 25 °C

As it was showed above larger nanotubes diameters are obtained by the application of high potentials, which increase the electrochemical processes rates, but not affecting the chemical dissolution rate which determines the nanotubes length. In order to improve the rate ration a third

period was added in the time diagram: open circuit period, during which the chemical dissolution has total priority.

The open circuit period can be applied between the anodic and cathodic pulses as well as immediately before or after the cathodic pulse. The experiments have proved that the best results for the nanotubes length were obtained with the application of the open circuit period immediately after the cathodic pulse as finishing of the oxide dissolution started with the cathodic peaks

The application of a third period, the open circuit period change the equilibrium mentioned above facilitating the chemical etching which results in nanotube diameter increase and more uniform nanostructured Ti surface as well. The current – time waveform corresponding to the “open circuit period” is shown in Figure 4.

The current transition at the end of the open circuit period is very similar to the cathodic to anodic current transition because of the charging current and the subsequent increase of the oxide thickness.

The effect of the anodic and cathodic pulses application as well as the open circuit period can be evaluated by the comparative results about the obtained nanotube geometric dimensions presented in Table 1.

Table I. Geometric size of nanotubes obtained by pulse mode with and without open circuit period

Mode	Nanotube diameter, nm	Nanotube length, μm
Pulsed without open circuit period	358	7.1
Pulsed with open circuit period	369	6.3

2. CONCLUSIONS

The optimal conditions for nanotubes formation having large diameter and short length on the Ti surface applying pulsed anodization was determinate to be: 120 V anodic pulse; -5 V cathodic one; 1.5% F⁻ concentration as HF; formation time 100 hours and 25 °C to obtain maximal coverage percentage of the Ti prosthesis with hydroxyapatite facilitating its acceptance by the human body due to the same composition of the hydroxyapatite as those of the bones.

3. REFERENCES

- [1] X. Quan, X. Ruan, H. Zhao, S. Chen and Y. Zhao, *Environmental Pollution*, **147** (2), 409, (2007)
- [2] Sorachon Yoriya and Craig A. Grimes *Langmuir* 2010, 26(1), 417–420
- [3] Mor, G. K.; Shankar, K.; Paulose, M.; Varghese, O. K.; Grimes, C. A. *Appl. Phys. Lett.* 2007, 91, 152111.
- [4] Shankar, K.; Mor, G. K.; Prakasam, H. E.; Varghese, O. K.; Grimes, C. A. *Langmuir* 2007, 23, 12445.
- [5] Mor, G. K.; Varghese, O. K.; Paulose, M.; Shankar, K.; Grimes, C. A. *Sol. Energy Mater.* 2006, 90, 2011.
- [6] Grimes, C. A.; Mor, G. K. *TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties, and Applications*; Springer: New York, 2009.
- [7] Prakasam, H. E.; Shankar, K.; Paulose, M.; Varghese, O. K.; Grimes, C. A. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 7235.
- [8] Yoriya, S.; Prakasam, H. E.; Varghese, O. K.; Shankar, K.; Paulose, M.; Mor, G. K.; LaTempa, T. J.; Grimes, C. A. *Sens. Lett.* 2006, 4, 334.
- [9] Paulose, M.; Shankar, K.; Yoriya, S.; Prakasam, H. E.; Varghese, O. K.; Mor, G. K.; LaTempa, T. J.; Fitzgerald, A.; Grimes, C. A. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 16179.
- [10] Yoriya, S.; Paulose, M.; Varghese, O. K.; Mor, G. K.; Grimes, C. A. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 13770.
- [11] Su, Z.; Zhou, W. *Adv. Mater. Commun.* 2008, 20, 3663.
- [12] Macak, J. M.; Hildebrand, H.; Marten-Jahns, U.; Schmuki, P. *J. Electroanal. Chem.* 2008, 621, 254.
- [13] Su, Z.; Zhou, W. *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 2301.
- [14] Review: Mor, G. K.; Oomman, K. V.; Paulose, M.; Shankar, K.; Grimes, C. A. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2006**, 90, 2011
- [15] Lehmann, V.; Goßelle, U. *Appl. Phys. Lett.* **1991**, 58, 856.
- [16] Jessensky, O.; Muller, F.; Goßelle, U. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 72, 1173.
- [17] Zwilling, V.; Aucouturier, M.; Darque-Ceretti, E. *Electrochim. Acta* **1991**, 44, 921.

- [18] JW. Chanmanee, A. Watcharenwong, C. Ramannair, P. Kajitvichyanukul, N. Tacconi, K. Rajeshwar *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (3), 965, (2008)
- [19] Shankar, K.; Mor, G. K.; Prakasam, H. E.; Yoriya, S.; Paulose, M.; Varghese, O. K.; Grimes, C. A. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 065707.
- [20] Beranek, R.; Hildebrand, H.; Schmuki, P. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2003**, *6*, B12.
- [21] Macak, J. M.; Tsuchiya, H.; Taveira, L.; Aldabergerwa, S.; Schmuki, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7463.
- [22] Macak, J. M.; Schmuki, P. *Electrochim. Acta* **2006**, *52*, 1258.
- [23] Macak, J. M.; Taveira, L. V.; Tsuchiya, H.; Sirotna, K.; Macak, J.; Schmuki, P. *J. Electroceram.* **2006**, *16*, 29.
- [24] Raja, K. S.; Misra, M.; Paramguru, K. *Electrochim. Acta* **2005**, *51*, 154.
- [25] Mohapatra, S.; Misra, M.; Mahajan, V. K.; Raja, K. S. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 8677.
- [26] Zhao, J.; Wang, X.; Chen, R.; Li, L. *Solid State Commun.* **2005**, *134*, 705.
- [27] Zhao, J.; Wang, X.; Sun, T.; Li, L. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2450.
- [28] Xie, Y.; Zhou, L. M.; Huang, H. *Mater. Lett.* **2006**, *60*, 3558.
- [29] de Tacconi, N. R.; Chenthamarakshan, C. R.; Yogeeswaran, G.; Watcharenwong, A.; de Zoysa, S.; Basit, N. A.; Rajeshwar, K. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 25347.
- [30] Kaneco, S.; Chen, Y.; Westerhoff, P.; Crittenden, J. C. *Scr. Mater.* **2007**, *56*, 373.

Titanium Nanotubes Formation by Reversible Pulses Anodization

M. Soto, M. Carrillo, R. K. Zlatev, M. S. Stoytcheva, B. Valdez

Engineering Institute of UABC, Mexicali, Baja California 21280, Mexico

The formation of large diameter and short length nanotubes on Ti alloys prosthesis surface increases the coverage percentage by hydroxyapatite, which facilitates the prosthesis acceptance by the human body. Pulsed anodization with 120 V anodic pulse amplitude and -5 V cathodic one was applied during 100 hours for nanotube formation on F1472 (Ti6Al4V) Ti alloy in electrolyte containing 1.5% F⁻ as HF at 25°C. A “open circuit” period was additionally applied and the influence of its duration on the coverage percentage was studied.

Introduction

The nanotubes formed on the Ti surface find its application mainly because of its photo-electro-catalytic properties (1). On the other hand however its great surface size facilitates the immobilization of materials of biological importance as enzymes, cells and inorganic materials as hydroxyapatite as well. The hydroxyapatite layer helps the acceptance of the Ti prosthesis by the body which recognizes them as “its own part” due to the hydroxyapatite chemical composition, same as the bones one. As stated by Sorachon et al (2) larger pore sizes and shorter pore length facilitate the fixation of the immobilized substance into the nanotubes, thus improving the interfacial contact with the TiO₂ (3, 4).

The method the most applied for Ti nanotube formation is the anodization in acidic or complex forming electrolytes containing species as NH₄⁺ and F⁻ and modifiers as glycerol, ethylene-glycol, polyethylene-glycol (PEG 400) or mix of them (5-13). The nanotubes formation itself and its geometrical characteristics: diameter, wall thickness and length depend on the conditions of their formation: solution composition, amplitude of applied potential or current and time of formation (2). The most important factor determining the nanotube morphology however is the balance between the electrochemical processes (oxide growth with metal etching) and the Ti chemical dissolution caused by the acidic or complex-forming electrolyte (14-17). When the chemical dissolution rate is too high or too low (depending on the F⁻ concentration) nanotubes cannot be formed because of the very rapid or very slow oxide formation. On the other hand when the chemical dissolution is relatively slower compared with the electrochemical oxide layer growth the dissolution becomes the factor determining in the oxide self-assembling (18).

Some authors reported application of voltage pulses instead of constant voltage or constant current resulting in better defined nanotube morphologies and easier way to control the nanostructured layer parameters (19-29). The pulse duration ratio of the anodic and cathodic pulses affects the oxide formation and the Ti dissolution processes during the nanotubes growth. The surface passivation resulting from the adsorption of

NH_4^+ which inhibits the oxide formation is also affected by the pulse duration ratio, the electrolyte modifiers nature and concentrations as well since the cathodic pulse provokes dissolution of the nanotubes walls removing thus the adsorbed species (18). As reported by Chanmanee et al (18), the cathodic pulse duration augmentation leads to shorter nanotubes formation having thicker walls, thus proving the opportunity to control the nanotubes geometrical characteristics by the pulses duration ratio.

Various processes with controversial effects occur during the nanotube formation by pulsed anodization: anodic oxide formation, electrochemical etching and species adsorption during the anodic pulse, nanotubes wall dissolution during the cathodic pulse, chemical etching during both pulses. Any of these processes is affected by the pulses application but another factor can be used to control the nanotube formation process and hence the nanotubes morphology: an “open circuit” period. It will facilitate the chemical etching (corrosion) by F^- and the adsorption of the NH_4^+ as well which inhibit the anodic oxidation. As reported by Sorachon et al (2) these two processes results in large diameter nanotubes formation at high voltage application and long deposition time.

The objective of the present work is studying the effect of the application of “open circuit” period on the nanotube morphology combined with the application of high potential amplitude and long deposition time in order to obtain short nanotubes with large diameters allowing a better coverage of the nanostructured Ti surface with hydroxyapatite.

Experimental

Specimens, apparatus and reagents

F1472 (Ti6Al4V) Ti alloy specimens 1 by 1 cm polished to a mirror quality using sandpaper up to 1500 grit were employed in all the experiments. The specimens were used immediately after 5 min degreasing in acetone followed by finally washing in ultrapure water. The electrochemical experiments were carried out in 50 ml cell containing also a large Pt cathode. Two power supplies, type RK80H (Matsusada Precision) were employed together with a homemade electronic unit based on two solid state relays for the anodic and the cathodic pulses formation respectively. NI Lab View 8.0 software was applied for the pulse forming unit control and the voltage and current registration by NI 6009 Data Acquisition System. The open circuit period was achieved by switching off the two relays. All the experiments were carried out at room temperature (25°C). The electrolytes were prepared by mixing DEG (Sigma) with 48% solution of HF (Merck).

Preparation of TiO_2 nanotubes and their characterization

The specimens were immersed in the electrochemical cell containing the electrolyte. The potential was applied under stirring with 300 rpm by magnetic stirrer and acquisition of the data was carried out until the end of the experiments. The formed nanotubes geometrical dimensions were determined by the application of SEM model JSM-6510A, JEOL and AFM model 350, Quesant.

Results and Discussion

Anodic potential, deposition time and F⁻ concentration optimization

Since every of the three parameters: anodic potential, deposition time and the F⁻ concentration has its own influence on the size of the formed nanotubes on the Ti surface their optimal values were determined in order to obtain short pores with large diameter which facilitate the hydroxyapatite fixation on the nanostructured Ti. As reported by Sorachon et al (2) and Chanmanee et al (18) the potential amplitude affects mainly the nanotube diameter while the deposition time affects their length which passes through a maximum.

To determine the optimal amplitude of the anodic pulse, preliminary experiments with the application of DC potential in the range from 20 to 120 V vs. the cathode were carried out. DEG/HF electrolyte with F⁻ concentrations from 0.5 to 2 % was employed; the deposition time was in the range between 10 up to 120 hours and the temperature 25°C. HF was preferred instead of NH₄F to avoid the NH₄⁺ specie adsorption inhibiting the electrochemical oxidation process. The registered curves in coordinates: nanotube diameter / DC anodic voltage are shown in Figure 1. The anodic voltage augmentation results in nanotubes diameter increase depending also on the F⁻ concentration. A rising part on the curve appears from 0.5% up to 1.5% F⁻ concentration while its augmentation up to 2 % causes rapid diminution of the formed nanotubes diameter due to the increased chemical dissolution of the electrochemically formed oxide.

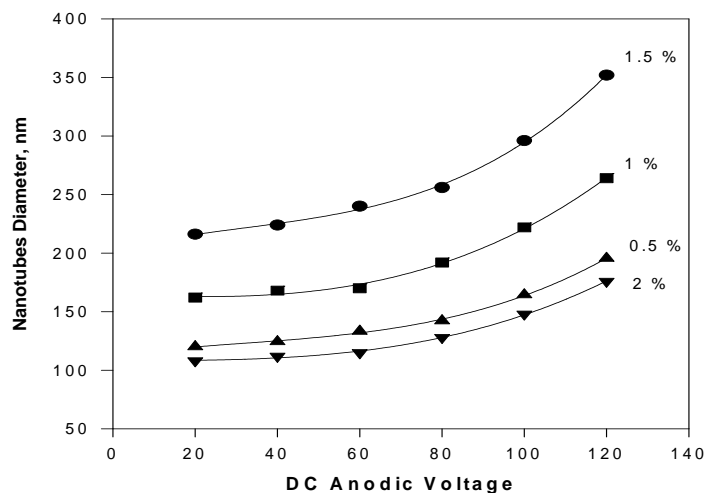


Figure 1. Nanotube diameter as a function of the applied DC anodic voltage for F⁻ concentrations: 0.5%, 1%, 1.5% and 2 % in DEG/HF electrolyte, 100 hours deposition time at 25°C.

The influence of the deposition time on the formed Ti nanotubes length was determined at the optimal experimental conditions determined above: 1.5 % F⁻ concentration, 120 V DC applied anodic potential, and temperature of 25°C. The deposition time was varied from 10 to 120 hours and the registered curve in coordinates:

nanotube length – time is shown in Figure 2. Since the curve passes through a maximum, short nanotubes can be obtained for very short as well for long deposition times. The diameter of the nanotubes formed in a short time however is much smaller than that obtained for long deposition time and that is why the longer times were preferred.

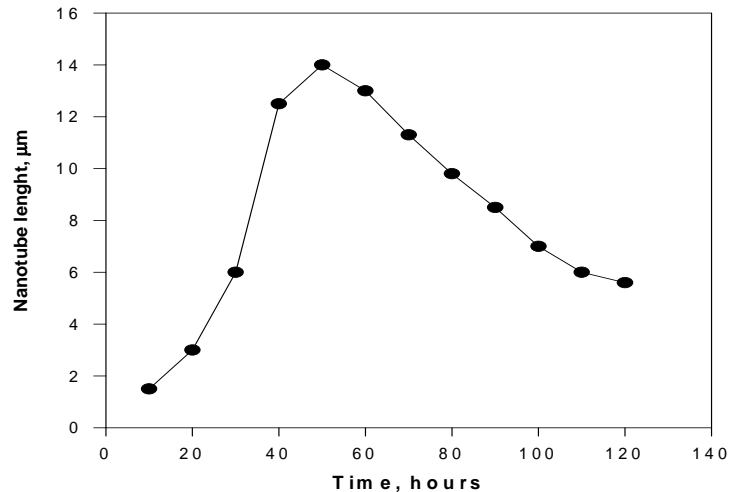


Figure 2. Nanotube length as a function of the deposition time. Applied DC anodic voltage 120 V; F⁻ concentrations 1.5%; temperature 25°C.

Thus, the optimal deposition time at the mentioned conditions was determined to be 100 hours for maximal coverage of the nanostructured Ti surface by hydroxyapatite.

Pulses Application

Potential pulses with amplitudes of 120 V for the anodic pulse and – 5 V for the cathodic one and duration ratio from 9 to 1 up to 200 to 1 for the anodic and the cathodic pulses respectively were applied. The potential and its corresponding current waveform are presented in Figure 3A and 3B respectively. The transition from anodic to cathodic current is smooth while a sharp overshoot appear during the opposite transition followed by a longer negative peak. This shape of the curve can be explained with the electrochemical dissolution of the TiO₂ during the negative pulse which creates a fresh Ti surface charged during the anodic pulse application. On the other hand the TiO₂ formed by the reapplication of the anodic potential increase the electrical resistance causing the anodic current diminution and the negative peak appearing. The further establishment of the equilibrium between the anodic oxide formation/electrochemical etching and the chemical dissolution leads to anodic current stabilization up to the next cathodic pulse.

As it was mentioned above the nanotube formation and morphology depends on the rate ratio of the electrochemical processes (oxide formation and electrochemical etching) and the chemical dissolution caused by the F⁻. This ratio is controlled in general by the applied voltage F⁻ concentration and the deposition time. On the other hand however the other electrolyte ingredients also affect it in certain range.

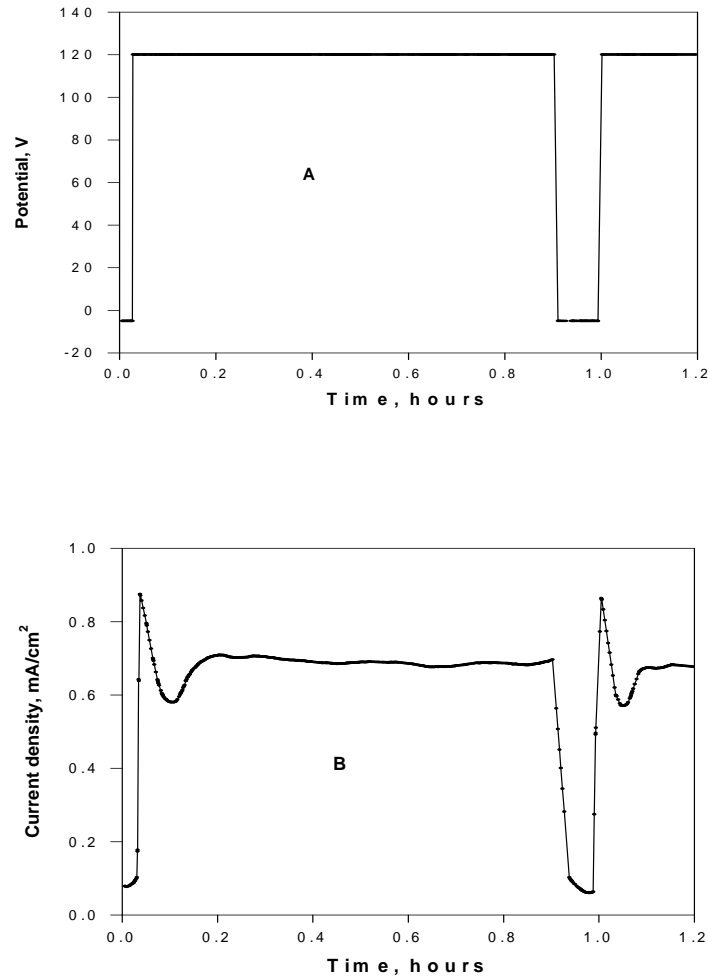


Figure 3. Anodic and cathodic pulse potential (A) and resulting currents (B) at 9 to 1 pulse duration ratio; F^- concentrations = 1.5% ; temperature = 25°C.

As it was showed above larger nanotubes diameters are obtained by the application of high potentials, which increase the electrochemical processes rates, but not affecting the chemical dissolution rate which determines the nanotubes length. In order to improve the rate ration a third period was added in the time diagram: open circuit period, during which the chemical dissolution has total priority. The open circuit period can be applied between the anodic and cathodic pulses as well as immediately before or after the cathodic pulse. The experiments have proved that the best results for the nanotubes length were obtained with the application of the open circuit period immediately after the cathodic pulse as finishing of the oxide dissolution started with the cathodic peaks

The application of a third period, the open circuit period change the equilibrium mentioned above facilitating the chemical etching which results in nanotube diameter increase and more uniform nanostructured Ti surface as well. The current – time waveform corresponding to the “open circuit period” is shown in Figure 4.

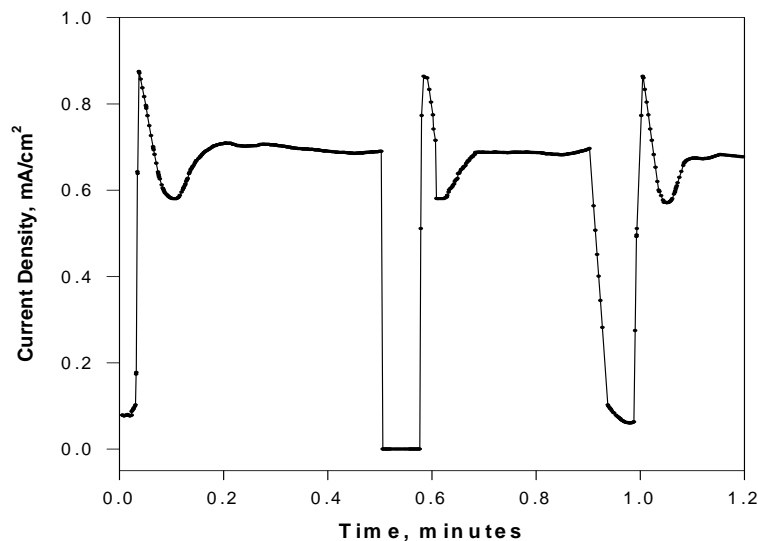


Figure 4. Anodic and cathodic pulse currents and open circuit period at 9 to 1 to 1 pulse duration ratio; F concentrations = 1.5%; temperature = 25°C.

The current transition at the end of the open circuit period is very similar to the cathodic to anodic current transition because of the charging current and the subsequent increase of the oxide thickness. The effect of the anodic and cathodic pulses application as well as the open circuit period can be evaluated by the comparative results about the obtained nanotube geometric dimensions presented in Table I. Photo of nanotubes obtained with the application of open circuit period is presented in Figure 5.

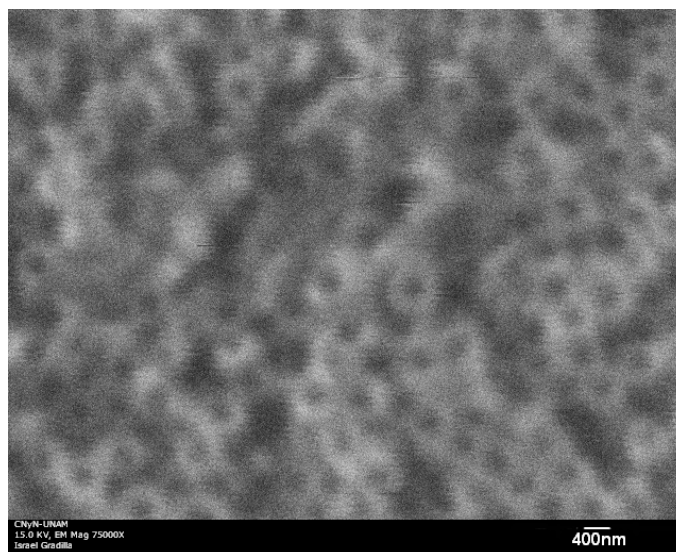


Figure 5. SEM photo of nanotubes formed on the Ti surface in electrolyte contained: di-ethylenglicol in H₂O (weight ratio 80 to 20) and 0.36M/L NH₄F. Anodic to cathodic pulse to open circuit duration = 9 / 1 / 1. Total time of treatment: 3hrs.

TABLE I. Geometric size of nanotubes obtained by pulsed mode with and without open circuit period.

Mode	Nanotube diameter, nm	Nanotube length, μm
Pulsed Without Open Circuit Period	358	7.1
Pulsed With Open Circuit Period	369	6.3

Conclusions

The optimal conditions for the formation of nanotubes having large diameter and short length on the F1472 (Ti6Al4V) Ti alloy surface applying pulsed anodization were determinate in order to obtain maximal coverage percentage of the Ti prosthesis surface with hydroxyapatite facilitating their acceptance by the human body. The application of an additional “open circuit” period together with the anodic and cathodic pulses at the optimal conditions: 120 V anodic pulse; -5 V cathodic one; 1.5% F⁻ concentration (as HF); formation time 100 hours and 25°C allowed an augmentation of the nanotube diameter with 3.25% combined with a 5.9% decreasing of the nanotube length.

Acknowledgment

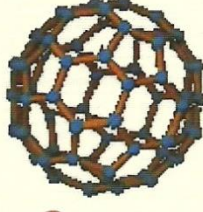
The authors are very grateful to Israel Gradilla and Mario Curiel from CNYN - UNAM, Ensenada Mexico for the competent assistance.

References

1. X. Quan, X. Ruan, H. Zhao, S. Chen and Y. Zhao, *Environmental Pollution*, **147**(2), 409 (2007).
2. S. Yoriya and C. A. Grimes, *Langmuir*, **26**(1), 417 (2010).
3. G. K. Mor; K. Shankar, M. Paulose, O. K. Varghese, C. A. Grimes, *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 152111 (2007).
4. K. Shankar, G. K. Mor, H. E. Prakasam, O. K. Varghese, C. A. Grimes, *Langmuir*, **23**, 12445 (2007).
5. G. K. Mor, O. K. Varghese, M. Paulose, K. Shankar, C. A. Grimes, *Sol. Energy Mater.*, **90**, 2011 (2006).
6. C. A. Grimes, G. K. Mor, *TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties, and Applications*, Springer New York (2009).
7. H. E. Prakasam, K. Shankar, M. Paulose, O. K. Varghese, C. A. Grimes, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 7235 (2007).
8. S. Yoriya, H. E. Prakasam, O. K. Varghese, K. Shankar, M. Paulose, G. K. Mor, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, *Sens. Lett.*, **4**, 334 (2006).
9. M. Paulose, K. Shankar, S. Yoriya, H. E. Prakasam, O. K. Varghese, G. K. Mor, T. J. LaTempa, A. Fitzgerald, C. A. Grimes, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 16179 (2006).
10. S. Yoriya, M. Paulose, O. K. Varghese, G. K. Mor, C. A. Grimes, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 13770 (2007).
11. Z. Su and W. Zhou, *Adv. Mater. Commun.*, **20**, 3663 (2008).
12. J. M. Macak, H. Hildebrand, U. Marten-Jahns, P. Schmuki, *J. Electroanal. Chem.*, **621**, 254 (2008).

13. Z. Su and W. Zhou, *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 2301.
14. Review: G. K. Mor, K. V. Oomman M. Paulose, K. Shankar, C. A. Grimes, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, **90**, 2011 (2006).
15. V. Lehmann and U. Gösselle, *Appl. Phys. Lett.*, **58**, 856 (1991).
16. O. Jessensky, F. Muller, U. Gösselle, *Appl. Phys. Lett.*, **72**, 1173 (1998).
17. V. Zwillling, M. Aucouturier, E. Darque-Ceretti, *Electrochim. Acta*, **44**, 921 (1991).
18. W. Chanmanee, A. Watcharenwong, C. Ramannair, P. Kajitvichyanukul, N. Tacconi, K. Rajeshwar *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(3), 965, (2008)
19. K. Shankar, G. K. Mor, H. E. Prakasam, S. Yoriya, M. Paulose, O. K. Varghese, C. A. Grimes, *Nanotechnology*, **18**, 065707 (2007).
20. R. Beranek, H. Hildebrand, P. Schmuki, *Electrochem. Solid-State Lett.*, **6**, B12 (2003).
21. J. M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerwa, P. Schmuki, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 7463 (2005).
22. J. M. Macak and P. Schmuki, *Electrochim. Acta*, **52**, 125 (2006).
23. J. M. Macak, L. V. Taveira, H. Tsuchiya, K. Sirotna, J. Macak, P. Schmuki, *J. Electroceram.*, **16**, 29 (2006).
24. K. S. Raja, M. Misra, K. Paramguru, *Electrochim. Acta*, **51**, 154 (2005).
25. S. Mohapatra, M. Misra, V. K. Mahajan, K. S. Raja, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 8677 (2007).
26. J. Zhao, X. Wang, R. Chen, L. Li, *Solid State Commun.*, **134**, 705 (2005).
27. J. Zhao, X. Wang, T. Sun, L. Li, *Nanotechnology* **2005**, 16, 2450.
28. Y. Xie, L. M. Zhou, H. Huang, *Mater. Lett.*, **60**, 3558 (2006).
29. N. R. de Tacconi, C. R. Chenthamarakshan, G. Yogeewaran, A. Watcharenwong, S. de Zoysa, N. A. Basit, K. Rajeshwar, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 25347 (2006).
30. S. Kaneco, Y. Chen, P. Westerhoff, J. C. Crittenden, *Scr. Mater.*, **56**, 373 (2007).

Constancias de participación



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
EL CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGIA

Y

**EL CENTRO DE INVESTIGACIONES INTERDISCIPLINARIAS EN
CIENCIAS Y HUMANIDADES**

Otorgan la presente

CONSTANCIA

A

Mónica Isabel Soto Tapiz

Por haber asistido al Taller:

“Nanociencias y Nanotecnología para Principiantes”

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

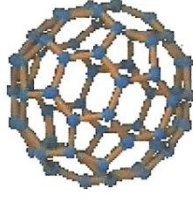
Ensenada, B.C., a 9 de febrero de 2009.

Dr. Sergio Fuentes Moyado
Director

Dra. Ma. Guadalupe Moreno A.
Por el Comité Organizador



XIV Simposio en Ciencia de Materiales



CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGIA
Universidad Nacional Autónoma de México

Otorga la presente

CONSTANCIA

Mónica Isabel Soto Tapiz

Por haber asistido al

XIV Simposio en Ciencia de Materiales del 10-13 de febrero de 2009.

Dr. Sergio Fuentes Moyado
Director

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ensenada, B.C., a 13 de febrero de 2009.

Dra. Ma. Guadalupe Moreno A.
Por el Comité Organizador

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA**

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Mónica Isabel Soto Tapiz

Por haber **ACREDITADO** el Curso:

“INGLÉS NIVEL INTERMEDIO”
Impartido del 25 febrero al 13 mayo de 2009
Con una duración de 30 horas

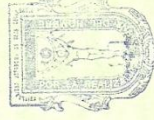
Mexicali, Baja California, 20 de mayo de 2009
“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

Director

DR. BENJAMÍN VALDEZ SALAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



INSTITUTO DE
INGENIERÍA



**Universidad Autónoma de Baja California
Instituto de Ingeniería**



Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Mónica Isabel Soto Tapiz

Por su participación como ASISTENTE durante la presentación del tema:
“Ocurrencia de arsénico, química y especiación. Metodologías analíticas para su determinación”

dirigido a profesores y estudiantes del programa Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, realizado en las instalaciones del Instituto de Ingeniería

POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE
Mexicali, Baja California, 17 de Junio de 2009


Dr. Benjamín Valdez Salas
DIRECTOR

Universidad Nacional Autónoma de México
a través del Consorcio Académico nanoUNAM
extienden la presente

CONSTANCIA a

Mónica Soto Tapiz

por su participación en el Curso Avanzado Nanomateriales: Propiedades Básicas y Aplicaciones

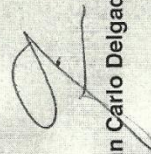
nanomex'09
Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología

que tuvo lugar los días 9, 10 y 11 de noviembre de 2009
en Ensenada, Baja California, México



Dr. Noboru Takeuchi Tan

Coordinadores de NanoMex



Dr. Gian Carlo Delgado Ramos



Universidad Nacional Autónoma de México
a través del Consorcio Académico nanoUNAM
extienden la presente



CONSTANCIA a

Mónica Isabel Soto Tapiz

por su asistencia al

nanomex'09
Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología

que tuvo lugar los días 9, 10 y 11 de noviembre de 2009
en Ensenada, Baja California, México

Dr. Noboru Takeuchi Tan

Coordinadores de NanoMex

Dr. Gian Carlo Delgado Ramos



Universidad Nacional Autónoma de México
a través del Consorcio Académico nanoUNAM
extienden la presente



CONSTANCIA a

**Mónica Isabel Soto Tapiz, Mónica Carrillo Beltrán,
Benjamín Valdez Salas y Roumen Zlatev**

por su participación en



Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología

con el trabajo titulado:

Síntesis de nano-hidroxiapatita sobre biomateriales de uso ortopédico

que tuvo lugar los días 9, 10 y 11 de noviembre de 2009
en Ensenada, Baja California, México

Dr. Noboru Takeuchi

Dr. Gian Carlo Delgado Ramos

Coordinadores de NanoMex

Universidad Autónoma de Baja California Instituto de Ingeniería



Otorga la Presente

CONSTANCIA



Mónica Isabel Soto Tapiz, Mónica Carrillo Beltrán, Benjamín Valdez
Salas, Roumen Zlatev

COMO AUTORES DE LA PONENCIA TITULADA

“Síntesis de nano-hidroxiapatita sobre sustratos de Titanio anodizado”

En el Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, UABC

Mexicali, Baja California, 25 al 27 de Noviembre de 2009

“ POR LA REALIZACIÓN DE LA FIENA DEL HOMBRE”

Firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del Dr. Benjamín Valdez Salas.

DR. BENJAMIN VALDEZ SALAS
DIRECTOR



Universidad Autónoma de Baja California Instituto de Ingeniería

Otorga la presente

CONSTANCIA

a: *Monica Isabel Soto Tapiz*

Por su excelente presentación de la conferencia:

"Análisis del factor de crecimiento derivado de plaquetas en la osteointegración"

Durante el 2do. Congreso de Estudiantes de Posgrado
del Instituto de Ingeniería de la UABC

"POR LA REALIZACION PLENA DEL HOMBRE"
Mexicali, Baja California, 23 a 25 de Noviembre de 2010

Dr. Benjamin Valdez Salas
DIRECTOR

Dra. Monica Carrillo Beltrán
Coordinadora MYDCI





Universidad Autónoma de Baja California Instituto de Ingeniería

Otorga la presente



CONSTANCIA

a:

Monica Isabel Soto Tapiz

Por su participación activa dentro del comité organizador del:

"2do. Congreso de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería"

"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"
Mexicali, Baja California, 23 a 25 de Noviembre de 2010

Dr. Benjamín Vázquez Salas
DIRECTOR

Dra. Monica Carrillo Beltrán
Coordinadora MYDCI