

Tesis Doctoral

**Implementación, caracterización y
validación biológica de técnicas de
modificación superficial de titanio
poroso pulvimetalúrgico para
aplicaciones biomédicas**

Cristina Domínguez Trujillo

Directores:

Yadir Torres Hernández

José Antonio Rodríguez Ortiz

Tutor: Francisco José Gotor Martínez

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019

Tesis Doctoral

Ciencia y Tecnología de Nuevos Materiales

Implementación, caracterización y validación biológica de técnicas de modificación superficial de titanio poroso pulvimetalúrgico para aplicaciones biomédicas

Autor:

Cristina Domínguez Trujillo

Directores:

Yadir Torres Hernández (Profesor Titular de Universidad)

José Antonio Rodríguez Ortiz (Catedrático de Universidad)

Departamento de Ingeniería y Ciencias de los Materiales y el Transporte

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019

Tesis doctoral: *Implementación, caracterización y validación biológica de técnicas de modificación superficial de titanio poroso pulvimetalúrgico para aplicaciones biomédicas*

Autor: Cristina Domínguez Trujillo

Tutor: Francisco José Gotor Martínez

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2019

El Secretario del Tribunal

A mi familia, por demostrarme día tras día que siempre están ahí.

A Celia, Elvi y Salva, por no dejar nunca de creer en mí.

A Raquel, por tirar de mí todos los días.

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta aquí, ha sido un camino duro. Sin embargo, tengo la gran suerte de no estar sola, y cada vez que lo he necesitado, una mano me ha ayudado a levantarme. Esta Tesis, sin esos apoyos, no hubiera sido posible.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi familia. Me habéis escuchado, abrazado, apoyado. Simplemente, estado. Sois mis pilares, y vuestra firmeza me ha dado fuerza para seguir.

Quienes me han sacado una sonrisa siempre, y me han recordado todas las veces que ha hecho falta que puedo hacerlo, han sido mis amigos. De Pozoblanco, de Sevilla, de Inglaterra, de Francia y de Estados Unidos. Mis apoyos incondicionales. Y en especial, Celia, Elvi y Salva. Por haber estado día tras día conmigo, haciéndome la vida más fácil.

Me gustaría dar las gracias a mis directores, Yadir Torres y José Antonio Rodríguez, y a Juan José Pavón, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y haberme abierto puertas en el extranjero en el ámbito de las aplicaciones biomédicas. De igual forma, al Ministerio de Ciencia e Innovación por los fondos recibidos para esta investigación (MAT2015-71284-P), y a la Junta de Andalucía, que a partir de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia junto con el

Programa Operativo FEDER, ha financiado mi contrato por parte del Vicerrectorado de la Universidad de Sevilla (P12-TEP-1401).

Asimismo, agradezco enormemente la ayuda y profesionalidad del Prof. Eduardo Saiz y del Prof. Thomas Webster, así como a sus correspondientes equipos de investigación. Ha sido una gran oportunidad el poder desarrollarme en el Imperial College of London y en la Northeastern University. Asimismo, a todas las personas con las que he trabajado y he publicado, porque ellas han hecho posible el realizar esta Tesis por Compendio de Artículos. Especialmente a Fátima y Ana C., por dedicarme su tiempo.

A Mercedes Borda, por darme tanta fuerza y constancia en esta etapa final tan decisiva. A compañeros y amigos del Departamento, por todo el apoyo y ayuda recibidos, en especial a Ray, Ana, Cristina, Isa, Eva y Laureano. Por supuesto, también a Consuelo, por todo su excepcional trabajo y por haberme brindado su amistad.

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin mis alumnos y compañeros, sobre todo Jose Mari, Sandra, Paloma, Chema, Ana I., Julio y Felipe. Cada una de las palabras de este trabajo, son parte de vosotros. Me habéis mantenido a flote a lo largo de todo este tiempo, sin saberlo.

Por último, Jesús Pinto, Mercedes Sánchez, Miguel Madrid y Raquel Astacio. No tengo palabras que expresen todo lo que os debo, amigos. Habéis sido mi base.

GRACIAS.

ABSTRACT

Commercial pure Titanium is a well-known metallic biomaterial that presents a suitable *in vivo* behavior, being recognized as a good candidate in cortical bone tissue replacements. Nevertheless, stress-shielding phenomenon and the deficient osseointegration are still some limitations to solve. In this context, porous titanium substrates were manufactured using the space-holder technique (50 vol% of NH_4HCO_3 , with two different ranges of particle size: 100-200 and 250-355 μm). The samples were pressed at 800 MPa and sintered at 1250 °C during 2h, obtaining a balance between mechanical resistance and stiffness and reducing the Young's modulus of samples.

In order to enhance the bone in-growth and the osseointegration, different surface modification techniques were implemented. These methods can be classified in three types. One of them consisted on generating roughness on the flat surface and inside the pores by chemical etching (substrates immersion in HF solution at 125 and 625 s). The additional roughness on the topography promoted osteoblast adhesion, improving the osseointegration. The second method was related to become bioactive the substrate surface by bioactive coatings deposition. For that purpose, hydroxyapatite (HA) and bioactive glass (BG) coatings were deposited onto the substrates, using the sol-gel technique and dripping sedimentation, respectively. Additionally, substrates coated with bioactive glass were immersed in simulated

body fluid (SBF) to evaluate the HA precipitation. Bioactive coatings filled and penetrated the pores, getting a better adhesion between titanium and the bone. Finally, the last process is based on the use of a SPEEK coating deposited on the titanium substrates. The success of this method was evaluated in terms of antibacterial behavior. In particular, *MRSA* strain was cultured. The SPEEK coating presence inhibited bacteria adhesion and proliferation, preventing possible infections around the titanium implant.

All the substrates, porous and fully-dense, were characterized before and after every surface modification. The characterization was performed in terms of micro-structure (density, porosity, composition and phases), topography (surface and roughness area), macro (E_d , E_c , σ_y) and micro-mechanical (Vickers micro-hardness, $P-h$ curves), and tribological (scratch and wear resistances) behavior. Furthermore, the osseointegration was analyzed studying the cellular (*C2C12-GFP* pre-myoblast) and bacterial (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *MRSA* strains) adhesion and proliferation.

In summary, it is concluded that coated substrates with HA, BG and SPEEK present good biomechanical properties (stiffness and yield strength), due to the substrate porosity is not modified. Nevertheless, etched substrates showed an important degradation of the mechanical behavior. In addition, all the surface treatments achieve a biofunctional system, promoting bone in-growth and improving osseointegration. Therefore, they can be considered as a solution in total/partial bone replacements.

Contenido

Lista de figuras	21
Lista de tablas.....	29
Glosario	33
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	35
1.1 Biomateriales	37
a) Tipos de biomateriales	42
b) Biomateriales metálicos.....	44
1.2 El titanio	48
1.3 Materiales metálicos porosos	49
1.4 Mejora de la osteointegración.....	53
1.4.1 Técnicas de modificación superficial del titanio	54
Métodos químicos	57
1.4.2 Materiales bioactivos	60
Hidroxiapatita (HA)	61
a) Características principales de la HA.....	61
b) Aplicaciones principales de la HA	74
c) Recubrimientos bioactivos HA.....	75
d) Técnicas de recubrimientos de HA.....	77
e) Combinaciones de HA con otros materiales.....	83
Vidrio bioactivo	85
a) Características principales de los vidrios bioactivos.....	85
b) Aplicaciones de los vidrios bioactivos	93
c) Formas de aplicación de los vidrios bioactivos.....	94
d) Técnicas de recubrimiento de vidrio bioactivo.....	96

e) Combinaciones de vidrio bioactivo con otros materiales	101
f) Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	104
1.4.3 Formas de combatir la proliferación microbiana	105
Capítulo 2: OBJETIVOS	111
2.1 Objetivo principal.....	113
2.2 Objetivos específicos	113
Capítulo 3: RESULTADOS	117
3.1. Disminución del apantallamiento de tensiones: sustratos de Titanio poroso obtenidos por rutas pulvimetalúrgicas.....	129
3.1.1 Caracterización microestructural de los sustratos porosos	130
3.1.2 Caracterización de la superficie de los sustratos y las paredes de los poros	136
3.1.3 Comportamiento macro y micro-mecánico.....	143
3.1.4 Resistencia al rayado y desgaste.....	148
3.1.5 Evaluación del comportamiento <i>In vitro</i>.....	156
<i>Cultivos celulares C2C12</i>	156
<i>Proliferación de cepas de bacterias (E. coli, MRSA y P. aeruginosa).....</i>	159
3.2. Mejora de la capacidad de osteointegración: tratamientos de modificación superficial.....	168
3.2.1 Modificación de la rugosidad y la textura superficial de los sustratos de titanio porosos: ataque químico por inmersión	168
<i>Caracterización microestructural de las superficies de los sustratos y las paredes de los poros: influencia de la técnica de ataque químico.....</i>	169
<i>Caracterización de la superficie de los sustratos y las paredes de los poros: influencia del ataque químico.....</i>	172
<i>Comportamiento macro-mecánico de los sustratos atacados por inmersión.....</i>	181

<i>Evaluación del comportamiento In vitro: Mejora del comportamiento celular de los sustratos atacados químicamente por inmersión</i>	183
3.2.2 Recubrimientos bioactivos	190
<i>Deposición de hidroxiapatita: Técnica de sol-gel</i>	191
<i>Caracterización de la superficie de los sustratos recubiertos con HA: Estudio de la composición, homogeneidad, rugosidad y grado de infiltración del recubrimiento</i>	191
<i>Comportamiento micro-mecánico de los sustratos recubiertos con HA: microdureza</i>	195
<i>Comportamiento tribomecánico de los sustratos recubiertos con HA: resistencia al rayado</i>	195
<i>Deposición de Bioglass: técnica de sedimentación por goteo</i>	200
<i>Caracterización de la superficie de los sustratos recubiertos con BG: morfología y topografía superficial del recubrimiento</i>	200
<i>Comportamiento micro y tribo-mecánico de los sustratos recubiertos con BG: Influencia del espesor, capacidad de infiltración y adherencia del recubrimiento (microdureza y resistencia al rayado)</i> . 210	
<i>Evaluación del comportamiento In vitro: Bioactividad del recubrimiento de BG en SBF e influencia del número de capas de BG</i>	218
3.2.3 Recubrimiento antibacteriano (SPEEK) de los sustratos porosos	223
<i>Estudio de la proliferación de MRSA sobre los sustratos recubiertos: mejora del comportamiento bactericida</i>	223
Capítulo 4: DISCUSIÓN DE RESULTADOS	227
4.1 Caracterización y validación de los sustratos de Titanio poroso fabricados por pulvimetalurgia para solventar el apantallamiento de tensiones	229

4.2 Evaluación de los tratamientos de modificación superficial para la mejora de la osteointegración	255
4.2.1 Ataque químico por inmersión: análisis de la topografía, la integridad estructural y la capacidad de adhesión celular.....	255
4.2.2. Recubrimientos cerámicos bioactivos	280
Viabilidad y efectividad del uso de la técnica de sol-gel como ruta para deposición de hidroxiapatita sobre sustratos porosos.....	280
Capacidad de la técnica de sedimentación por goteo para depositar recubrimientos de vidrios bioactivos: relación entre los parámetros del proceso y las propiedades de las capas de BG.....	290
4.2.3. Efecto del recubrimiento de SPEEK como agente antibacteriano	308
Capítulo 5: CONCLUSIONS	311
Bibliografía.....	319
COMPENDIO DE TRABAJOS.....	339

Lista de figuras

Figura 1. Esperanza de vida desde 1950 a 2065 [2]. 38

Figura 2. a) Pérdida de masa ósea [3] y b) pérdida de resistencia ósea [4] en función de la edad y del género. 39

Figura 3. Factores que influyen en la interacción de la intercara del implante con el tejido óseo para una correcta osteointegración [13]. 41

Figura 4. Clasificación de los biomateriales atendiendo a su interacción con el cuerpo humano y a su evolución [15]. 42

Figura 5. Principales biomateriales metálicos y sus aplicaciones clínicas [21]. 45

Figura 6. Fenómeno de apantallamiento de tensiones y consecuente reabsorción ósea [4]. 46

Figura 7. Crecimiento de tejido fibroso en un implante metálico poroso [27]. 47

Figura 8. Proceso de fabricación que emplea la técnica de espaciadores [61]. 53

Figura 9. Clasificación de los distintos métodos de modificación superficial encontrados en la literatura. 55

Figura 10. Esquema de los diferentes procesos durante el crecimiento del recubrimiento por CVD [96]. 60

Figura 11.: (a) Estructura atómica de la HA y (b) su proyección a lo largo del eje c [107]. .. 62

Figura 12. Estructura jerárquica del hueso [103]. 64

Figura 13. Estructura del diente [10]. 66

Figura 14. Imagen SEM de la HA con rango de tamaño de poro 250-400 μm [56]. 73

Figura 15. Influencia de la porosidad en la (a) tenacidad a fractura y (b) resistencia a tracción [10, 107]. 74

Figura 16. Vías de síntesis de sol-gel [1]. 78

Figura 17. Etapas del recubrimiento por inmersión (1) inmersión, (2) extracción y (3) secado [21, 22]. 82

Figura 18. Etapas de la deposición de recubrimiento por centrifugación. (1) deposición, (2) centrifugado, (3) escisión y (4) evaporación [5]. 83

Figura 19. Unidades estructurales básicas de SiO_4^- , constituidas por enlaces Si-O-Si. *NBO sin puentes de hidrógeno, BO con puentes de hidrógeno [146]. 85

Figura 20. Sección de una muestra maciza de vidrio bioactivo tras 2 semanas de inmersión en fluido fisiológico simulado (SBF): imagen SEM (izquierda) y su correspondiente microanálisis EDS (derecha) [20]. 87

Figura 21. Scaffold de vidrio bioactivo realizado mediante fabricación aditiva [152]. 90

Figura 22. Clasificación de los vidrios bioactivos según su bioactividad atendiendo al diagrama ternario de composición $\text{Na}_2\text{O}-\text{SiO}_2-\text{CaO}$ [153]. 91

Figura 23. Método de sol-gel [181]. 97

Figura 24. Difractogramas de a) vidrio 45S5 sinterizado a 1000 $^{\circ}\text{C}$ (25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) [183] y b) polvo de vidrio 45S5 en estado de recepción, sinterizado a 900 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 h y a 1000 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h [184]. En todos los vidrios sinterizados se identifica la fase cristalina de $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ 100

Lista de figuras

Figura 25. Micrografía SEM de PLLA (variación del PLA) con un 94% de porosidad, con 15% en volumen de Bioglass® 45S5 [152].	103
Figura 26. Clasificación de nano-partículas en función de su composición química [231].	108
Figura 27. Esquema de presentación de Resultados en esta Tesis doctoral.	120
Figura 28. Caracterización de los sustratos porosos de titanio fabricados para solventar el apantallamiento de tensiones (extraído del esquema de la Figura 27).	130
Figura 29. Curvas de compresibilidad del polvo de Ti c.p. y de las mezclas de éste con el hidrógeno carbonato de amonio (BA) de rangos de tamaño de espaciador de 100-200 μm y 250-355 μm : a) Para 0-1200 MPa; b) Detalle de la anterior para 600-1200 MPa.	131
Figura 30. Micrografías de los sustratos de titanio. a) sustrato denso, b) y c) sustratos porosos de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , respectivamente.	133
Figura 31. Distribuciones del D_{eq} de los poros, obtenidas por IA, de los sustratos de titanio a) denso y b) poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.	134
Figura 32. Distribución de tamaños de los poros. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) y reconstrucción en 3D de la tomografía de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador de a) 100-200 μm y b) 250-355 μm	136
Figura 33. Micrografías SEM de la superficie y del interior de un poro de los sustratos porosos de titanio para diferente rango de tamaño de partícula de espaciador: a y c) 100-200 μm , b y d) 250-355 μm	138
Figura 34. Distribución de Rug_{vol} (%) y corte transversal 2D de la tomografía de los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm	140
Figura 35. Imágenes 2 1/2 D de microscopía confocal láser de la superficie de los sustratos denso y porosos de titanio con diferente rango de tamaño de partícula de espaciador: a) denso, b) 100-200 μm y c) 250-355 μm . En estas imágenes se emplea una escala de colores para representar el relieve.	141
Figura 36. Imágenes 3D de microscopía confocal láser de la superficie de los sustratos denso y porosos de titanio con diferente rango de tamaño de espaciador: a) denso, b) 100-200 μm y c) 250-355 μm	142
Figura 37. Curvas tensión (σ)-deformación (ϵ) obtenidas por el ensayo de compresión para los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm . Ensayo realizado bajo la norma ASTM E9-09 [244].	144
Figura 38. Curvas P-h para el sustrato denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.	147
Figura 39. Esquema de las curvas P-h tras el ensayo de micro-indentación instrumentada para cada sustrato.	147
Figura 40. Perfil topográfico de los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm para la pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).	149
Figura 41. Recuperación elástica de los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm durante y tras el rayado (penetración permanente).	151
Figura 42. Imágenes SEM del surco generado en el ensayo de rayado para las muestras densa a) 120X, b) 500X y porosa de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador c) 120X, d) 500X.	152

Lista de figuras

- Figura 43. Coeficiente de fricción (izquierda) y profundidad del surco-LVDT en mm (derecha) en función de la distancia recorrida en m para los sustratos denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de espaciador..... 153
- Figura 44. Micrografías de la superficie de los sustratos tras el ensayo de desgaste por OM: a) denso y c) poroso de 100-200 μm , así como, con más detalle, por microscopía confocal para los sustratos: b) denso y d) poroso de 100-200 μm 155
- Figura 45. Adhesión celular C2C12-GFP sobre los sustratos denso y porosos de rango de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm tras 24 h de cultivo. Viabilidad e imágenes obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia. 157
- Figura 46. Proliferación celular C2C12-GFP sobre los sustratos denso y porosos de rango de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm tras 4, 7 y 10 días de cultivo. Viabilidad e imágenes obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia..... 158
- Figura 47. Macrografías de la proliferación de *E. coli* sobre los diferentes sustratos de titanio: Denso, 100-200 μm y 250-355 μm (Protocolo P1, Concentración 1). 160
- Figura 48. Unidades de formación de colonias de *E. coli* tras la filtración por membrana (Protocolo P1)..... 161
- Figura 49. Unidades de formación de colonias de *E. coli* en el interior de los poros de los sustratos porosos por filtración por membrana (Protocolo P3): a) valores absolutos; b) valores normalizados (se ha superpuesto una gráfica en otra dada la fuerte diferencia entre los valores de UFC, de dos órdenes, entre concentración 1 y la 2). 162
- Figura 50. Macrografías de la proliferación de *P. aeruginosa* (método 2), para las tres diluciones estudiadas (0, -1 y -2), sobre los diferentes sustratos de titanio: a) denso, b) 100-200 μm y c) 250-355 μm 163
- Figura 51. Unidades de formación de colonias de *P. aeruginosa* a dilución -1 tras el cultivo sobre los sustratos de titanio denso y porosos en valor a) absoluto y b) normalizado por la superficie total de la muestra..... 164
- Figura 52. Macrografías de la proliferación de MRSA (método 2) para las tres diluciones estudiadas (0, -1 y .2) sobre los sustratos de titanio: a) denso, y porosos de b) 100-200 μm y c) 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador. 165
- Figura 53. Ensayo de bacterias vivas/muertas para la cepa MRSA a concentración inicial de 10^4 UFC/ml (dilución 0) en los sustratos de titanio a) denso, y porosos de rango de tamaño de espaciador b) 100-200 μm y c) 250-355 μm 166
- Figura 54. Unidades de formación de colonias de MRSA a dilución -1 tras el cultivo sobre los sustratos de titanio denso y porosos en valor a) absoluto y b) normalizado por la superficie total de la muestra. 167
- Figura 55. Extracto del esquema de la Figura 27. Técnicas y caracterización estudiadas para la mejora de la osteointegración por la vía de modificación de la rugosidad y la textura de la superficie mediante ataque químico..... 169
- Figura 56. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm atacados químicamente por inmersión a 125 s. 172
- Figura 57. Imágenes SEM del sustrato de titanio denso atacado por inmersión: a) 0 s, b) 125 s y c) 625 s. 173
- Figura 58. Imágenes SEM de los sustratos de titanio atacados por inmersión de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para a) 0 s, b) 125 s y c) 625 s y de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para d) 0 s, e) 125 s y f) 625 s. 173
- Figura 59. Imágenes SEM del interior de los poros de los sustratos de titanio atacados por inmersión de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para a) 125 s y b)

Lista de figuras

625 s y de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para c) 125 s y d) 625 s.	174
Figura 60. Distribución de la rugosidad volumétrica (%) de los sustratos porosos de titanio atacados químicamente por inmersión a 125 s con tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm	176
Figura 61. Imágenes de microscopía confocal 2½ D de los sustratos de titanio atacados por inmersión: denso a a) 125 s y b) 625 s, poroso de 100-200 μm a c) 125 s y d) 625 s y poroso de 250-355 μm a e) 125 s y f) 625 s.	177
Figura 62. Imágenes 3D de microscopía confocal del sustrato de titanio denso atacado por inmersión; a) 125 s y b) 625 s.	178
Figura 63. Imágenes 3D de microscopía confocal del ataque por inmersión de los sustratos porosos de titanio de 100-200 μm : a) 125 s y b) 625 s; sustratos porosos de 250-355 μm : d) 125 s y e) 625 s.	179
Figura 64. Curvas tensión (σ) - deformación (ε) obtenidas por el ensayo de compresión para los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , atacados por inmersión a 125 y 625 s. Ensayo realizado bajo la norma ASTM E9-09 [244].	182
Figura 65. Adhesión celular a los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s, respectivamente, tras 24 h de cultivo.	184
Figura 66. Proliferación celular a los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s, respectivamente, tras 4 días de cultivo.	185
Figura 67. Proliferación celular a los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s respectivamente, tras 7 días de cultivo.	186
Figura 68. Proliferación celular tras 10 días de cultivo en los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s, respectivamente.....	187
Figura 69. Imágenes de adhesión celular tras 24 h obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia de los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.	188
Figura 70. Imágenes de proliferación celular tras 7 días obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia para los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.	189
Figura 71. Extracto del esquema de la Figura 27. Etapas seguidas para la mejora de la osteointegración por la vía de recubrimientos bioactivos.	191
Figura 72. Espectros de EDX de la superficie del recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm	192
Figura 73. Espectro FTIR de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.	192
Figura 74. Diagrama XRD de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.	193

Figura 75. Micrografías SEM de la superficie e Imágenes 3D de microscopía confocal láser de la topografía del recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm (a y b) y 250-355 μm (c y d), respectivamente. 194

Figura 76. Penetración real del ensayo de rayado a carga incremental de 0 a 25 N de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel. 196

Figura 77. Ensayo de rayado con 3 N y 2.5 mm de recorrido. Perfil topográfico de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente). 197

Figura 78. Recuperación elástica de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel durante y tras el rayado (penetración permanente). 199

Figura 79. Apariencia macroscópica de los sustratos de titanio recubiertos antes (1, 2 y 3 capas) y después (3 capas) del tratamiento térmico (diámetro de las muestras de 12 mm). 201

Figura 80. Micrografía SEM de un corte transversal del sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, recubierto con 3 capas de BG, tras el proceso de sinterizado (arriba). Espectros de EDX de las distintas zonas del sistema sustrato-recubrimiento (abajo). 202

Figura 81. Espectro XRD de a) las partículas de BG en estado de recepción (antes de ser sinterizado) y b) del BG tras el proceso de sinterizado. Transición de un estado amorfo a un estado cristalino. 203

Figura 82. Micrografías SEM del sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el recubrimiento de BG de 3 capas, a menor y mayor aumento, respectivamente de: a), b) zona plana del sustrato y c), d) presencia de poros. 204

Figura 83. Micrografías SEM del sustrato poroso de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el recubrimiento de BG de 3 capas, a menor y mayor aumento, respectivamente de: a), b) zona plana del sustrato y c), d) presencia de poros. 205

Figura 84. Micrografías SEM del sustrato denso tras el recubrimiento de BG de 3 capas, a menor y mayor aumento: a) y b) zona del sustrato con buena adhesión; c) y d) zona del sustrato con adhesión deficiente. 206

Figura 85. Esquema de la vista cenital y de la sección transversal de un sustrato poroso de titanio recubierto con BG (parte superior de la figura). Micrografías SEM de la sección transversal de los sustratos denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, respectivamente, tras el recubrimiento de BG de 3 capas (parte inferior de la figura). Imagen insertada: detalle del fenómeno de desconche en el sustrato denso de titanio recubierto. 207

Figura 86. Imágenes 3D de microscopía confocal láser de la topografía del recubrimiento con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm , respectivamente. 208

Figura 87. Carga aplicada frente a profundidad de penetración (curva P-h) sobre: a) sustrato denso de titanio y b) sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, sin y con recubrimiento de 1 y 3 capas, así como del compacto de BG una vez ha sido sinterizado. 211

Figura 88. Carga aplicada frente a profundidad de penetración de una muestra de BG denso y de varios sistemas de sustrato de titanio-recubrimiento con 3 capas de BG. Influencia del tipo de sustrato en las gráficas P-h. 213

Lista de figuras

- Figura 89. Perfil topográfico de los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente). 215
- Figura 90. Recuperación elástica de los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo durante y tras el rayado (penetración permanente). 217
- Figura 91. Espectros de EDX de la HA sobre el recubrimiento de BG y relación correspondiente Ca/P de los sustratos poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , recubiertos con a) 1 y b) 3 capas de BG, y c) denso recubierto con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo respectivamente, tras ser sumergidos en SBF durante 21 días. 219
- Figura 92. Difractogramas de: A. sustrato poroso de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador, recubierta con 1 capa de BG y tras la inmersión durante 21 días en SBF, B. sustrato poroso de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador, recubierto con 3 capas de BG y tras la inmersión durante 21 días en SBF; C sustrato denso, recubierto con 3 capas de BG y tras la inmersión durante 21 días en SBF. 221
- Figura 93. Micrografías de la HA formada tras 21 días en SBF sobre los sustratos recubiertos con 1 capa de BG: a) denso, c) 100-200 μm ; e) 250-355 μm . Con 3 capas de BG: b) denso, d) 100-200 μm y f) 250-355 μm 222
- Figura 94. Extracto del esquema de la Figura 27. Etapas seguidas para la mejora de la osteointegración por la vía de recubrimientos antibacterianos. 223
- Figura 95. Micrografías SEM de la topografía de los sustratos de titanio: a) y b) denso y c) y d) con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm 224
- Figura 96. Macrografías de la proliferación de MRSA sobre los sustratos de titanio: a) denso y porosos de b) 100-200 μm y c) 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador recubiertos con SPEEK. 225
- Figura 97. Micrografías SEM del sustrato de titanio poroso con tamaño de espaciador 100-200 μm : a) interior de un poro (500X), b) patrón de rugosidad del interior del poro (4000X). 237
- Figura 98. Reconstrucción 3D del volumen de un poro a partir del volumen erosionado y suavizado (escala común). a) volumen real del poro, reconstruido por triangulación, b) volumen suavizado con filtro gaussiano, c) diferencia de volúmenes anteriores. 238
- Figura 99. Diagrama comparativo de módulos de Young frente a P_T de los resultados de la presente tesis doctoral y de trabajos previos [36, 52]. 243
- Figura 100. Esquema de la influencia de la carga de micro-indentación Vickers y del tamaño de poro en los sustratos porosos. 245
- Figura 101. Huellas a carga a) HV0.3, b) HV1 para el sustrato denso y c) HV0.3, d) HV1 para el sustrato poroso de rango de tamaño de espaciador 100-200 μm 246
- Figura 102. a) y d) macrografías, b) y e) collage de OM, y c) y f) imágenes SEM de una sección del surco de las muestras densa y porosa de de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , respectivamente, tras el ensayo de desgaste. 248
- Figura 103. Mecanismos de fricción en función de la tasa normalizada [255]. 250
- Figura 104. Micrografías SEM de la adhesión de osteoblastos a sustratos de titanio fabricados por: a) Mecanizado convencional, b) superficie especular, c) loose sintering, d) técnica de espaciadores [53]. 251
- Figura 105. Porosidad total por el método de Arquímedes para los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm , antes (0 s) y tras el ataque por inmersión a 125 y 625 s. 256

Lista de figuras

Figura 106. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.	259
Figura 107. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador 250-355 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.	260
Figura 108. Imágenes SEM de la muestra porosa de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el ataque por inmersión a 125 s. a) formas geométricas de la parte plana a menores aumentos, b) interior de las formas geométricas de la parte plana a mayores aumentos, c) pared de uno de los poros de la muestra a menores aumentos y d) pared de uno de los poros a mayores aumentos.	262
Figura 109. Interior de un poro de la muestra de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador que presenta formas geométricas tras el ataque por inmersión a 625 s: a) Pared del poro a menores aumentos y b) pared del poro a mayores aumentos.	263
Figura 110. Distribución de la rugosidad volumétrica (%) para el sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.	264
Figura 111. Distribución de la rugosidad volumétrica (%) para el sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 250-355 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.	265
Figura 112. Imágenes de microscopía confocal $2\frac{1}{2} D$ de los sustratos de titanio poroso de 250-355 μm : a) virgen, y atacados por inmersión: b) 125 s y c) 625 s.	267
Figura 113. Curvas tensión (σ) - deformación (ϵ) obtenidas por el ensayo de compresión para los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , vírgenes y atacados por inmersión a 125 y 625 s. Ensayo realizado bajo la norma ASTM E9-09 [244].	271
Figura 114. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre el sustrato denso virgen, y atacados por inmersión a 125 s y a 625 s respectivamente.	275
Figura 115. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre el sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador virgen, y atacados por inmersión a 125 s y a 625 s respectivamente.	275
Figura 116. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre el sustrato poroso de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador virgen, y atacados por inmersión a 125 s y a 625 s respectivamente.	276
Figura 117. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm vírgenes.	278
Figura 118. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm atacados por inmersión a 125 s.	279
Figura 119. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm atacados por inmersión a 625 s.	279
Figura 120. Micrografía SEM de la superficie del recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 250-355 μm	283

Lista de figuras

- Figura 121. Micrografía SEM del corte transversal del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm recubierto con HA mediante la técnica de sol-gel a gran aumento..... 284
- Figura 122. Penetración permanente de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel. 288
- Figura 123. Espectro XRD del sustrato poroso de 100-200 de rango de tamaño de partícula de espaciador, recubierto con 3 capas de BG, sometidos al proceso de sinterizado (820 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 s), tras la deposición del recubrimiento en a) un horno de molibdeno y b) un horno de tubo cerámico. 293
- Figura 124. Micrografía SEM de las grietas formadas sobre el sustrato denso tras el recubrimiento de BG de 3 capas. 294
- Figura 125. Micrografías SEM de la sección transversal de sustratos porosos de a) y b) 100-200 μm ; c) y d) 355-500 μm , de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el recubrimiento de BG de 3 capas. Ambos con una porosidad del 30 % en volumen. Infiltración de las partículas de BG en los poros del sustrato. 295
- Figura 126. Penetración permanente en el surco del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , sin recubrir y recubierto con: 1) HA mediante la técnica de sol-gel y 2) 3 capas de BG mediante la técnica de goteo, tras el ensayo de rayado. 301
- Figura 127. Micrografías SEM de la HA para el sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , recubierto con: a) HA mediante la técnica de sol-gel y b) 3 capas de BG mediante la técnica de goteo tras la inmersión durante 21 días en SBF. 306
- Figura 128. Micrografías SEM de HA de distintas procedencias: a) humana, b) sintética, c) del recubrimiento de HA de los sustratos de titanio obtenido por la técnica de sol-gel y d) HA formada a partir de la inmersión de los sustratos de titanio recubiertos con BG en SBF durante 21 días..... 307

Lista de tablas

Tabla 1. Características de los distintos tipos de biomateriales y su uso en aplicaciones clínicas [19]..... 43

Tabla 2. Propiedades mecánicas del hueso y de algunos metales empleados para su sustitución..... 47

Tabla 3. Clasificación de las técnicas para la obtención de materiales metálicos porosos, en función del estado del material de partida. Nota: Todas las referencias de esta Tabla se encuentran en la Tesis Doctoral de P. Trueba [51]..... 51

Tabla 4. Propiedades mecánicas del hueso cortical [10]..... 65

Tabla 5. Propiedades mecánicas del diente [10] 67

Tabla 6. Intervalos de tamaño de poro para HA natural de distintos orígenes [112]..... 68

Tabla 7. Composición química de la fase inorgánica del hueso, el esmalte, la dentina y la HA- 200 [110]..... 69

Tabla 8. Propiedades mecánicas de la HA densa [10, 107]. 72

Tabla 9. Propiedades mecánicas de la HA sintética tras el proceso de sinterizado a diferentes temperaturas [111]. 72

Tabla 10. Comparación entre las propiedades mecánicas de la HA densa y la HA porosa [10, 107]..... 73

Tabla 11. Propiedades mecánicas del Bioglass® 45S5 [150]. 88

Tabla 12. Composición en peso de vidrios bioactivos [148, 156, 161]. 93

Tabla 13. Concentración de iones en el plasma sanguíneo y en SBF [199]. 105

Tabla 14. Aplicación de las técnicas empleadas en la caracterización de sustratos y recubrimientos fabricados en la presente Tesis Doctoral. 128

Tabla 15. Porosidad total e interconectada por el método de Arquímedes de los sustratos denso y porosos de titanio de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador tras el proceso de sinterizado. 132

Tabla 16. P_T , D_{eq} y F_f de los poros por la técnica de IA. 133

Tabla 17. Parámetros obtenidos por micro-CT de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm 135

Tabla 18. Área estimada (A_F , A_P y A_T) de los sustratos porosos a partir de los datos obtenidos por micro-CT..... 138

Tabla 19. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z) obtenidos por microscopía confocal láser de las superficies de los macro-poros y la matriz de Ti en función del contenido y rango de tamaño de espaciador. 143

Tabla 20. Propiedades mecánicas de las muestras densa y porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm . E_d : módulo de Young dinámico obtenido por la técnica de ultrasonidos. E_c y σ_y : módulo de Young corregido y límite de fluencia, respectivamente, calculados por la norma convencional ASTM E9-09 [244]. 145

Tabla 21. Micro-dureza Vickers para cargas HV0.3 y HV1 sobre los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador. 146

Tabla 22. Parámetros principales de las curvas P-h del ensayo de micro-indentación instrumentada de los sustratos denso y poroso de tamaño de espaciador 100-200 μm

Lista de tablas

virgenes: A (carga máxima del ensayo), B (penetración máxima), C (penetración permanente), B-A (fluencia o creep a carga constante), (B-C)/B (recuperación elástica). 148

Tabla 23. Parámetros de rugosidad de la topografía de los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm para la pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente). 150

Tabla 24. V_m , RE, Máx y Mín, y Δ máx y Δ mín de los valores máximo y mínimo de penetración para los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm durante y tras el rayado (penetración permanente). 151

Tabla 25. Parámetros principales del ensayo de desgaste para la muestra densa y la muestra porosa de 100-200 μm de rango de tamaño de espaciador: Δm , ΔV , w , K_{abs} y K 155

Tabla 26. Porosidad total e interconectada por el método de Arquímedes de los sustratos denso y porosos de titanio de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s. 170

Tabla 27. Parámetros obtenidos por micro-CT para los sustratos porosos de titanio, atacados químicamente por inmersión a 125 s y de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm 171

Tabla 28. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z), obtenidos por microscopía confocal láser, de la superficie de la matriz de Ti (plana) y del interior de los poros (porosa) en función del tipo de sustrato y del tiempo de ataque. 180

Tabla 29. Propiedades mecánicas de las muestras porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , atacadas químicamente por inmersión a 125 y 625 s. Límite de fluencia (σ_y), calculado por la norma convencional ASTM E9-9. 183

Tabla 30. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z) obtenidos por microscopía confocal láser de las superficies recubiertas por HA de los sustratos porosos de Ti en función del tamaño de espaciador. 194

Tabla 31. Valores de microdureza Vickers para cargas HV0.3 y HV1 sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel. 195

Tabla 32. Parámetros de rugosidad de la topografía de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente). 198

Tabla 33. V_m , RE, Máx y Mín, y Δ máx y Δ mín de los valores máximo y mínimo de penetración para los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel durante y tras el rayado (penetración permanente). 199

Tabla 34. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z) obtenidos por microscopía confocal láser de las superficies recubiertas por 3 capas de BG de los sustratos porosos de Ti en función del tamaño de espaciador y de la zona del sustrato. 209

Tabla 35. Parámetros principales de las curvas P-h del ensayo de micro-indentación instrumentada de los sustratos denso y poroso de tamaño de espaciador 100-200 μm , sin y con recubrimiento de BG: A (carga máxima del ensayo), B (penetración máxima), C (penetración permanente), B-A (fluencia o creep a carga constante), (B-C)/B (Recuperación elástica). 212

Tabla 36. Parámetros principales de las curvas P-h del ensayo de micro-indentación instrumentada, con carga máxima de 1 N, de una muestra de BG denso y diferentes sistemas recubrimiento de BG-sustrato de titanio (denso y porosos de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm), sin y con recubrimiento de BG: A (carga máxima del ensayo), B (penetración

máxima), C (penetración permanente), B-A (fluencia o creep a carga constante), (B-C)/B (Recuperación elástica).....	214
Tabla 37. Parámetros de rugosidad de la topografía de los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).	216
Tabla 38. V_m , RE, Máx y Mín, y Δ máx y Δ mín de los valores máximo y mínimo de penetración para los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo durante y tras el rayado (penetración permanente).	217
Tabla 39. Concentraciones de los iones principales en la solución de referencia de SBF y en las soluciones correspondientes a las muestras de titanio densa de 3 capas y porosa de 100-200 μm con 1 capa y 3 capas de BG depositado mediante la técnica de goteo, tras su inmersión durante 21 días, analizadas por ICP.	220
Tabla 40. Comparación de porosidades y morfología de los poros tras el proceso de sinterizado a partir de las distintas técnicas de caracterización microestructural utilizadas	235
Tabla 41. Área estimada (A_F , A_P y A_T) de los sustratos porosos a partir de los datos obtenidos por micro-CT.....	239
Tabla 42. ΔP_T (%) de los sustratos denso y porosos de ambos tamaños de partícula de espaciador, atacados a 125 y 625 s por inmersión, con respecto a sus análogos vírgenes por el método de Arquímedes.	257
Tabla 43. ΔP_T (%) y ΔD_{eq} (%) de los sustratos porosos de ambos tamaños de partícula de espaciador, atacados a 125 s por inmersión, con respecto a sus análogos vírgenes por micro-CT.....	257
Tabla 44. FWHM y Desviación Típica de las distribuciones de D_{eq} de los sustratos porosos antes y después del ataque a 125 s.....	260
Tabla 45. Parámetros de rugosidad S_a obtenido por microscopía confocal láser de las superficies de los macro-poros y la matriz de Ti en función del contenido y rango de tamaño de espaciador, antes y tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.	269
Tabla 46. Comparación del límite de fluencia de las muestras porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , antes y tras ser atacadas químicamente por inmersión a 125 y 625 s. Límite de fluencia (σ_y) calculado por la norma convencional ASTM E9-9.	272
Tabla 47. Parámetro de rugosidad S_a , obtenido por microscopía confocal láser de las superficies vírgenes y recubiertas por HA de los sustratos porosos de Ti, en función del tamaño de espaciador y la zona estudiada.....	285
Tabla 48. Valores de microdureza Vickers para cargas HV0.3 y HV1 sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, vírgenes y recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.	286
Tabla 49. Comparación de los parámetros de rugosidad de la topografía, valor medio de penetración permanente y recuperación elástica (RE) del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm	289
Tabla 50. Comparación de rugosidad aritmética S_a (μm), obtenida a partir de la microscopía confocal láser, entre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, sin recubrir y recubiertos con 3 capas de BG.	296
Tabla 51. Comparación de parámetros de rugosidad de la topografía en la etapa de pre-palpación, valor medio de penetración permanente y recuperación elástica (RE) del sustrato	

Lista de tablas

poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , sin recubrir y recubiertos con: 1) HA mediante la técnica de sol-gel y 2) 3 capas de BG mediante la técnica de goteo, tras el ensayo de rayado. 300

Glosario

BG	Vidrio bioactivo
cp	Comercialmente puro
EDX	Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva
FTIR	Espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HV	Dureza Vickers
IA	Análisis de Imagen
ICP-MS	Espectrometría atómica de masas
Micro-CT	Micro-tomografía computarizada
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
PEEK	Poli-éter-éter-cetona
SBF	Fluido corporal simulado
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPEEK	Poli-éter-éter-cetona sulfonado
TEC	Coefficiente de dilatación térmica
UFC	Unidades de formación de colonias
UFR	Unidades de fluorescencia relativa
US	Ensayo de Ultrasonidos
XRD	Difracción de rayos X

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biomateriales

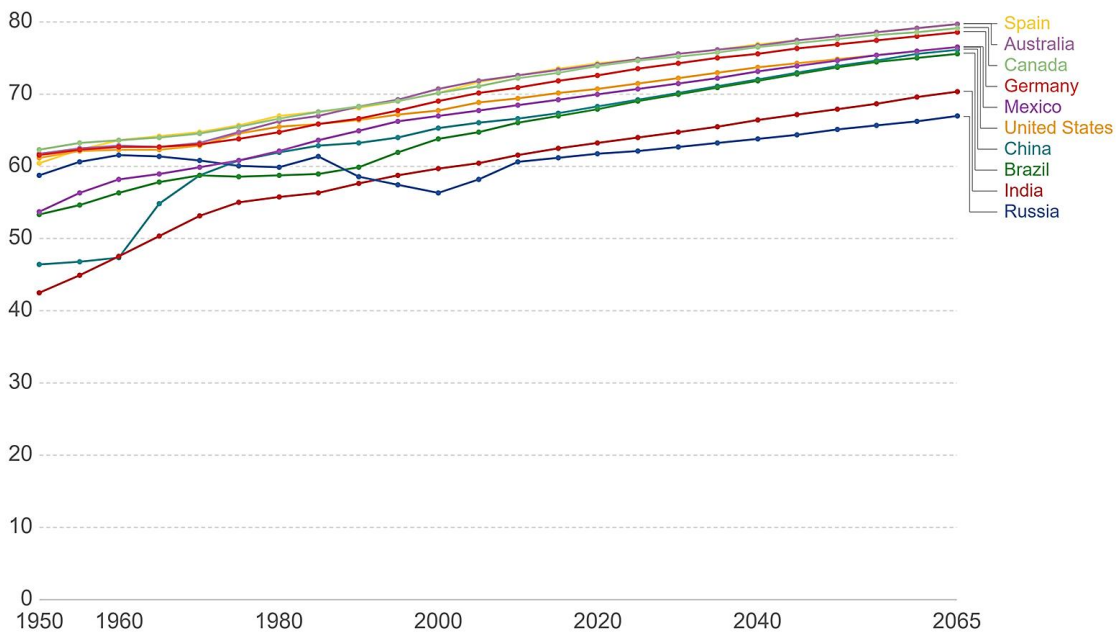
Las enfermedades degenerativas, consecuencia del reciente aumento de la esperanza de vida, así como el incremento del número de lesiones, propias de una vida más activa, son considerados una de las principales causas en el desarrollo de nuevos materiales y tratamientos enfocados al reemplazo de tejidos, contribuyendo a su vez al despliegue de la ciencia y la ingeniería [1].

El aumento de la esperanza de vida, entre otros motivos, se ve favorecido por el avance de la medicina, mejorando el tratamiento de enfermedades que presentan un alto índice de mortalidad. En la Figura 1 se muestra el gran crecimiento de la esperanza de vida que ha experimentado la población en las últimas décadas, así como el que se estima desde la actualidad hasta el año 2065. En concreto, se observa que España prevé un aumento de la esperanza de vida de unos 20 años.

Capítulo 1

Life expectancy at age 10

Shown is the number of remaining years a 10 year old is expected to live. From 2015 onwards the UN mid-variant projections are shown.



Source: United Nations Population Division and Human Mortality Database (2015)

OurWorldInData.org/life-expectancy/ • CC BY

Figura 1. Esperanza de vida desde 1950 a 2065 [2].

Sin embargo, el aumento de esperanza de vida conlleva un envejecimiento de la población, y como consecuencia, la pérdida de densidad y resistencia ósea (Figura 2). Estas propiedades resultan ser máximas en torno a los 30-40 años, disminuyendo de manera más rápida para el caso de las mujeres que para los hombres como consecuencia de la menopausia. La pérdida de masa y resistencia ósea implica una mayor probabilidad de fractura del hueso, y por tanto, un aumento de la demanda de implantes.

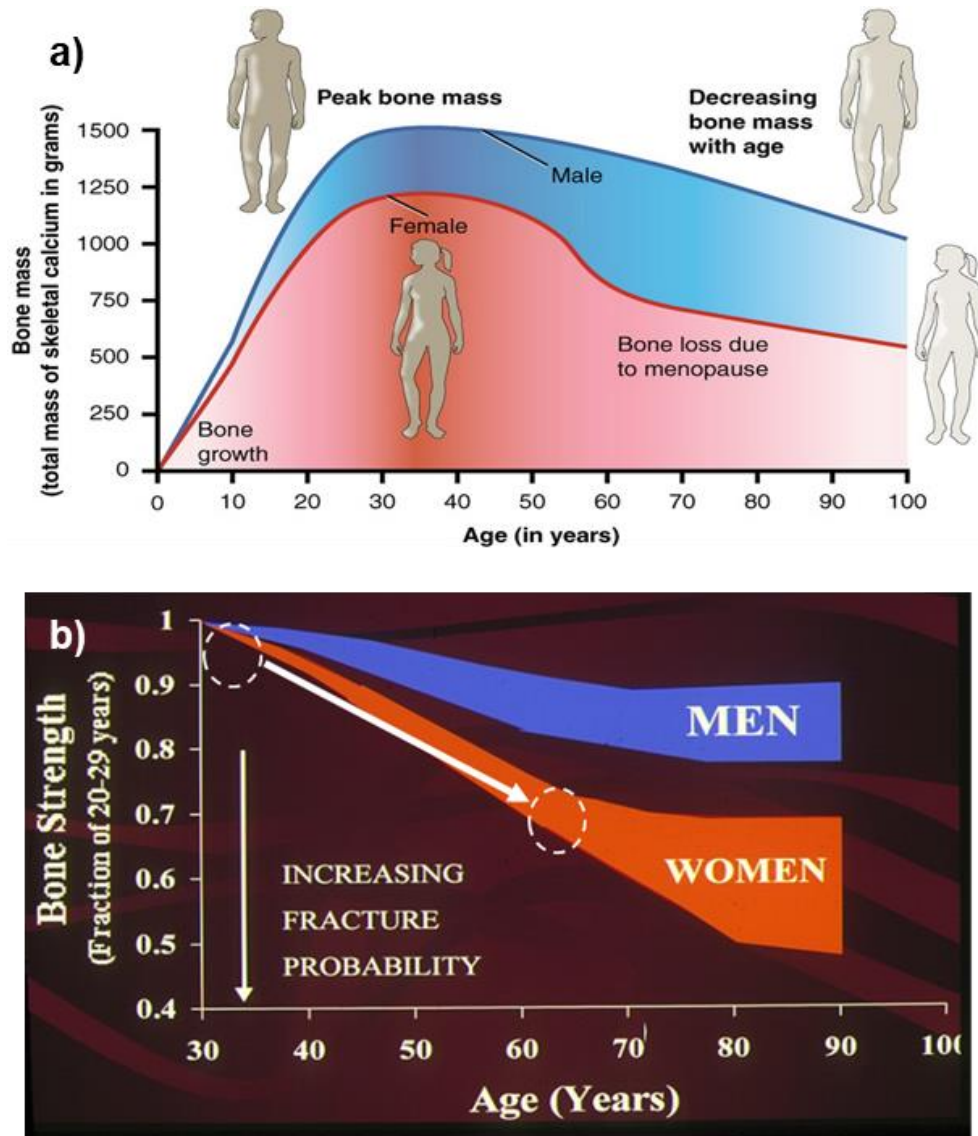


Figura 2. a) Pérdida de masa ósea [3] y b) pérdida de resistencia ósea [4] en función de la edad y del género.

La creciente demanda de materiales sintéticos, capaces de suplir las necesidades actuales en el campo de la medicina, conlleva el aporte de nuevos enfoques y métodos de síntesis que garanticen tanto la duración como la funcionalidad en el cuerpo humano. En este contexto, los biomateriales deben poseer unas características tanto mecánicas como biológicas adecuadas [5]. Han de ser biocompatibles, es decir, capaces de actuar de manera adecuada y con una correcta respuesta por parte del hueso huésped bajo circunstancias determinadas

Capítulo 1

[6, 7]. Idealmente, debe ser lo más similar posible al hueso en términos estructurales y biológicos, así como no tóxico y bioinerte. Además, el avance de los últimos años ha posibilitado la presencia de otras propiedades como son la bioactividad, la cual permite una unión interfacial entre hueso y material, la habilidad de biodegradarse y la capacidad de liberar medicamentos que reduzcan la inflamación y el riesgo de aparición de infecciones tras la implantación [7-10].

El hueso se caracteriza por ser un sistema de remodelación constante, es decir, un sistema dinámico. Los osteoblastos y osteoclastos son las células encargadas de mantener un equilibrio entre la degradación del “hueso viejo” y la sintetización del “hueso nuevo”. En este sentido, el diseño y elección del biomaterial han de estar estrechamente ligados con la función que va a desempeñar (soporte, sustitución o relleno) [11]. Ciertas variables, como la porosidad y la rugosidad superficial permiten, además de conferir propiedades mecánicas parecidas a las del hueso, facilitar la adhesión de éste al implante. En este sentido, se hace imprescindible que el biomaterial no cause ninguna reacción inmunológica o inflamatoria (capacidad bioinerte). Sin embargo, la adhesión no es suficiente, sino que interesa que el hueso se integre en el mismo, fenómeno conocido como osteointegración. La osteointegración se define como el proceso donde se consigue y mantiene la fijación rígida clínicamente asintomática de los materiales aloplásticos durante la carga funcional [12]. La capacidad bioactiva, por su parte, es una propiedad que promueve la osteointegración del hueso al material.

La correcta osteointegración depende, entre otros factores, de la intercara entre el hueso y el implante (Figura 3).

Biointerfaces and Tissue Repair

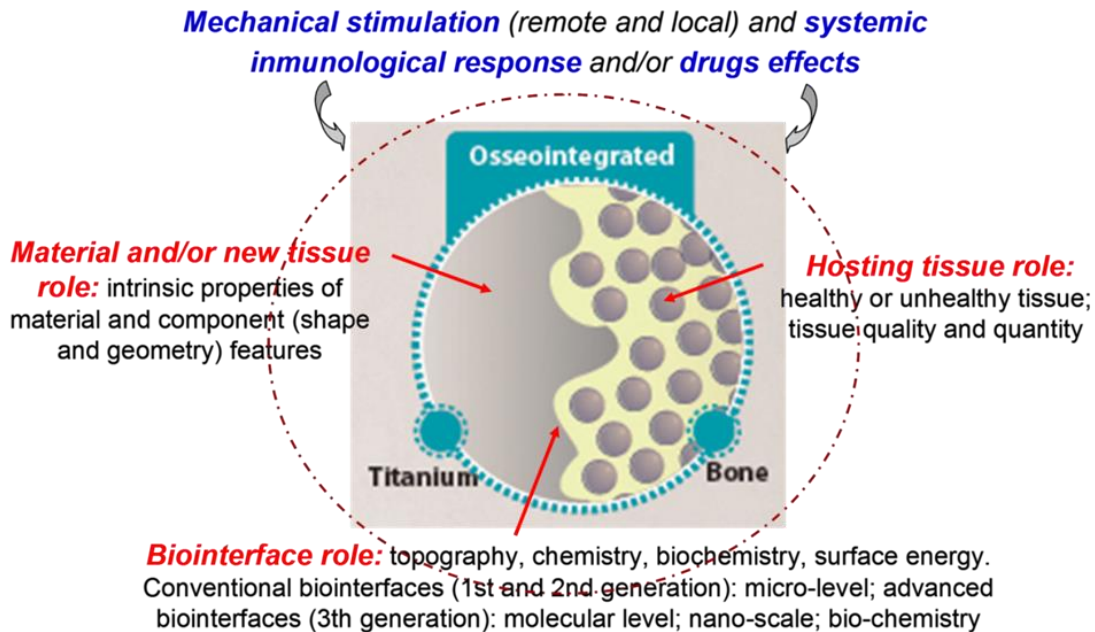


Figura 3. Factores que influyen en la interacción de la intercara del implante con el tejido óseo para una correcta osteointegración [13].

Los factores más relevantes para la osteointegración y la osteogénesis (formación de nuevo tejido óseo), son [6, 13]:

- El módulo de elasticidad, dureza, tenacidad a fractura, resistencia a fatiga, desgaste y comportamiento a la corrosión. Estos parámetros están relacionados con las propiedades y geometría del material y de su superficie.
- Las propiedades químicas y bioquímicas en cuanto a la interacción celular con la superficie externa del material (comprendiendo hasta una profundidad de hasta 10 nm).
- La topografía superficial del material, donde una rugosidad superficial moderada implica una mejor respuesta del tejido óseo.
- Las propiedades que promueven la adhesión celular, tales como la energía superficial y humectación (superficies hidrofílicas), así como la calidad y cantidad del tejido óseo circundante.

Capítulo 1

- La estimulación mecánica del sistema hueso-implante, así como la respuesta inmunológica del cuerpo humano y los efectos, en su caso, de fármacos.

a) Tipos de biomateriales

Existen varias clasificaciones de biomateriales, basadas en propiedades tales como su interacción con el cuerpo humano, su composición química, evolución, etc.

En cuanto a la interacción que presenten con el cuerpo humano, los biomateriales pueden clasificarse en bioinertes, bioactivos y bioabsorbibles o biodegradables [14]. Dentro de esta diferenciación, además pueden agruparse según su evolución, conllevando así a una nueva y detallada clasificación (Figura 4). Aparecen así los materiales de 4ª generación, llamados biomiméticos [15].

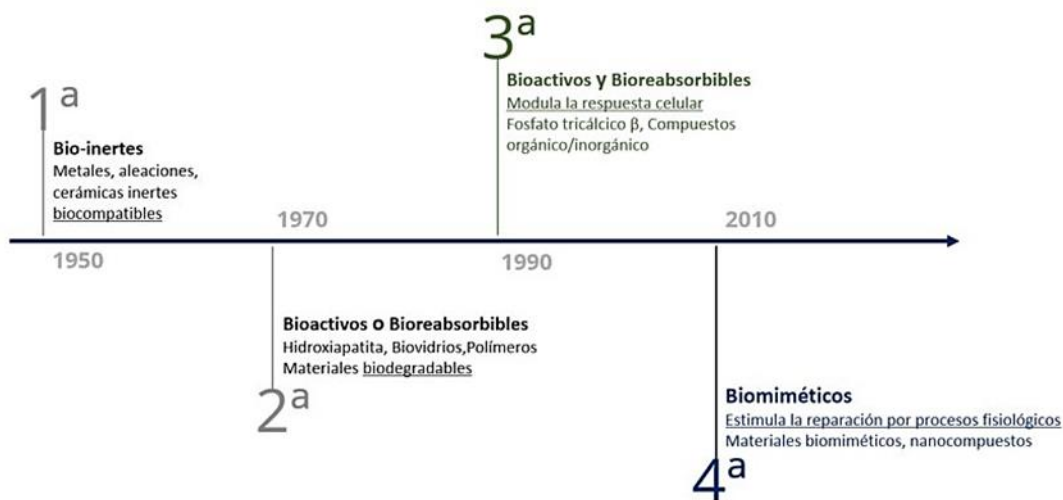


Figura 4. Clasificación de los biomateriales atendiendo a su interacción con el cuerpo humano y a su evolución [15].

Los **materiales bioinertes** no muestran ningún tipo de reacción con las células o los tejidos vivos. Sin embargo, en general, son encapsulados por un tejido fibroso de espesor variable tras su implantación en el cuerpo humano.

La **bioactividad** es una propiedad que presentan ciertos biomateriales en la que, al contrario que los bioinertes, interaccionan con el tejido circundante, induciendo una reacción específica y positiva para el material implantado [16].

Los **materiales bioabsorbibles**, por su parte, se caracterizan por mostrar una capacidad de degradación progresiva al mismo tiempo que el tejido nuevo se regenera.

Los **materiales biomiméticos** son los llamados también inteligentes, ya que su objetivo principal es el de reproducir o imitar tanto la topografía como la estructura ósea, así como el de otros materiales existentes en la naturaleza. Destacan por promover procesos fisiológicos que permiten la remodelación ósea [17].

Atendiendo a su composición química, los biomateriales pueden clasificarse en cuatro grupos principales: poliméricos, cerámicos, metálicos y materiales compuestos [18].

Tabla 1. Características de los distintos tipos de biomateriales y su uso en aplicaciones clínicas [19].

Material	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
POLÍMEROS	Elásticos, fáciles de fabricar, baja densidad.	Baja resistencia mecánica, degradación con el tiempo.	Suturas, arterias, venas, nariz, dientes, tendones ...
METALES	Resistencia a esfuerzos de alto impacto, alta resistencia al desgaste.	Baja compatibilidad, corrosión en medios fisiológicos, alta densidad, pérdida de propiedades mecánicas con tejidos conectivos suaves.	Fijación ortopédica: tornillos, clavos, placas, barras intermedulares.
CERÁMICAS	Buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inerte.	Fractura ante esfuerzos de alto impacto, difícil fabricación, baja resistencia mecánica, no elásticos, alta densidad.	Prótesis de cadera, dientes, dispositivos transcutáneos.
COMPUESTOS	Buena compatibilidad, inertes, resistencia a la corrosión, alta resistencia a los esfuerzos.	Carecen de consistencia en la fabricación del material.	Válvulas cardiacas, marcapasos, uniones óseas.

Los **materiales poliméricos** se caracterizan por poseer unas propiedades similares a los tejidos blandos, tanto físicas y químicas como mecánicas. Al ser de origen orgánico, presentan poca resistencia a la temperatura, y proceden principalmente del petróleo. A su vez, pueden ser naturales o sintéticos, así como bioestables (carácter permanente) o biodegradables (carácter temporal). Sus aplicaciones principales se centran en los implantes quirúrgicos, membranas protectoras, dosificación de fármacos y en cementos óseos acrílicos.

Capítulo 1

La resistencia al desgaste y a las altas temperaturas, así como su fragilidad y dureza, son las principales características de los **materiales cerámicos** [20]. Se consideran biomateriales con una buena biocompatibilidad, en general, debido a su baja reactividad. A su vez, pueden ser bioinertes o bioactivas, las cuales son empleadas comúnmente en cirugía reconstructiva. Sin embargo, su alta fragilidad supone una gran restricción en cuanto a las aplicaciones en las que pueden ser empleadas, requiriendo unas prestaciones mecánicas que no sean elevadas. Ejemplos de cerámicas usadas como biomateriales son la alúmina y la zircona.

Por el contrario, los **materiales metálicos** presentan unas buenas propiedades mecánicas y resistencia adecuada [20], de forma que son ampliamente empleados en aplicaciones para el soporte de cargas mecánicas y como elementos estructurales. En cuanto a biocompatibilidad y resistencia a la corrosión, un bajo número de metales es utilizado en aplicaciones biomédicas. Algunos de ellos son los metales preciosos (platino y oro), el titanio, el acero inoxidable y las aleaciones cromo-cobalto [18].

Por último, los **materiales compuestos** (composites) se basan en la combinación de materiales distintos, de forma que adquieren propiedades adaptadas a las necesidades requeridas. Un ejemplo de estos biomateriales ampliamente conocido es el plástico reforzado con fibras, aplicado como fijador de fracturas o cemento óseo, así como reemplazo de cartílagos, tendones y ligamentos [18].

b) Biomateriales metálicos

Esta Tesis Doctoral está basada en este tipo de materiales. Los materiales metálicos empleados como biomateriales constituyen un 70-80 % de los implantes fabricados actualmente [21-23]. Los metales más usados en este tipo de aplicaciones son el acero inoxidable, las aleaciones de cobalto-cromo (Co-Cr) y el titanio y sus aleaciones (Ti) [6, 8, 21-23] (Figura 5). Las aleaciones de Ti, así como las de Co-Cr se caracterizan por una alta compatibilidad [6] y una gran resistencia a la corrosión, por lo que son comúnmente utilizados para funciones de reemplazo permanente, como, por ejemplo, el implante de cadera. Por su parte, para implantes

de carácter temporal (placas y tornillos), suele emplearse el acero inoxidable, especialmente el 316L [21].

Principales usos de los biomateriales metálicos	
Acero inoxidable	Dispositivos temporales (Placas, tornillos, clavos de cadera) Reemplazo total de cadera
Aleaciones de base Co	Reemplazo total de cadera (aleaciones forjadas) Fundiciones para odontología
Aleaciones de base Ti	Vástago y copa de reemplazos totales de cadera con CoCrMo o cabezas femorales de cerámica Otros reemplazos temporales (clavos, marcapasos)
Mg	Implantes ortopédicos biodegradables
NiTi	Arcos de ortodoncia dental Stents vasculares Filtro de vena cava Cables de guía del catéter Grapas ortopedicas
Ta	Suturas de alambre para cirugía plástica y neurocirugía Marcador radiográfico

Figura 5. Principales biomateriales metálicos y sus aplicaciones clínicas [21].

Los biomateriales metálicos se caracterizan por sus buenas propiedades mecánicas y su durabilidad frente a la fragilidad que presentan los materiales cerámicos [22-24]. Sin embargo, presentan limitaciones en cuanto a la corrosión, de forma que tanto la biocompatibilidad como la resistencia mecánica pueden verse afectadas, implicando tanto la liberación de cationes hacia el cuerpo humano como una pérdida de su integridad estructural. Debido a ello, puede tener lugar el fallo del implante de manera biológica, química y mecánica [24].

Una de las principales limitaciones de los materiales metálicos es el fenómeno del **apantallamiento de tensiones (*stress shielding*)**. Éste se genera como consecuencia de la diferencia entre el módulo de Young del hueso y del implante, afectando de forma negativa a la transferencia de la carga mecánica del implante al

Capítulo 1

hueso. Esto se traduce en la reabsorción ósea (*induced bone resorption*), con la consecuente pérdida de densidad, pudiendo llegar al aflojamiento del implante y a la fractura [6, 8]. Ciertos estudios, por su parte, han demostrado que altos esfuerzos sobre el hueso, alternando periodos de carga y de descanso, así como altas velocidades de deformación, mejoran el potencial osteogénico del mismo. Este hecho manifiesta la importancia del equilibrio mecánico entre hueso e implante [6].

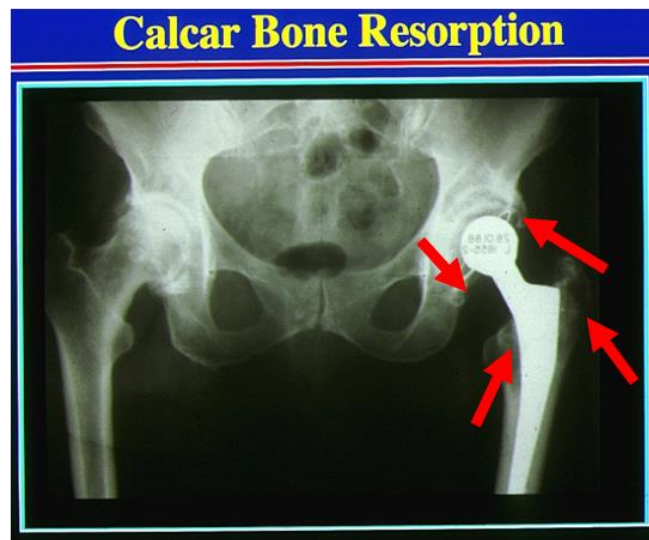
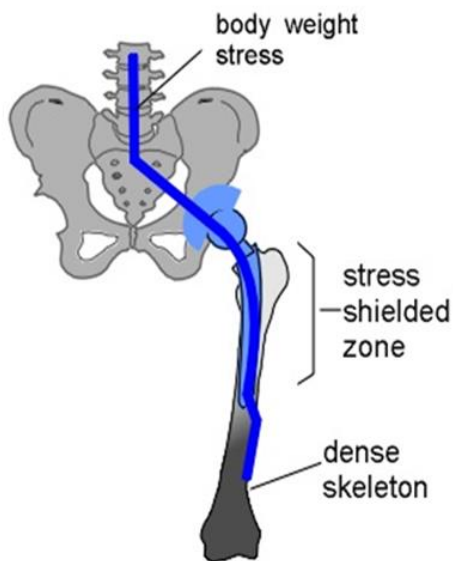


Figura 6. Fenómeno de apantallamiento de tensiones y consecuente reabsorción ósea [4].

La capacidad de ser bioinertes implica que, tras la implantación del material metálico, puede tener lugar un encapsulamiento de éste por tejido fibroso, derivando en una **pobre osteointegración**. Este tejido fibroso se genera a partir de ciertos micromovimientos en la intercara hueso-implante, imposibilitando una correcta distribución de esfuerzos [25, 26] y conllevando al aflojamiento del implante (Figura 7).

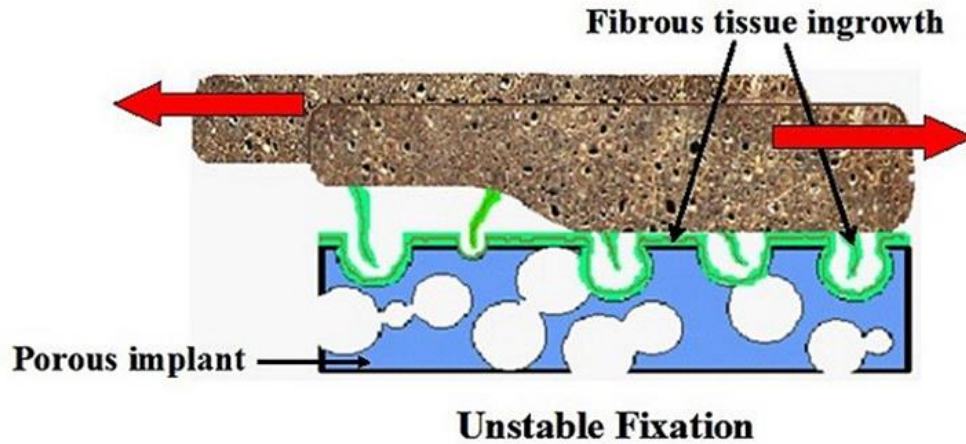


Figura 7. Crecimiento de tejido fibroso en un implante metálico poroso [27].

La Tabla 2 muestra las propiedades de densidad y rigidez de los principales biomateriales metálicos, así como las correspondientes al hueso cortical.

Tabla 2. Propiedades mecánicas del hueso y de algunos metales empleados para su sustitución.

	Hueso cortical	Acero inoxidable	Aleaciones Co-Cr	Titanio c.p.
Módulo de Young (GPa)	22-25	190-210	190	116
Resistencia mecánica (MPa)	170	460-860	655	220
Densidad (g/cm ³)	1.9	7.96	8.3	4.5

El titanio comercialmente puro (Ti c.p.) es el que presenta unas propiedades mecánicas más cercanas al hueso, con valores que permiten soportar los esfuerzos a los que el implante estará sometido en servicio [28]. Por ello, el titanio es de los metales más interesantes en términos de reemplazo total o parcial del hueso.

Capítulo 1

1.2 El titanio

El Ti c.p. y sus aleaciones, como se ha mencionado anteriormente, poseen unas excelentes propiedades mecánicas y un alta resistencia a la corrosión [29, 30], así como una buena biocompatibilidad, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [31], además de ser bioinerte. Las propiedades que posee este material dependen de manera estrecha de la capa de óxido (TiO_2) que se genera sobre su superficie como consecuencia de la autopasivación, con un espesor variable de entre 2-10 nm. Dicha capa protege al material de ataques químicos en ambientes agresivos, como el aire o fluidos corporales. Además, reacciona en solución acuosa, adsorbiendo y disociando moléculas orgánicas, pudiendo incluso llegar a actuar como catalizador para un gran número de reacciones químicas [32, 33].

A pesar de ser un buen candidato entre los biomateriales metálicos para el reemplazo óseo por sus buenas prestaciones, el Ti c.p. presenta ciertas limitaciones que ponen en duda su fiabilidad. Estos fallos son clasificados en dos tipos: fallos biomecánicos y biofuncionales.

Los fallos biomecánicos se deben principalmente a:

1. El **apantallamiento de tensiones**, que desemboca en la fractura y la reabsorción ósea. A pesar de poseer unas propiedades más cercanas a las del hueso, estas siguen siendo mayores, originando una gran diferencia de rigidez (módulo de Young) entre el implante y el hueso (20 GPa para el hueso cortical y 1 GPa para el trabecular/esponjoso) [34, 35].
2. **Esfuerzos de fatiga y de desgaste**, los cuales limitan la vida en servicio del propio material, comprometiendo su éxito clínico [36-38]. En este contexto, se requiere la implementación de modelos y criterios de diseño enfocados a la prevención del daño y no a su tolerancia [39, 40]. Por otro lado, también destaca su alta sensibilidad a la entalla, de manera que no es un material adecuado para funcionar como superficie de apoyo [6].

Los fallos biofuncionales están fuertemente relacionados con la integración entre el implante y el hueso [41-43]. Son causados principalmente por:

1. Los **micro-movimientos que se generan en la intercara** material-tejido óseo, que generan una capa de tejido fibroso que encapsula al implante, conllevando el aflojamiento de éste y, por tanto, a una pérdida de su funcionalidad, así como a una **osteointegración deficiente** [44].
2. La **adhesión de microorganismos** a su superficie, originando así la aparición de infecciones que afectan a la correcta osteointegración, fundamentalmente ocasionadas por la acumulación de placa dento-bacteriana durante la cirugía o por una deficiente cicatrización (fallos tempranos) o por la formación y crecimiento de dicha placa con el paso del tiempo (fallos tardíos), pudiendo provocar una peri-implantitis [45].

1.3 Materiales metálicos porosos

Uno de los fines de esta Tesis Doctoral es el empleo de materiales metálicos para afrontar uno de los problemas biomecánicos del titanio: el apantallamiento de tensiones.

El fenómeno de apantallamiento de tensiones se enfoca en las propiedades mecánicas del material, en concreto, en el módulo de Young. El objetivo es reducir la diferencia entre la mayor rigidez del material en relación con la del hueso. En este sentido, se encuentran diferentes vías:

- Obtención de aleaciones con un módulo de Young menor a 50 GPa. Estas aleaciones, además, permiten mejorar otras propiedades, como la resistencia a rotura [46, 47].
- Empleo de Ti poroso, de forma que se obtienen adicionalmente propiedades biofuncionales. Por un lado, la introducción de la porosidad se traduce en una reducción directa de la rigidez del material [36, 48-54]. Por otro, dicha porosidad favorece el crecimiento del hueso hacia el interior de los poros interconectados entre sí (*bone in-growth*) [53, 55]. De esta forma, se logra la infiltración del hueso, mejorando a su vez la adhesión implante-tejido óseo. El control de parámetros como la distribución, fracción volumétrica de la porosidad (40 % para hueso cortical y 70 % para trabecular), así como del

Capítulo 1

tamaño, tipo (abiertos o cerrados) y morfología de los poros, resulta ser imprescindible a la hora de conseguir unas propiedades mecánicas adecuadas a la función que ha desempeñar el material [51].

Los materiales porosos son aquellos que poseen una parte significativa de su volumen ocupado por aire. En función de dicha fracción volumétrica, se diferencian en sólidos porosos (< 70%) y en sólidos celulares o espumas (> 70 %).

La distribución de porosidad, a su vez, permite establecer también una distinción en cuanto a tipo de materiales. Por un lado, el material poroso monolítico presenta una porosidad homogénea en las tres direcciones del espacio. Por el contrario, los materiales porosos variables o gradientes muestran un reparto heterogéneo de la porosidad con una dirección preferencial en la variación de la distribución y características de sus poros. Son conocidos como “*functionally graded materials*”.

P. Trueba, en su Tesis Doctoral “Desarrollo de titanio con porosidad gradiente radial y longitudinal para aplicaciones biomédicas” [51], documenta hasta 34 técnicas para fabricar metales porosos, comprendiendo como punto de partida el empleo de un metal líquido, polvo metálico, preforma metálica o una suspensión de polvo metálico. En cuanto al procesado, las rutas utilizadas son Técnicas de Moldeo (TM) o de Pulvimetalurgia (PM).

La Tabla 3 recoge las diferentes técnicas de fabricación de materiales porosos reportadas en la literatura, así como el tipo de porosidad que generan.

Tabla 3. Clasificación de las técnicas para la obtención de materiales metálicos porosos, en función del estado del material de partida.
Nota: Todas las referencias de esta Tabla se encuentran en la Tesis Doctoral de P. Trueba [51].

Estado del material de partida	Nombre de la Técnica , referencias	¿En que etapa en la que se generan los poros?	Fuente de calor	Porosidad Gradiente (G) Monolítica (M)		
Metal líquido	Espaciadores Partículas granulares [85-96] Réplica de esqueletos poliméricos [97-99]	En el vertido en el molde. Requiere posterior eliminación por lixiviación o proceso térmico.	Enfriamiento de colada	G y M		
	Inyección directa de gas en líquido [100-106]	Tras el vertido se generan burbujas de gas atrapado por inyección, expansión o enfriamiento en el seno del líquido		M		
	Agente espumante (H ₂) [107-113]			M		
	Eutéctico de gas Hidrogeno GASARs [81]			M		
Polvo metálico	Diferente coeficientes de difusión de partículas [114-118]	En la sinterización	Horno	M		
	Diferente tamaño partículas [119-120]	En la compactación		G		
	Compactando a bajas presiones [121-124]	En la compactación		M		
	Ausencia de Presiones [125-130]	En la no compactación		M		
	Ausencia de Presiones y diferente tamaño partículas [125-129]	En la no compactación		G		
	Moldeo por inyección de polvo metálico (MIM) [131]	En la inyección de polvo		M		
	Espaciadores	Partículas granulares [132-143] Proporciones y/o tamaños diferentes Presión Isostática en Caliente [144,145] Réplica de esqueletos poliméricos		En la compactación. Requiere posterior eliminación del espaciador por lixiviación o proceso térmico	M	
					G	
					M	
	Gas Ar atrapado en polvo [146-151]			M		
	Agente espumante mezclado en polvo	En la compactación se generan burbujas de gas atrapado o por expansión		M		
	Agente espumante mezclado en polvo y compactación posterior [152-159]			M		
	Prototipado rápido [161-164]	En la fabricación del verde por estratificación de capas según modelo previo		G y M		
	Autopropagación a alta temperatura (SHS) [165-168]	En la propagación de onda de calor añadida tras compactación y precalentamiento		M		
	Superposición de láminas diferentes [169,170]	Láminas porosas sobre núcleos sólidos		En la compactación empleando espaciadores. Posterior eliminación del espaciador por lixiviación o proceso térmico	G	
		Láminas de espumas metálicas				En la compactación se generan burbujas por expansión de agente espumante
	Sinterización selectiva por láser (SLS) [171-176]			En la sinterización capa a capa por el impacto de haz láser	Láser	G y M
	Fusión selectiva por láser (SLM) [177]					G y M
	Sinterización metálica directa por láser (MLSTM)			En la sinterización en una sola capa por el impacto de haz láser		M
	Sinterización asistida por campo eléctrico (ECAS) [178-184]			En la compactación del polvo y aplicación de campo eléctrico a la vez	Campo eléctrico	M
Electrodescarga de condensadores [183,185]		En la compactación del polvo con electrodescarga	M			
Fusión por haz de electrones (Arcam) [187]		En la fabricación del verde y sinterización capa a capa	Haz de electrones	G y M		
Fusión por haz de electrones combinado [188]		En la fabricación del verde por empleo de esqueletos de espuma polimérica.		G y M		
Preforma	Esferas huecas metálicas [80,190]	En la fabricación de la preforma metálica y durante la compactación.	Horno o campo eléctrico	G y M		
Suspensión polvo metálico	Inmersión de esqueleto polimérico [161, 191,192]	En el recubrimiento del esqueleto	Horno	G y M		
	Congelación direccional [83, 193-197]	En el crecimiento dendrítico de líquido conductor del proceso		G		
	Electro deposición metálica en sustrato polimérico [198-203]	En deposición de iones metálicos sobre esqueleto de espuma		G y M		

Capítulo 1

En este contexto, la porosidad en un implante resulta ser un factor determinante no sólo para reducir el módulo de Young, sino en la proliferación de células madre mesenquimales, en la osteogénesis y en favorecer el crecimiento del hueso hacia el interior del implante (*bone in-growth*) [6]. En particular, la porosidad interconectada permite, a su vez, el paso de sangre y nutrientes esenciales para el crecimiento óseo [8]. Según la literatura, el tamaño de porosidad mínimo que garantiza el crecimiento del tejido hacia el interior del material es de 100 μm [10, 56, 57]. Otros estudios, sin embargo, fijan este tamaño a partir de las 50 μm [8, 56].

Las propiedades mecánicas dependen también de la orientación de los poros, siendo mejores en la dirección de estos y no en la perpendicular, cuando los poros son alargados [32].

Entre las técnicas citadas para la obtención de materiales porosos, en la presente Tesis Doctoral se emplea la **técnica de espaciadores** para fabricar los substratos porosos. Los “espaciadores” son materiales que, al mezclarse en cantidades adecuadas con el polvo metálico y prensar dicha mezcla por PM convencional, se eliminan fácilmente mediante diferentes procesos, generando un poro en el lugar de la partícula de espaciador (Figura 8). Permite controlar parámetros como la porosidad homogénea y el tamaño, además de destacar por la facilidad de eliminación del espaciador en las etapas previas y del proceso de sinterizado [52, 53, 58], Algunos de estos materiales son el magnesio, sacarosa, PVA, PMMA, NaF [59-66], bicarbonato de amonio, carbamida y NaCl [54, 67].

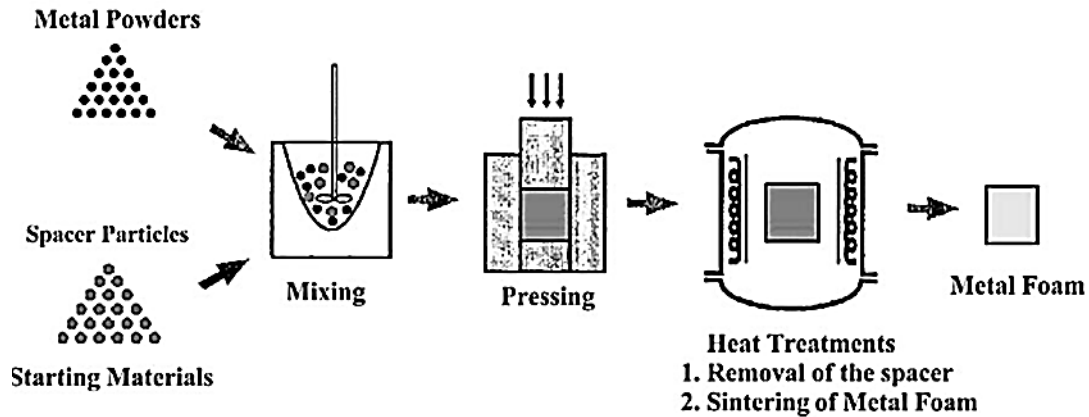


Figura 8. Proceso de fabricación que emplea la técnica de espaciadores [61].

La técnica de espaciadores presenta una gran potencialidad, ya que permite generar un gradiente longitudinal de porosidad, tanto en proporción como en tamaño de poro mediante la apilación de varias capas. Adicionalmente, posibilita la aparición de canales o poros dirigidos (micro-panales) gracias al uso de fibras (metales o polímeros en forma de varillas) en lugar de partículas [68, 69]. Otra de sus aplicaciones es la combinación con la técnica HIP (*Hot Isostatic Pressing*) y su variante de encapsulamiento libre CF-HIP (*Capsule-Free Hot Isostatic Pressing*), empleando espaciadores de NaF y $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$ [70, 71].

1.4 Mejora de la osteointegración

Los fallos biofuncionales tempranos que tienen lugar durante la intervención quirúrgica (sobrecarga y contaminación) están causados, principalmente, por el equipo médico. Sin embargo, los fallos tardíos están influenciados por las propiedades superficiales del material. La interacción entre el tejido óseo y el implante, así como la naturaleza físico-química de la superficie del material y la evitación de una posible colonización bacteriana se encuentran estrechamente relacionados con una buena osteointegración.

Para combatir los problemas biofuncionales se vienen implementado diferentes técnicas cuyo fin es favorecer tanto la osteointegración como la cicatrización del tejido circundante, disminuyendo así el riesgo de proliferación de bacterias [72]. En

Capítulo 1

esta Tesis Doctoral se abordan distintas vías para mejorar la osteointegración, así como para combatir la colonización bacteriana del Ti.

1.4.1 Técnicas de modificación superficial del titanio

La optimización de la topografía y la química del material por diversas vías han sido las principales líneas seguidas en la consecución de una mejor osteointegración. Una de las vías seguidas, de carácter más biológico, consiste en la previa adición de proteínas (fibronectina o vitronectina), así como de moléculas que promuevan la respuesta celular con la superficie del implante, formando una matriz de colágeno sobre el mismo [41-43]. Otras técnicas empleadas son:

La topografía (curvatura, rugosidad, porosidad, protuberancias, etc.) resulta ser una de las características esenciales para tener en cuenta cuando se realiza una implantación, ya que permite el anclaje del tejido óseo al material. Una topografía adecuada reduce los tiempos de osteointegración, consiguiendo una buena transmisión de cargas entre hueso e implante, alargando así la vida útil de este último y reduciendo la reabsorción ósea [73].

Se distinguen dos escalas en cuanto a la topografía de un material que afectan al proceso de integración del implante. La primera, a nivel micro, mientras que la segunda es a nivel nano. Varios estudios han discutido la influencia de una y otra, destacando el efecto positivo de la escala nanométrica en términos de rugosidad [74, 75]. Sin embargo, se ha observado que el verdadero potencial se encuentra en la combinación de ambas escalas micro y nano [76].

Entre los métodos de modificación superficial encontrados en la literatura se encuentran diversas técnicas, las cuales se clasifican en función del tipo de proceso en el que se basan. Esta clasificación se muestra en la Figura 9.

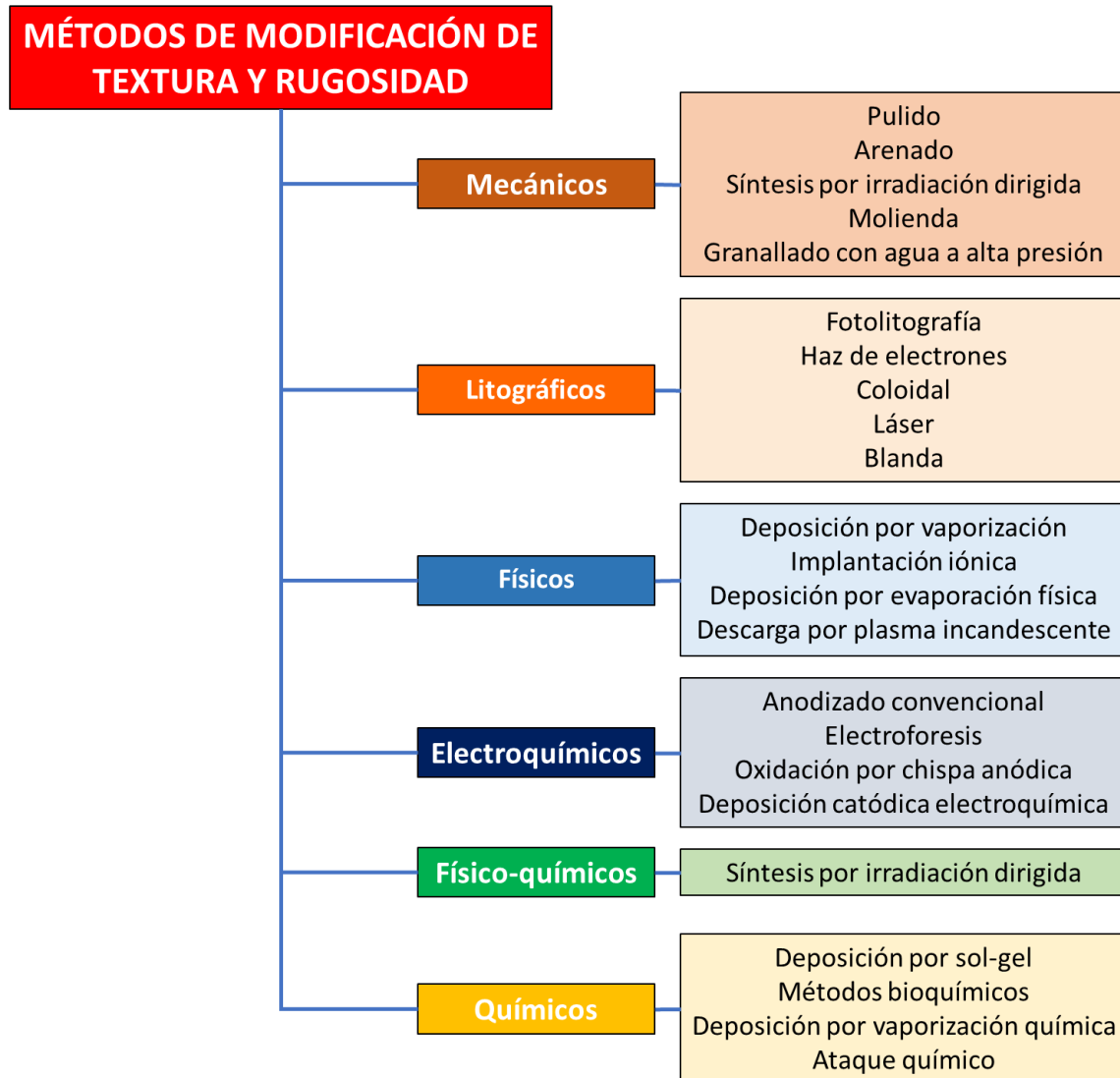


Figura 9. Clasificación de los distintos métodos de modificación superficial encontrados en la literatura.

Los **métodos mecánicos** modifican la topografía de los materiales a escala micrométrica. Sus objetivos se centran en la eliminación de material contaminado de la superficie, la obtención de distintas rugosidades y, en el caso de implantes, en el aumento de puntos de anclaje para el tejido óseo [77].

Por su parte, los **métodos litográficos** se basan en la impresión por estampación de una matriz, haciendo posible la creación de diseños geométricos precisos a escala micro y nano-métrica a partir de ciertos patrones. De esta forma, es posible

Capítulo 1

que se biofuncionalice la superficie de un material para promover la adhesión celular sobre el mismo [78].

Los métodos físicos modifican las características de la superficie del material sin la presencia de reacciones químicas. Por su parte, modifica la capa superficial o la deposita mediante energía térmica, cinética o eléctrica [79].

Los electroquímicos, sin embargo, se basan en la conexión de un dispositivo metálico al polo positivo de un circuito eléctrico, sumergiéndolo posteriormente en una solución electrolítica que contiene sustancias iónicas y/u oxidantes. Estas sustancias se incorporan a la superficie del sustrato, variando así sus propiedades [79]. Dentro de los métodos electroquímicos, las técnicas se clasifican en anódicas o catódicas.

Los **métodos físico-químicos** implican a la vez procesos tanto físicos como químicos para la modificación de la superficie. La síntesis por irradiación dirigida (*directed irradiation synthesis*, DIS), permite generar patrones a escala nano y mesométrica a partir de partículas cargadas sobre un semiconductor bajo condiciones no térmicas. La técnica DIS [80] utiliza haces de iones o corrientes que, al dirigirse a la superficie del material, generan combinaciones entre las partículas procedentes del haz y los átomos de la superficie, creando gradientes de especies reactivas con una nano-estructura determinada, que modifican la química de ésta [81, 82]. Puede aplicarse sobre metales, materiales compuesto y polímeros. El control de la topografía a nanoescala, depende del control de parámetros relacionados con el haz de iones, la energía, los gases empleados y la fluencia. Como resultado, se mejora tanto la adhesión como la proliferación celular [13].

Finalmente, los **métodos químicos**, en sentido estricto, engloban los tratamientos químicos, electroquímicos y bioquímicos. Sin embargo, debido al gran desarrollo de los electroquímicos, estos se pueden agrupar aparte. Mediante los métodos químicos se pretende incrementar la biocompatibilidad, bioactividad y conductividad ósea [79]. Por otro lado, se aumenta la resistencia frente a corrosión y se evita la

contaminación de muestras. Técnicas basadas en este método se han empleado en esta Tesis Doctoral.

Métodos químicos

Dentro de los métodos químicos podemos diferenciar dos rutas distintas. La primera es el ataque químico del propio sustrato, mientras que la segunda consiste en la deposición de productos que derivan de ciertas reacciones químicas.

a) Tratamientos químicos de ataque de la superficie del sustrato

Estos tratamientos se basan en reacciones químicas que tienen lugar en la interfaz del material, en este caso el titanio o sus aleaciones, y la solución. Los procesos más utilizados dentro de este grupo se clasifican en función del compuesto que intervenga en la reacción (peróxido de hidrógeno, soluciones alcalinas o soluciones ácidas).

a.1) Ataque químico mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El ataque del titanio con peróxido de hidrógeno origina peróxido de titanio en gel [83]. El gel resultante promueve la formación de HA en presencia de fluido corporal simulado (SBF), aumentando así su bioactividad [84]. El grosor de su capa depende del tiempo de ataque. Por el contrario, la porosidad de ésta es inversamente proporcional a la duración del ataque, de forma que se forma una estructura compuesta por una doble capa: una primera capa interna densa y fina (< 5 nm) y una externa porosa (escala submicrométrica) [85].

De esta forma, la nucleación de la HA tiene lugar en el interior de las grietas de las capas más externas (mayor grosor) de gel de óxido de titanio. Se observa que, aumentando el tiempo de inmersión en el fluido biológico simulado (SBF), la superficie queda totalmente recubierta de HA, independientemente del espesor de la capa de gel sobre el titanio [86].

Capítulo 1

a.2) Ataque químico mediante solución alcalina

Este tratamiento consiste en sumergir el sustrato en una solución de hidróxido sódico (NaOH) o potásico (KOH) durante unas 24 h. Tras el ataque, el sustrato se limpia y seca, para posteriormente someterlo a un tratamiento térmico (600-800 °C) durante 1 h aproximadamente, controlando la presión con el fin de evitar la oxidación del titanio.

Se forma una capa de titanato sódico o potásico, de manera que, al sumergirse en *SBF*, se liberan iones Na^+ o K^+ , formándose así TiOH . Dicho compuesto interacciona con los iones Ca^{2+} disueltos en el medio, generando así titanato de calcio y teniendo lugar una acumulación de Ca^{2+} sobre la superficie. Como consecuencia, la superficie se polariza de forma positiva, atrayendo los iones fosfato del *SBF* y originando así fosfato cálcico amorfo, compuesto principal de la HA. De esta forma, la superficie se vuelve de inerte a bioactiva [87].

Tras ciertos ensayos *in vitro* sobre implantes atacados mediante solución alcalina, se apreció que las capas formadas presentaban mejor estabilidad física y adhesión ósea mientras más pequeño fuera su espesor, de forma que la HA quedaba depositada tanto en el exterior como en el interior de los poros superficiales de los implantes, promoviendo así el crecimiento óseo hacia el interior de éste [88]. Recientemente, se han realizado combinaciones de este tratamiento con métodos electroquímicos, con el fin de obtener una mejor adhesión del hueso al sustrato tras la creación de una capa de óxido adecuada [89].

a.3) Ataque químico mediante solución ácida

El ataque en solución ácida puede llevarse a cabo tanto por inmersión como por goteo de la solución sobre el sustrato. Tras este proceso, se generan cavidades sobre la superficie del sustrato, siendo así el objetivo principal la obtención de micro-rugosidades adicionales a las posiblemente existentes. De esta forma, una superficie micro-estructurada después del ataque presenta una rugosidad fina (1-3 μm) y una más abrupta (6-10 μm). Esta combinación de topografías mejora la integración endógena temprana y la estabilidad del implante [90]. Ciertos estudios

han mostrado una mayor resistencia a la extracción de implantes que han sido sometidos a este tipo de tratamiento frente a otros tratamientos mecánicos, como consecuencia de una mayor adhesión del hueso al implante [91].

Cabe destacar que este tipo de tratamientos no genera topografías estándares, ya que los perfiles de rugosidad obtenidos dependen de parámetros tales como el tratamiento previo, la composición del ácido, la temperatura y el tiempo de ataque, así como el post-tratamiento. Algunos estudios muestran que la temperatura es el factor determinante sobre la rugosidad generada, de forma que, a una misma temperatura, las irregularidades generadas sobre la superficie no varían [92]. Sin embargo, dichas irregularidades crecen en tamaño y profundidad con el tiempo de ataque.

En cuanto a las soluciones más empleadas, el ácido fosfórico y el fluoruro de sodio han resultado ser las más novedosas y económicas. Esta última se caracteriza por presentar mayores niveles de deposición de fosfatos cálcicos sobre Ti, como consecuencia de que se obtiene una disminución de la concentración de H_2 . De esta forma, se obtienen rugosidades similares a las que generan otras soluciones convencionales [93]. Por otro lado, la utilización de ácido nítrico y otros ácidos mixtos han conseguido depositar HA biomimética, constituyéndose, así, como alternativas a los tratamientos por solución alcalina [94, 95].

b) Tratamientos químicos de deposiciones sobre el sustrato

Los métodos químicos que engloban deposiciones sobre el sustrato se caracterizan por presentar reacciones químicas que no tienen lugar en la propia interfaz del sustrato. Estos tratamientos corresponden a las deposiciones de sol-gel, donde las reacciones involucradas tienen lugar en la solución, las deposiciones mediante vaporización química (CVD), cuyas reacciones involucradas ocurren entre la fase gaseosa y la superficie del sustrato (Figura 10).

Capítulo 1

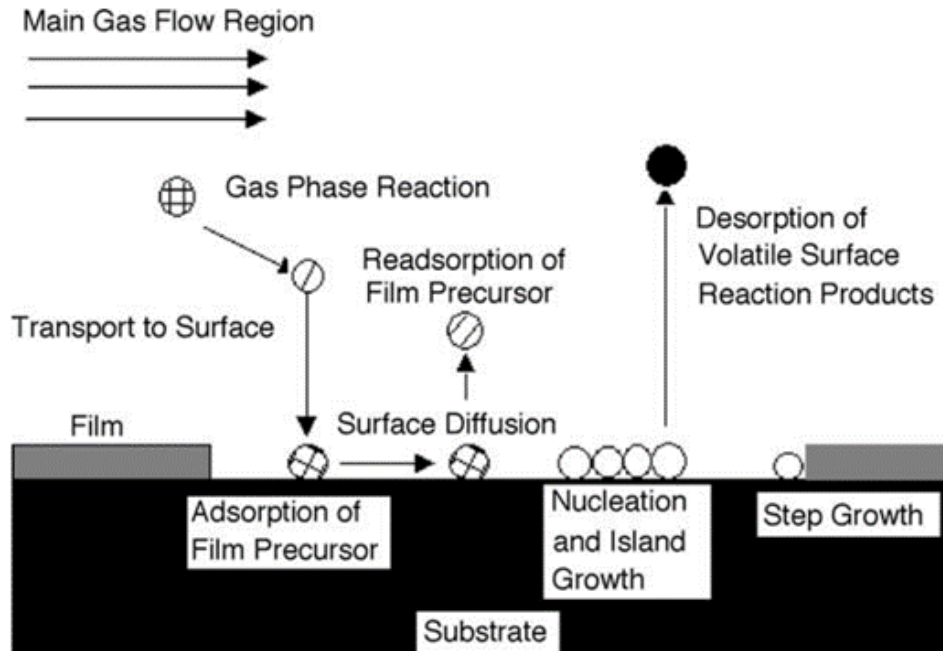


Figura 10. Esquema de los diferentes procesos durante el crecimiento del recubrimiento por CVD [96].

A partir de la CVD se han desarrollado diferentes técnicas, como la deposición por vaporización química a presión atmosférica (APCVD), asistida por plasma (PECVD), a baja presión (LPCVD) y la asistida por láser, combinándose aspectos tanto químicos como físicos [97]. Este tipo de tratamientos han logrado mejorar la resistencia al desgaste del implante, a corrosión y la compatibilidad con la sangre. Las capas depositadas suelen tener un espesor de alrededor de 1 μm y su composición puede ser de nitruro de titanio (TiN), carburo de titanio (TiC), cianuro de titanio (TiCN), diamante o carbono adiamantado [98-102].

En cuanto a las deposiciones mediante la técnica de sol-gel, se profundizará en un apartado más adelante.

1.4.2 Materiales bioactivos

Los recubrimientos bioactivos tienen la función de transformar la superficie inerte del material del implante en bioactiva, de manera que se evite la encapsulación del implante por un tejido fibroso. Estos recubrimientos tienen la propiedad de ser

biodegradables, ya que se disuelven en fluido fisiológico y puede conllevar a la pérdida de estabilidad inicial que confieren al implante [25, 26].

El buen comportamiento y buena durabilidad de un recubrimiento depende de las fuerzas de atracción entre el propio recubrimiento y el sustrato (adhesión) y de las fuerzas internas del propio recubrimiento para que sus partículas sigan unidas (cohesión). Una adhesión débil conlleva el fallo del implante en aplicaciones que implican soporte de cargas [21].

Uno de los aspectos más importantes a la hora de depositar recubrimientos es la diferencia del coeficiente de dilatación térmica (TEC) entre el sustrato y el propio recubrimiento. La poca similitud entre ellos puede generar la aparición de grietas en el recubrimiento o que este pueda desprenderse [25].

Los principales recubrimientos bioactivos existentes corresponden a la familia de las biocerámicas, entre las que destacan la HA y el vidrio bioactivo.

Hidroxiapatita (HA)

a) Características principales de la HA

La hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es una biocerámica que pertenece al grupo de las apatitas [5, 8], cuyo componente principal es el fosfato de calcio [11, 26, 103-105]. Se designa también como HA, HAP, HAp o CHAp. Tanto su composición química como su estructura son muy similares a las del hueso mineral, de forma que resulta ser muy estable en ambientes biológicos [20, 106].

La HA químicamente pura cristaliza según el grupo espacial monoclinico $\text{P}2_1/\text{b}$, teniendo lugar una transición de dicha fase a hexagonal con el grupo espacial $\text{P}6_3/\text{m}$ a temperaturas mayores de 250 °C. La disposición atómica y estructural de la HA hexagonal se observa en la Figura 11 [107].

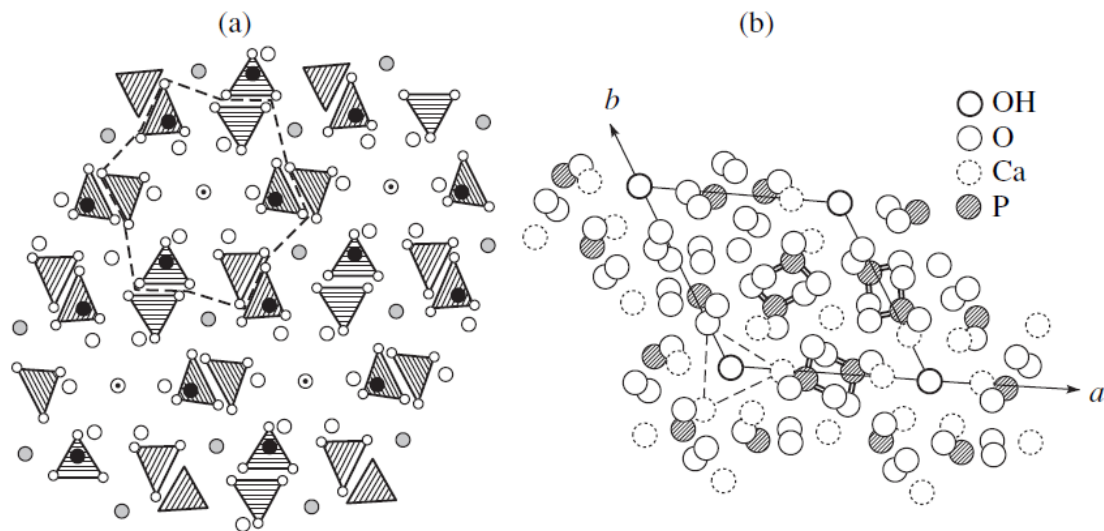


Figura 11. (a) Estructura atómica de la HA y (b) su proyección a lo largo del eje c [107]

El calcio es un elemento esencial que garantiza un buen comportamiento del sistema nervioso, contracciones musculares, actividad hormonal y paso de sustancias a través de sus membranas. Por su parte, el fósforo forma parte de la estructura del ATP, así como del ARN, del ADN y del AMPc [11]. Sin embargo, la HA, no se considera como una apatita pura, ya que también está formada por pequeñas cantidades de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, influyendo en la remodelación ósea [11]. Por otro lado, el aluminio y el silicio promueven la proliferación y diferenciación de osteoblastos, aunque altas concentraciones de aluminio inhiben la fase mineral del hueso [108].

a.1) Ventajas e inconvenientes de la HA

La HA, como se ha explicado antes, presenta grandes ventajas en cuanto a biocompatibilidad, bioactividad, osteoconducción y bioreabsorción. Por ello, la HA resulta ser un buen sustituto en tejidos tanto blandos (piel, músculo y encías) como duros (huesos y dientes). Dichas propiedades favorecen la osteointegración del implante y estimulan la interacción con el hueso [103].

Sin embargo, es a su vez un material frágil y con pobre resistencia mecánica, como consecuencia de pertenecer al grupo de las biocerámicas. Por ello, su utilización

está limitada a zonas que no requieran grandes esfuerzos mecánicos. No obstante, estudios recientes han demostrado la posibilidad de ser combinada con metales para aumentar su resistencia [7, 22, 103].

a.2) La HA y el hueso

La relación Ca/P del mineral de la matriz ósea tiene un valor de 1.67, muy cercano al del fosfato cálcico de la HA [7, 109-111]. Por su parte, la HA se considera un elemento acelerador de la formación del tejido óseo [8, 109], y su semejanza con el mismo ha conllevado al amplio desarrollo de la investigación de la HA sintética.

Conocer la estructura jerárquica del hueso y sus materiales, así como sus propiedades mecánicas, es indispensable para comprender la importancia de la HA y su rol en la formación ósea (ver Figura 12). El hueso es una cerámica natural compuesta por fibras de colágeno que contienen materiales inorgánicos nanocristalinos en forma de varillas de 25-50 nm de longitud [103]. Este material inorgánico está formado, principalmente, por la “apatita biológica” o hidroxiapatita [110]. Por tanto, el hueso está constituido por un 20% en masa de colágeno, 69% de fosfato cálcico y un 9% de agua, así como por pequeñas cantidades de otros materiales orgánicos (proteínas, polisacáridos y lípidos) [10, 104, 107].

Capítulo 1

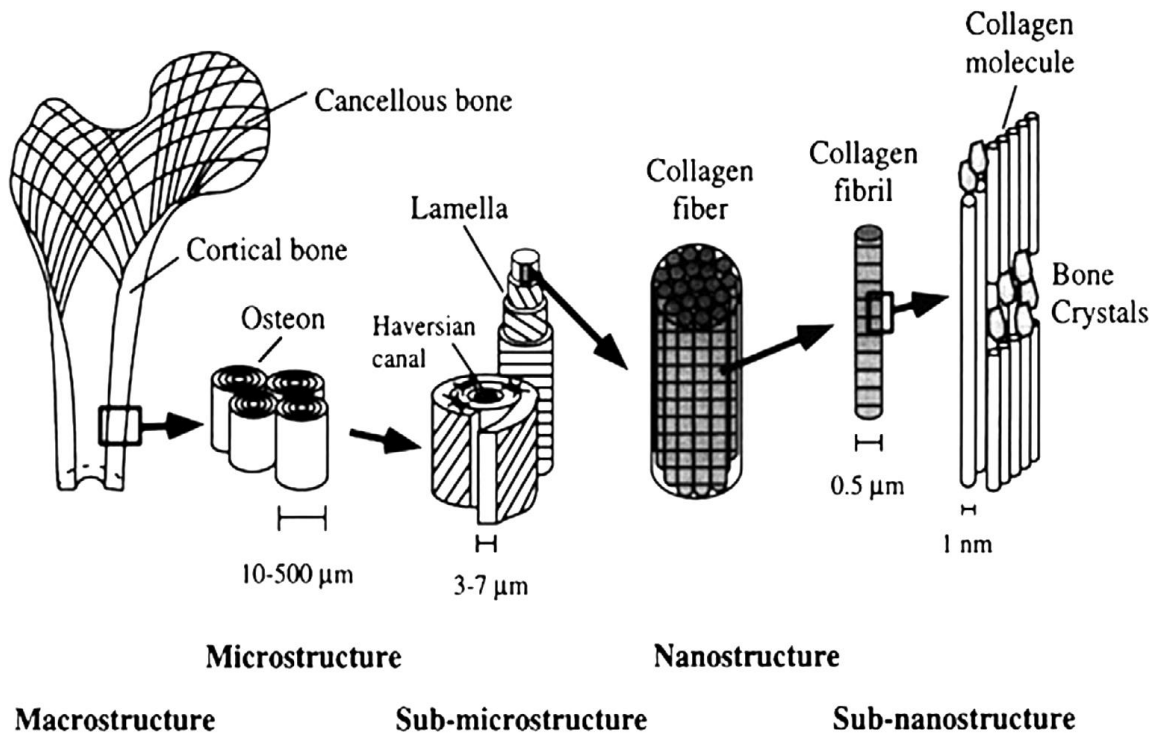


Figura 12. Estructura jerárquica del hueso [103].

El fosfato cálcico del hueso está formado por una parte amorfa (ACP) y por HA cristalizada, de forma que los cristales presentan una forma de platos o agujas con dimensiones de 40-60 nm de longitud, 20 nm de ancho y 1.5-5 nm de espesor aproximadamente [10, 107]. Los cristales se colocan sobre las fibras de colágeno, formando láminas concéntricas alrededor de los vasos sanguíneos y generando así el hueso cortical, que se alimenta a través de los conductos de Havers-Volkman. Por su parte, en el hueso trabecular o esponjoso la disposición tiene lugar en forma de contenedores lagunares de lechos polimorfos, y se nutre mediante lagunas vasculares [112].

En relación con las propiedades mecánicas del hueso, el componente orgánico (colágeno) confiere propiedades típicas de los polímeros, como son la alta tenacidad y el bajo módulo de Young. Por su parte, los inorgánicos (HA) otorgan cierta rigidez, de manera que la combinación resultante de ambos componentes puede asemejarse a un *composite* de alta tenacidad y módulo de Young relativamente alto

[10, 107]. Cabe destacar que la rigidez del hueso aumenta conforme se incrementa el contenido mineral.

La Tabla 4 recoge las características mecánicas principales del hueso lamelar. Se observa que, parámetros tales como la humedad, el modo de aplicación y dirección de la carga, así como el tipo de hueso tienen una gran influencia en las propiedades mecánicas del mismo. Otros factores que afectan al comportamiento son la porosidad, orientación de las fibras de colágeno, la densidad del hueso y la disposición de los cristales de apatita. De esta forma, a mayor densidad ósea aumenta la resistencia a compresión y el módulo de elasticidad [10].

Tabla 4. Propiedades mecánicas del hueso cortical [10]

	Test direction related to bone axis	
	Parallel	Normal
Tensile strength (MPa)	124–174	49
Compressive strength (MPa)	170–193	133
Bending strength (MPa)	160 ^a	
Shear strength (MPa)	54	
Young's modulus (GPa)	17.0–18.9	11.5
Work of fracture (J/m ²)	20–27 (random)	
	6000 (low strain rate) 98 (high strain rate)	
K_{Ic} (MPa · m ^{1/2})	2–12 ^a	
Ultimate tensile strain	0.014–0.031	0.007
Ultimate compressive strain	0.0185–0.026	0.028
Yield tensile strain	0.007	0.004
Yield compressive strain	0.010	0.011

La HA, debido a su similitud con la fase mineral de la matriz ósea, promueve la absorción de proteínas de la matriz extracelular, favoreciendo así la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos que se encuentran alrededor del implante. De esta forma, los osteoblastos crecen desde el implante hacia el hueso, generando el hueso lamelar, una vez se ha ocupado todo el espacio entre el hueso y el implante, evitando al mismo tiempo la formación del tejido fibroso en la interfase implante-hueso [109].

Dentro de las funciones de la HA, cabe destacar su relevancia en el ámbito dental. La sustancia más dura del cuerpo es el esmalte (*enamel*), compuesto en un 97% en peso en cristales de HA (en forma de estructuras de varilla o prismas de 4 mm de

Capítulo 1

diámetro) y el porcentaje restante en elementos orgánicos y agua. La dentina (*dentine*), por su parte, es la segunda sustancia más dura, y es muy similar al hueso cortical (Figura 13). En cuanto a las propiedades mecánicas, los dientes soportan de manera cíclica cargas de unos 20 MPa, por lo que requieren de altas propiedades mecánicas para su correcto funcionamiento (Tabla 5) [10].

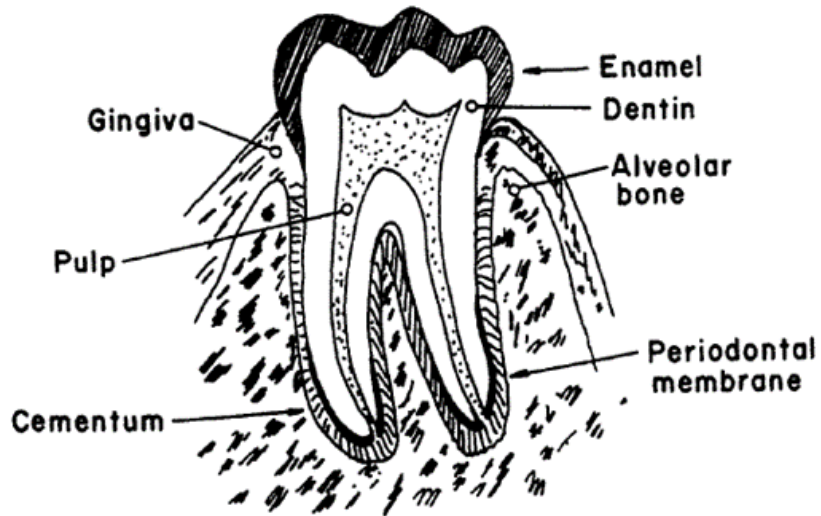


Figura 13. Estructura del diente [10].

Tabla 5. Propiedades mecánicas del diente [10]

	Dentine	Enamel
Compressive strength (MPa)	250–350	95–370
Proportional limit in compression (MPa)	160–170	70–350
Young’s modulus in compression (GPa)	11–17	9–84
Tensile strength (MPa)	21–53	10
Young’s modulus in tension (GPa)	11–19	...
Flexural strength (MPa)	245–268	76
Young’s modulus in bending (GPa)	12	131
Shear strength (MPa)	69–147	64–93
Proportional limit in shear (MPa)	60	...
Shear modulus (GPa)	6	...
Work of fracture (J/m ²)	200–500	13 ^a 200 ^b

^aMeasured parallel to prism orientation.

^bMeasured perpendicular to prism orientation.

a.3) Orígenes de la HA

Las vías de obtención de HA se dividen en dos: de forma natural y de forma sintética.

La HA natural puede obtenerse a partir del hueso y del diente humano, de diferentes especies de mamíferos, así como de otros seres vivos marinos como el coral o la estrella de mar [10, 112]. Por otra parte, también puede obtenerse a partir de rocas sedimentarias o metamórficas que se encuentran en la naturaleza [10]. En cuanto a la HA obtenida de mamíferos, la composición química no presenta variaciones, mientras que sí se han observado cambios sustanciales en cuanto a la porosidad (Tabla 6) [112].

Capítulo 1

Tabla 6. Intervalos de tamaño de poro para HA natural de distintos orígenes [112].

Muestra	Intervalo	
Humano	189.00 μ	604.00 μ
Coralina	79.00 μ	210.50 μ
Bovino	448.97 μ	1096.82 μ
Res	140.00 μ	1130.00 μ
Puerco	74.00 μ	218.00 μ
Perro	156.25 μ	471.50 μ

La HA procedente del coral marino (HA coralina) se obtiene a partir de una transformación química del esqueleto coralino (CaCO_3). La porosidad obtenida resulta ser uniforme, con un alto grado de interconexión tridimensional (en torno al 50-65 %), y con un tamaño de poro de unas 200 μm . Esta microestructura, junto con su composición química, le confieren una gran similitud con el hueso humano. Dicha reacción consiste en un intercambio hidrotérmico a 170 °C y presiones que alcanzan los 10 MPa en una disolución de iones fosfato [56, 110].

Dentro de la HA coralina, destaca la HA-200 obtenida de los corales *Porites* (Cuba), con un tamaño de poro entre 190-230 μm . Como ventajas, presenta una composición muy similar a la del hueso tanto en elementos constituyentes como minoritarios, además de una relación Ca/P de 1.67, alta pureza y un contenido de iones CO_3^{2-} por debajo del 2% [110]. No obstante, este tipo de HA presenta dos grandes inconvenientes. Por un lado, la cantidad limitada de coral marino disponible y, por otro lado, la dificultad para controlar la porosidad [56].

La Tabla 7 muestra las diferencias en cuanto a composición química de la HA humana y de la HA-200 [110].

Tabla 7. Composición química de la fase inorgánica del hueso, el esmalte, la dentina y la HA- 200 [110].

Elemento	Hueso ¹	Esmalte ²	Dentina ²	HAP-200	
	% En Peso				
Calcio (Ca)	25.6	36.1	35	39.3	± 0.6
Fósforo (P)	12.3	17.3	17.1	18.7	± 0.4
Magnesio (Mg)	0.39	0.5	1.2	0.14	± 0.05
Carbonato (CO ₃ ²⁻)	4.0	3.0	4.0		<2
Sodio (Na)	0.6	0.2	0.2	0.12	± 0.05
Potasio (K)	0.3	0.3	0.07		<0.05
Hierro (Fe)	0.017	0.0025	-	0.0017	± 0.0008
Cobre (Cu)	0.0048	0.01	-	0.0008	± 0.0002
Plomo (Pb)	0.015	0.037	(diente)	0.0027	± 0.001
Manganeso (Mn)	0.0022	D	D	0.0005	± 0.0001
Estaño (Sn)	0.00005	D	D		NE
Aluminio (Al)	0.0005	D	D	0.001	± 0.0005
Estroncio (Sr)	0.0002	D	D		NE
Boro (B)	0.014	D	D		NE
Cloruro (Cl ⁻)	0.19	0.3	0.03		NE
Fluoruro (F ⁻)	0.31	0.016	0.017		NE
Azufre (S)	-	0.1	0.2		NE
Silicio (Si)	D	0.003	-	0.001	± 0.0005
Níquel (Ni)	D	D	D	0.0002	± 0.00005
Zinc (Zn)	D	0.016	0.018	0.0037	± 0.0007

D - Se detecta por espectrografía de emisión.

NE- No se detecta por espectrografía de emisión y otros métodos.

1 - Bichemist's Handbook. Ed Ciril Long. (1961), 717.

2 - Benque E.P. et al., J. de Parodontologie (1986), 5(2), 89.

En cuanto a la HA sintética, se puede obtener a través de diversas rutas de síntesis química, aunque presenta unas propiedades mecánicas deficientes a comparación de la natural, como baja resistencia y fácil solubilidad [11].

a.4) Síntesis de la HA

Dentro de las rutas de síntesis de HA, existen dos vías principales para preparar los polvos de este material: las reacciones en estado sólido y los métodos húmedos. En función de la técnica utilizada, propiedades como el grado de cristalinidad, la morfología del polvo y su superficie específica, así como la estequiometría serán distintos [10, 107].

En general, las reacciones en estado sólido generan un producto estequiométrico y cristalizado. Sin embargo, se caracterizan por largos tiempos y altas temperaturas en el tratamiento térmico.

Por su parte, los métodos húmedos se dividen en tres grupos: precipitación, técnica hidrotermal e hidrólisis de otros fosfatos de calcio alto. En el caso de la precipitación,

Capítulo 1

la temperatura no supera los 100 °C y forma cristales a escala nanométrica en forma de agujas, cuchillas, varillas o partículas equiaxiales. Sin embargo, el grado de cristalinidad y la estequiometría (relación Ca/P) obtenidas se encuentran por debajo de los valores óptimos y establecidos para una buena HA, al contrario que ocurre con la técnica hidrotermal. Esta técnica se caracteriza por formar unos cristales en el rango de los nm a los μm . En cuanto al último grupo de los métodos húmedos, la hidrólisis de diversos fosfatos de calcio requiere de temperaturas menores a 100 °C, obteniendo HA del orden de micrómetros en forma de cuchillas o agujas, con el inconveniente de una relación de Ca/P que varía entre 1.50 y 1.71 [10, 105].

El problema común a todos los métodos húmedos es la presencia de iones carbonato y de otras impurezas en la HA formada. Sin embargo, existen otros métodos alternativos a las rutas mencionadas, como son el sol-gel, la electrocristalización, el método de flujo, pulverización-pirólisis, liofilización, irradiación de microondas, método mecano-químico y el proceso de emulsión, entre otros [10].

En general, el sinterizado de la HA conlleva la pérdida de radicales OH^- y la posible descomposición de ésta a altas temperaturas, dificultando así el proceso. En este contexto, la máxima temperatura del proceso de sinterizado de la HA depende en gran medida de la atmósfera en la que se realiza. Así, si la humedad aumenta, la HA se estabiliza a altas temperaturas sin que se produzca su descomposición, alcanzando incluso los 1300 °C. Por otro lado, se ha observado la influencia de la relación Ca/P, de forma que para valores en torno al 1.68, la HA no se descompone a temperaturas cercanas a los 1450 °C con duraciones superiores a 3 h [107].

a.5) Cristalinidad de la HA

El grado de cristalinidad de la HA resulta ser determinante a la hora de la reabsorción de ésta, de forma que, a mayor grado de cristalinidad, la HA se reabsorbe de manera más lenta. Este hecho implica un mayor tiempo para la integración del implante. Por otro lado, las sales de calcio amorfas presentan velocidades de absorción demasiado rápidas, conllevando un anclaje fibroso del

implante. Por ello, se hace indispensable la consecución de un equilibrio entre la HA y las sales de calcio que permitan una integración óptima del material implantado. Como soluciones a ello, podría fabricarse una estructura gradiente que contuviera HA cristalina en las capas interiores y sales de calcio en las exteriores, de forma que la parte externa agilizaría el proceso mientras que la interna aseguraría una buena integración con el hueso.

Estudios recientes han demostrado que los fosfatos de calcio con cierto contenido en estroncio (Sr) propician la adhesión y proliferación de células osteoprecursoras, favoreciendo así la actividad osteoblástica. En cuanto a estudios *in vivo*, se ha observado que este elemento favorece tanto el crecimiento óseo como la osteointegración [113].

Actualmente en el mercado, la cristalinidad de los implantes varía entre el 50 y 90 % [109]. Por otro lado, el avance de la nanotecnología ha desarrollado HA sintética en forma de polvos nanométricos, los cuales presentan una mejor sinterizabilidad y densificación como consecuencia de una mayor área superficial. De esta forma, se ha logrado mejorar la resistencia a fractura del material y otras propiedades mecánicas [103], así como un mayor aumento en la adhesión de osteoblastos por tratarse de un nanomaterial [112].

a.6) Propiedades mecánicas de la HA

Para los implantes que requieren el soporte de cargas mecánicas y que están fabricados de HA se suele emplear HA densa, ya que su resistencia es superior a la de la porosa [107].

Las propiedades mecánicas más importantes de la HA quedan recogidas en la Tabla 8. Cabe destacar que, dichos valores presentan una gran dispersión. Esto se debe a la micro-porosidad inherente al proceso de fabricación de la HA densa, así como al tamaño de grano, las impurezas presentes y la distribución de fuerzas del material. Por otro lado, se observa que la resistencia óptima se obtiene para la relación Ca/P de 1.67 [10, 107].

Capítulo 1

Tabla 8. Propiedades mecánicas de la HA densa [10, 107].

Propiedades mecánicas de la HA densa	
Resistencia a compresión (MPa)	120-900
Resistencia a flexión (MPa)	38-250
Resistencia a tracción (MPa)	38-300
Módulo de Young (GPa)	35-120
Dureza Vickers (GPa)	3-7
Módulo de Weibull	5-18
Tenacidad a fractura (MPa·m ^{1/2})	0.8-1.2

Otro de los factores que más influyen en las propiedades mecánicas es la temperatura del proceso de sinterizado. A mayor temperatura, se obtienen mayores resistencias de compresión, flexión, torsión y módulo de elasticidad. Cabe destacar que, para temperaturas comprendidas entre los 1000-1100 °C, la HA muestra propiedades de superplasticidad, con un mecanismo de deformación basado en el deslizamiento de los límites de grano [10, 107]. La Tabla 9 muestra la variación de estas propiedades en función de la temperatura empleada en el tratamiento térmico.

Tabla 9. Propiedades mecánicas de la HA sintética tras el proceso de sinterizado a diferentes temperaturas [111].

Temperature (°C)	Compressive strength σ_C (MPa)	Flexural strength σ_F (MPa)	Torsional strength τ_{ST} (MPa)	Dynamic torsional strength τ_{DY} (MPa)	Modulus of elasticity in compression E_C (GPa)	Modulus of elasticity in bending E_B (GPa)
1150	308 ± 46	61 ± 8	50 ± 7	57 ± 6	42.2 ± 3.8	44.3 ± 3.5
1200	415 ± 46	104 ± 11	62 ± 5	92 ± 6	74.6 ± 4.1	80.0 ± 6.4
1250	465 ± 58	106 ± 10	75 ± 4	76 ± 5	79.0 ± 4.8	85.1 ± 6.1
1300	509 ± 57	113 ± 12	76 ± 5	68 ± 5	81.4 ± 4.6	87.8 ± 6.0

La HA porosa, por su parte, presenta peores propiedades mecánicas (Tabla 10), como una peor resistencia a fatiga. Sin embargo, resulta ser mejor que la densa en cuanto a ser más osteoconductora y más fácilmente reabsorbible.

Tabla 10. Comparación entre las propiedades mecánicas de la HA densa y la HA porosa [10, 107].

Comparación de propiedades mecánicas de la HA	Densa	Porosa
Resistencia a compresión (MPa)	120-900	2-100
Resistencia a flexión (MPa)	38-250	2-11
Resistencia a tracción (MPa)	38-300	3

Los poros tienen la función de puntos de anclaje para el hueso, favoreciendo a su vez que el tejido óseo crezca hacia el interior del implante [10]. Al igual que se ilustró para los sustratos metálicos, la fracción volumétrica, el tamaño y morfología de los poros son factores determinantes para la correcta osteointegración [56] (Figura 14).

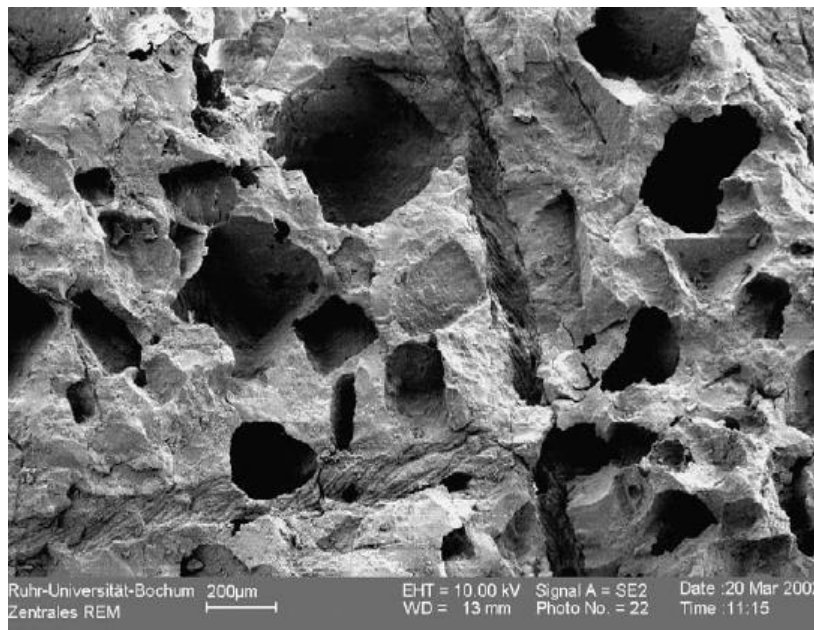


Figura 14. Imagen SEM de la HA con rango de tamaño de poro 250-400 µm [56].

A su vez, la porosidad influye de manera crítica en la resistencia y en la tenacidad de fractura, disminuyendo ambas propiedades al aumentar la fracción volumétrica de poros. En el caso de la resistencia, este decremento tiene una forma

Capítulo 1

exponencial, mientras que la tenacidad de fractura disminuye de manera lineal (Figura 15).

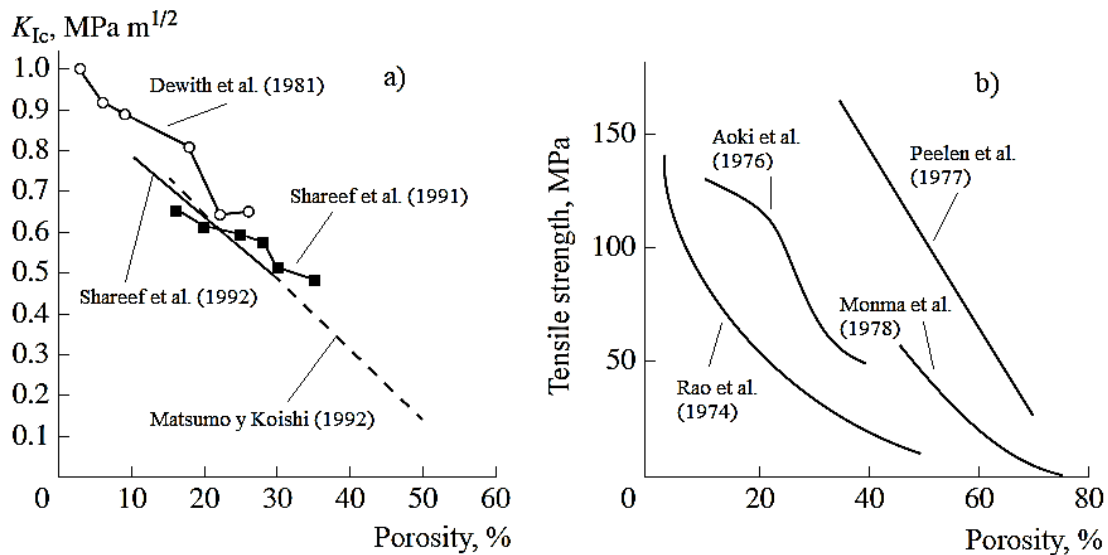


Figura 15. Influencia de la porosidad en la (a) tenacidad a fractura y (b) resistencia a tracción [10, 107].

Algunas de las soluciones existentes para la mejora de la resistencia de la HA porosa consisten en el empleo de fibras cerámicas, como son por ejemplo, la obtención de un andamio de HA poroso mediante el sinterizado de fibras β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, seguido a un procesado en sales fundidas; el proceso de sinterizado de fibras de HA o tratamiento hidrotermal de α -fosfato de tricalcio, o la densificación dinámica de fibras de ortofosfato de calcio y metafosfato de β -calcio [107].

b) Aplicaciones principales de la HA

El campo de aplicación biomédica de la HA resulta ser bastante amplio, comprendiendo fracturas mandibulares e implantología dental, reborde alveolar, reconstrucción de huesos faciales, artrodesis (fijación por cirugía de articulaciones) y sustitución total o parcial por prótesis, como por ejemplo en otorrinolaringología [112].

En general, se emplea principalmente en ortopedia, odontología y oftalmología. Sin embargo, su uso está limitado en función del origen de ésta. Así, la HA coralina se

suele utilizar en oftalmología, mientras que la HA humana, porcina y bovina se emplean en ortopedia. Sin embargo, ninguno de los casos anteriores es recomendable en odontología [11].

La HA densa se usa comúnmente en el control de la presión arterial y la glucemia, mientras que la porosa tiene gran aplicación como relleno de defectos óseos, en la administración y dosificación de fármacos, en el aumento de la cresta alveolar y en la reconstrucción ortognática [10, 107].

Uno de los productos comerciales de HA porosa se conoce bajo el nombre de Endobon®, fabricada a partir de hueso trabecular natural, en la que previamente se eliminan los componentes orgánicos del hueso esponjoso y convirtiendo los componentes inorgánicos y minerales en HA mediante un proceso hidrotérmico [108].

Otra de las aplicaciones más interesantes y conocidas de la HA, es su utilización como recubrimiento de otros materiales. Este uso se trata ampliamente en el punto siguiente.

c) Recubrimientos bioactivos HA

La alta bioactividad [114], biocompatibilidad y similitud con el tejido óseo natural de la HA [21] son la causa de su amplio uso como recubrimiento de implantes metálicos [109], así como de carbono, cerámicas sinterizadas, como la zircona y la alúmina, y de polímeros tales como el polimetilmetacrilato (PMMA) [10].

En general, la HA como recubrimiento se emplea sobre materiales biometálicos, ya que la función que emplean es meramente estructural, aportando así una mayor resistencia mecánica y tenacidad a la HA [109]. Esta última, por su parte, acelera el proceso de adhesión del hueso a la prótesis, a la vez que mejora la resistencia del metal a la corrosión [10] y controla la disolución de iones metálicos al medio corporal [22]. En este contexto, a mayor bioactividad, mayor interconexión implante-hueso y una mayor capacidad en la absorción de proteínas [10, 109, 115].

Capítulo 1

La respuesta del implante depende del grosor de la capa de HA, el cual, a su vez, influye en el grado de cristalinidad y la reabsorción. Si la capa es demasiado gruesa, puede desmoronarse fácilmente, aunque reduce la liberación de iones metálicos al cuerpo humano [10]. Por el contrario, un espesor fino puede reabsorberse a una velocidad mayor que a la que se integra el implante [109]. Por lo general, los espesores óptimos se encuentran en un rango de 25-100 μm , siendo los de uso comercial en torno a 50-70 μm [109].

La delaminación de los recubrimientos de HA es aún uno de los grandes problemas que presenta este material, consecuencia de factores tales como la diferencia del coeficiente de expansión térmica entre la HA, el substrato metálico y las zonas de vacío, la fatiga, etc. Un aumento de las zonas de vacío entre el substrato y el recubrimiento conlleva una mayor fragilidad del sistema en cuanto a la separación de ambos componentes. El número de estas zonas de vacío depende de la técnica de recubrimiento empleada. Para solventar este problema, una de las soluciones propuesta es la utilización de una capa intermedia de materiales como vidrio bioactivo o silicato de calcio (Ca_2SiO_4) [10], o incluso el empleo de capas de circonia (ZrO_2) u óxido de titanio (TiO_2) [21-23], de forma que se mejora la adhesión. Otra de las causas principales de la delaminación es la existencia de micromovimientos entre el implante-hueso, de forma que la capa de HA se fija al tejido óseo y se separa del substrato [109].

c.1) Características de los recubrimientos de HA

El recubrimiento de HA debe tener una porosidad baja, presentar una buena adhesión al substrato y una cristalinidad de media a alta, así como poseer una estabilidad mecánica, química y de fase para obtener una buena bioactividad [109]. La estabilidad química resulta ser de suma importancia, ya que su disolución en fluido fisiológico a corto plazo, así como posibles reacciones con el metal, pueden producir elementos citotóxicos que influyan de forma negativa a las propiedades mecánicas del material.

En cuanto al sustrato sobre el que se deposita el recubrimiento, se desea una irregularidad a nivel macro y microscópico, ya que mayor superficie implica mejor adhesión. Además, recientes estudios *in vitro* han demostrado que una rugosidad media-alta favorece la proliferación y diferenciación celular. Por el contrario, una rugosidad excesivamente alta tiene el efecto opuesto [109].

d) Técnicas de recubrimientos de HA

El método de deposición de recubrimientos idóneo depende principalmente de la aplicación que tenga el dispositivo posteriormente, ya que se conferirán características determinadas [20]. Entre las técnicas más empleadas, destacan el *plasma-spray* y la pulverización iónica [116], siendo la primera aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) para su uso en aplicaciones biomédicas [22]. Sin embargo, también se encuentran otras técnicas como son la deposición electroforética o electroforesis (*ElectroPhoretic Deposition*, EPD) [117, 118], deposición electroquímica o deposición catódica (*Electrochemical or Cathodic Deposition*, ECD) [5], deposición por láser pulsado o ablación láser (*Pulsed Laser Deposition*, PLD, o *Laser Ablation Deposition*, LAD) [5, 119], recubrimientos biomiméticos (*biomimetics*, *bionics* o *biomimicry*) [5], prensado isostático en caliente (*Hot Isostatic Pressing*, HIP) [120] y la técnica de sol-gel, empleada en la presente Tesis Doctoral.

d.1) Sol-gel

Esta técnica puede englobarse dentro de los métodos químicos húmedos, ya que consiste en la transformación de un líquido (sol) en un gel, implicando así dos etapas distintas: solución y gelificación [1]. El sol consiste en una solución coloidal de partículas en el seno de un líquido, de tamaño entre 1 y 1000 nm. Debido a su pequeño tamaño, son las cargas superficiales y las fuerzas de corto alcance las que dominan la interacción de estas partículas. Las partículas empleadas suelen ser sales inorgánicas o compuestos organo-metálicos [5].

Por su parte, el gel es una fase sólida, formada por una red interconectada de partículas a lo largo de una fase continua, usualmente líquida [1, 5, 121]. La

Capítulo 1

transición del sol al gel tiene lugar a través de la hidrólisis y de la policondensación de los precursores metálicos [121] (Figura 16). Una vez formado el gel, se procede a su secado para la obtención de xerogeles (exposición a bajas temperaturas), aerogeles (condiciones supercríticas) o su deposición como recubrimientos (Figura 16) [1, 121].

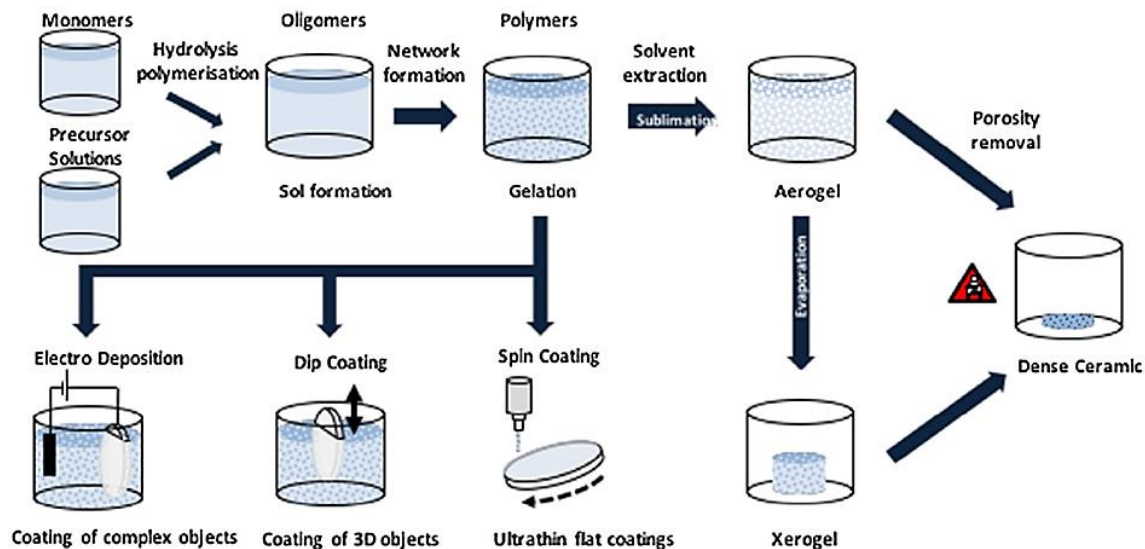


Figura 16. Vías de síntesis de sol-gel [1].

Los distintos parámetros que pueden afectar a dichas reacciones son la estructura y concentración de los reactivos, los catalizadores y disolventes, así como la temperatura y la velocidad del proceso [1, 121].

La técnica de sol-gel ha desarrollado un gran potencial en el área de las biocerámicas en su aplicación como recubrimiento de sustratos metálicos. Entre las razones principales, se encuentran la alta biocompatibilidad, la reducción de la corrosión y liberación de iones por parte del metal, y la mejora de las propiedades biológicas del mismo, promoviendo una osteoconducción y curación del tejido dañado aceleradas [1, 121]. En este contexto, se han desarrollado recientemente ciertas modificaciones de cara a la mejora de la calidad del recubrimiento, como la adición de poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) para conferir porosidad al mismo o la de nanotubos de carbono que optimicen las propiedades mecánicas [22].

El desarrollo de esta técnica ha posibilitado la obtención de una gran diversidad de materiales, como los basados en sílice (BG) [1, 122-125], en fosfatos (materiales reabsorbibles) [126-132], metales (Fe-O, Ti-O, Zn-O) [1, 133-137], híbridos orgánicos e inorgánicos (formados por fases distintas donde tienen lugar distintas reacciones químicas) [1, 138], y basados en fosfatos de calcio (CaP) [1].

Entre los fosfatos de calcio más comunes sintetizados por esta técnica destaca, como se ha comentado antes, la HA. Se genera a partir de la mezcla a nivel molecular de precursores de calcio y de fósforo, mejorando la homogeneidad química del mineral a comparación de otras técnicas convencionales como la precipitación húmeda, la síntesis hidrotermal y las reacciones de estado sólido [139, 140]. La ausencia de un medio anhidro, característico de las rutas basadas en alcóxidos, minimiza la precipitación de fases CaP indeseables, focalizándose así en la especie deseada [1, 121]. En cuanto a la temperatura del proceso, esta depende de los precursores empleados, en términos de actividad y naturaleza química. Entre los precursores del fósforo más destacados se encuentran el trietilfosfito y el trietilfosfato [139, 140]. Sin embargo, este último conlleva una cinética de formación de HA pobre, requiriendo un tiempo prolongado de reacción y alta temperatura de solución.

d.2) Formación de HA por sol-gel y sus ventajas

Dentro de la técnica de sol-gel, existen distintas variantes para la producción de HA. Estas variantes comprenden desde el método propiamente dicho [141, 142] hasta los precursores de fósforo (trietilfosfito [141, 142], pentóxido de fósforo [21]) y calcio (nitrato de calcio tetrahidratado [142, 143]) empleados. En general, se suele usar como disolvente agua o etanol [22].

La formación de HA tiene lugar tras cinco etapas. La primera de ellas es la **hidrólisis y policondensación** de los precursores. Para ello, se emplean metales alcóxidos (MOR), formados por un metal (M), un óxido (O) y un grupo alcalino (R). Los metales se disuelven en alcohol y se hidratan añadiendo agua, de forma que las moléculas

Capítulo 1

hidratadas se unen mediante condensación repetidas veces hasta formar el *sol* (M-O-M).

Seguidamente, tiene lugar la **gelación**, donde las partículas coloidales del *sol* se unen de forma gradual hasta obtener una red tridimensional que alcanza un tamaño macroscópico (gel). Por otro lado, la evaporación del disolvente implica también el desarrollo de esta etapa.

La tercera etapa, denominada **envejecimiento**, conlleva la variación de las propiedades del gel, debido a una policondensación prolongada, la disolución y la reprecipitación de monómeros y oligómeros.

La **deshidratación** del gel es el cuarto paso, de forma que se obtiene un gel seco, así como la correspondiente contracción de este. Es importante el control de este punto del proceso, ya que pueden aparecer tensiones residuales y deformaciones.

Finalmente, el gel amorfo experimenta una **densificación y una cristalización**, con el fin de obtener un material con porosidad reducida y con estructura cristalina. Para ello, el gel se sinteriza mediante un tratamiento térmico [96].

De entre las numerosas ventajas que ofrece la técnica de sol-gel, permite a parte de la formación de HA, el depositarla como recubrimiento, obteniendo una capa fina y químicamente homogénea gracias a procesos que tienen lugar a escala nanoscópica [141-143]. En cuanto al grosor de la capa, puede asemejarse al obtenido por deposición catódica (alrededor de 1 μm) [141].

En cuanto al coste, resulta ser una técnica económica y sencilla, a diferencia de otras nombradas anteriormente, como el plasma-espray [144]. Por otro lado, permite realizarse a bajas temperaturas gracias al pequeño tamaño de partícula, de forma que permite el uso de materiales que se degradan o alteran a temperaturas altas, así como la inclusión de biomoléculas, proteínas, medicamentos, etc. Asimismo, evita el agrietamiento y la existencia de tensiones residuales en el caso de recubrimientos, consecuencias derivadas de las diferencias del coeficiente de dilatación térmica (TEC) de sustrato y recubrimiento [1].

Otra de sus ventajas es que permite realizar recubrimientos sobre formas complejas e irregulares, con mayores fuerzas de adhesión al sustrato que los recubrimientos biomiméticos [21, 22, 143]. La resistencia, así como la posibilidad de controlar la microestructura y composición de la capa obtenida, permiten obtener la porosidad, morfología, tamaño y otras características de la superficie que se deseen [1].

La técnica de sol-gel consigue grandes niveles de biocompatibilidad, gracias a la superficie específica (lo que permite la posible liberación dosificada de medicamentos), y a su riqueza química, que posibilita la funcionalización mediante biomoléculas adecuadas [1].

d.3) Técnicas de deposición vía sol-gel

Entre las técnicas de deposición, destacan principalmente el recubrimiento por inmersión y el recubrimiento por centrifugación [121].

- *Recubrimiento por inmersión*

Esta técnica, conocida como *dip coating*, ha sido ampliamente estudiada para recubrir materiales biometálicos, ya que mejora la adhesión [22]. Consta de tres etapas. La primera de ellas es la **inmersión en el sol** (Figura 17-1), para retirarlo posteriormente a una velocidad controlada de pocos cm/min (**extracción**, Figura 17-2) [5, 21, 121]. Gracias a la velocidad de extracción, así como al número de inmersiones y a la concentración del sol es posible controlar el espesor de la capa (en torno a 0.05-15 mm) [22]. Finalmente, tiene lugar el **secado** (Figura 17-3) y sinterizado de la muestra, densificando así el recubrimiento adherido al sustrato mediante un tratamiento térmico.

Capítulo 1

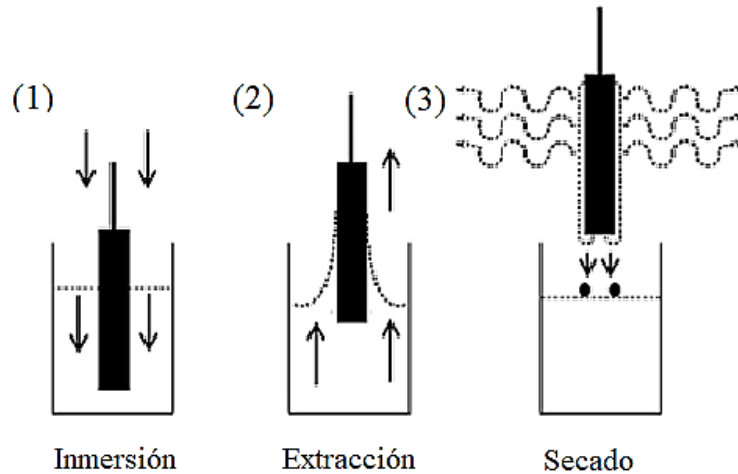


Figura 17. Etapas del recubrimiento por inmersión (1) inmersión, (2) extracción y (3) secado [21, 22].

Es una técnica sencilla y rápida, de bajo coste y que permite una buena homogeneidad del revestimiento a superficies irregulares [21, 22].

- Recubrimiento por centrifugación

El recubrimiento por centrifugación (*spin coating*), permite aplicar capas finas a sustratos planos (discos o placas) mediante un equipo llamado *spin coater* o *spinner* [145]. Actualmente es una técnica en desarrollo, al contrario que la técnica de recubrimiento por inmersión.

Tiene dos variantes. La primera, consiste en verter la solución sobre el sustrato mientras éste gira. La segunda, por su parte, es similar al *dip coating* explicado anteriormente, con la salvedad de que, en la etapa de extracción, el sustrato se extrae a una velocidad controlada al mismo tiempo que gira gracias a la acción de un motor. Esta última es conocida como método de inmersión y centrifugación.

En ambas variantes, tienen lugar cuatro etapas principales: **deposición, centrifugado, escisión y evaporación** (Figura 18). La evaporación del disolvente y el drenaje rotacional son los que provocan la deposición propiamente dicha. Finalmente, es necesario someter a la muestra a un tratamiento térmico para el

sinterizado del recubrimiento. Para controlar el grosor de la capa, el proceso puede ser repetido reiteradas veces [5].

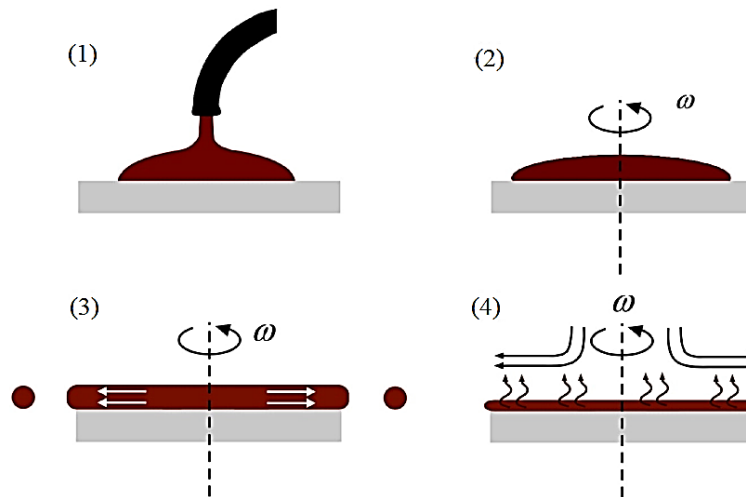


Figura 18. Etapas de la deposición de recubrimiento por centrifugación. (1) deposición, (2) centrifugado, (3) escisión y (4) evaporación [5].

e) Combinaciones de HA con otros materiales

El campo de los composites basados en HA resulta ser muy amplio, abarcando desde las cerámicas hasta los polímeros [10, 107].

En el caso de los composites cerámicos basados en HA, se aumentan sus propiedades mecánicas (dureza y resistencia), implicando también como efecto indeseable el aumento del módulo de Young [10]. Además, el hecho de introducir elementos externos en la matriz de HA puede disminuir la bioactividad, influir de manera negativa en la biocompatibilidad y facilitar la descomposición del HA en fosfato de calcio.

La circona con pequeñas partículas de itrio ($ZrO_2(Y_2O_3)$) mejora la resistencia de la HA, aumentando la resistencia a flexión y la tenacidad a fractura con el contenido en ZrO_2 . Sin embargo, su uso está limitado debido a que el calcio de la HA estabiliza la circona durante el proceso de sinterizado [107].

Capítulo 1

Los composites con vidrios bioactivos, por el contrario, mejoran las propiedades mecánicas sin comprometer la bioactividad y la biocompatibilidad, aunque presentan también como inconveniente al promover la descomposición de la HA en grandes cantidades de fosfato cálcico. No obstante, los composites cerámicos basados en HA no tienen aún gran aplicación biomédica, debido a sus dificultades de fabricación y de las limitadas propiedades mecánicas que poseen.

Los composites poliméricos, por el contrario, poseen una gran variedad de combinaciones distintas con sus correspondientes propiedades. En general, aumentando el contenido de HA, se incrementa el módulo de Young, así como la bioactividad. Sin embargo, la ductilidad disminuye.

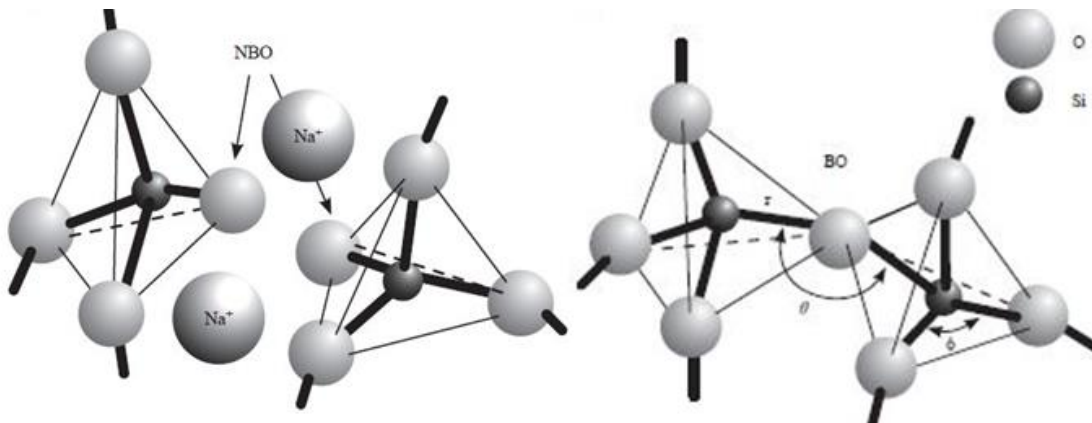
Un ejemplo de estos composites poliméricos es la combinación HA/PE (polietileno). Se caracteriza por tener una transición dúctil-frágil con un contenido en volumen del 40-45 % de HA y un módulo de Young de 1-8 GPa. En este tipo de sistemas, se observa que la tenacidad a fractura alcanza valores mayores para contenidos por debajo del 40 % de HA que los del hueso cortical, siendo similares al mismo para un contenido entre el 40-45 %. Sin embargo, cabe destacar que estos compuestos no son biodegradables, y que al ser parcialmente bioinertes, se inhibe en cierta medida la unión implante – hueso [10, 107].

Otro de los composites poliméricos más conocidos es el HA/colágeno, cuya composición es muy similar a la del hueso. En conjunto, este composite presenta una osteoconducción mayor que la HA o el colágeno de manera individual. Como ventaja, cabe destacar su biodegradabilidad, así como su posibilidad de ser controlada. Con respecto a sus deficientes propiedades mecánicas [10], presenta un bajo módulo de Young (2 MPa) y una resistencia a tracción de unos 6.5 MPa [107]. Este composite suele ser muy efectivo al emplearse como relleno de defectos en huesos largos.

Vidrio bioactivo

a) Características principales de los vidrios bioactivos

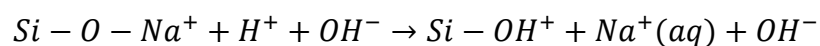
Los vidrios bioactivos comprenden una gran variedad, compuestos principalmente por un sistema de $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ [20], siendo su estructura atómica la representada en la Figura 19. El primero de ellos se conoce como Bioglass® 45S5, descubierto por L. Hench en 1969 [146].



*Figura 19. Unidades estructurales básicas de SiO_4 , constituidas por enlaces Si-O-Si. *NBO sin puentes de hidrógeno, BO con puentes de hidrógeno [146].*

La principal característica de este tipo de biomateriales es su capacidad de precipitar HA en la superficie del vidrio cuando se pone en contacto con fluido fisiológico, haciendo posible la unión con el tejido óseo. Químicamente, la HA que se forma es muy similar a la del hueso, favoreciendo así la osteointegración del implante.

La formación y precipitación de HA sobre el vidrio bioactivo tiene lugar en cinco pasos principales. En primer lugar, se produce un intercambio rápido de iones Na^+ o Ca^{2+} con H^+ en la solución (Ecuación 1), de forma que se crean uniones de silanol (Si-OH) en la superficie del vidrio, donde además se incrementa el pH [25].



Ecuación 1. Intercambio de iones y formación de uniones silanol en la precipitación de HA sobre la superficie de vidrio bioactivo

Capítulo 1

El pH alto conlleva que los iones OH^- rompan la red de sílice (Si-O-Si). De esta forma, se produce un aumento de Si-OH en la interfase vidrio-solución, de forma que posteriormente tiene lugar la condensación de estos en la superficie del vidrio (polimerización de la capa rica en sílice). Seguidamente, tiene lugar una migración de los grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} , formando una película rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ en la capa de sílice. A partir de este momento, se incorporan hidroxilos y carbonatos desde la solución, formándose así la HA tras la cristalización de la película generada [25].

En cuanto a la adhesión ósea, tiene lugar tras la adsorción de proteínas por la propia capa de HA, de forma que las células comienzan a unirse para posteriormente diferenciarse y formar la matriz ósea [25].

a.1) Bioactividad

La composición del vidrio tiene un papel primordial en la formación de HA y, por tanto, en el grado de bioactividad. En este contexto, bajos contenidos en silicio implican una mayor disolución del vidrio, como consecuencia de una menor conexión de la red de sílice y una mayor facilidad en su rotura [25].

La Figura 20 muestra la variación en la composición de la superficie del vidrio bioactivo sobre la que se deposita la HA. Se genera una estructura multicapa, en la que en la parte interna el contenido en Si es mayor, mientras que en la interfase vidrio bioactivo-SBF aumenta el contenido en Ca y P [20].

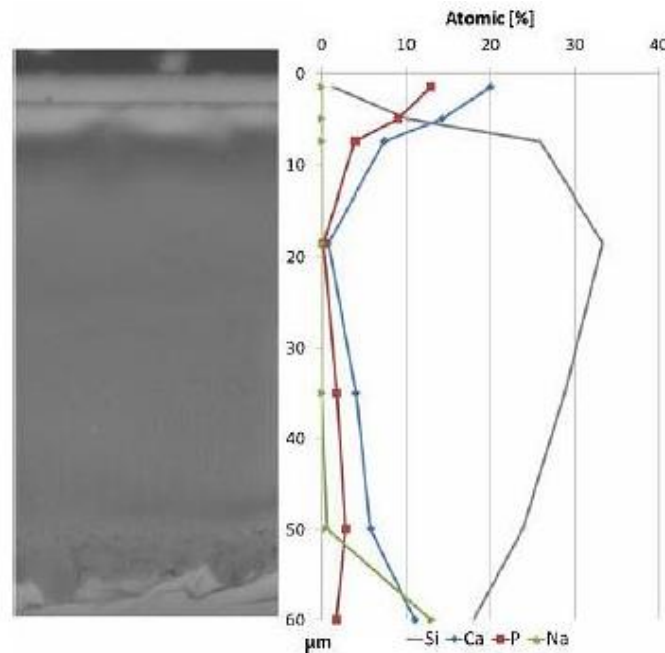


Figura 20. Sección de una muestra maciza de vidrio bioactivo tras 2 semanas de inmersión en fluido fisiológico simulado (SBF): imagen SEM (izquierda) y su correspondiente microanálisis EDS (derecha) [20].

El vidrio bioactivo, a diferencia del resto de biomateriales, presenta no sólo la capacidad de osteoconducción, sino también la de osteoinducción. La primera se caracteriza por lograr el crecimiento celular a partir de células ya existentes, mientras que la segunda genera nuevas células óseas en la intercara implante-hueso.

Por otro lado, presenta otras propiedades, como favorecer la neovascularización (formación de nuevos vasos sanguíneos) [147]. Este hecho resulta ser crucial en la formación de nuevo tejido. En concreto, el cobre ha demostrado promover la neovascularización, por lo que ha considerado su inclusión en matrices de vidrio bioactivo. De esta forma, conforme el vidrio se disuelve, los iones cobre se liberan favoreciendo así la creación de nuevos vasos [148]. Otras de las características que presentan son la capacidad antiinflamatoria y antibacteriana [147], disminuyendo así el riesgo de infecciones que conlleva el uso de implantes, y, por tanto, su fallo [149].

Capítulo 1

a.2) Propiedades mecánicas

Los implantes requieren un buen comportamiento mecánico una vez que se encuentran en el interior del cuerpo humano, ya que están sometidos a multitud de cargas externas. Sin embargo, los vidrios bioactivos, en tanto que materiales cerámicos, presentan unas propiedades mecánicas deficientes, comprometiendo así su empleo y aplicaciones [147]. Presentan una alta fragilidad, pudiendo ocasionar la fractura del implante. Debido a ello, se suelen emplear como estructuras porosas (*scaffolds*) cuya función es la regeneración de tejido óseo, siempre y cuando no exijan elevadas propiedades mecánicas. A título de ejemplo, algunas de las propiedades mecánicas del BG bioactivos quedan recogidas en la Tabla 11.

Debido a las limitaciones mecánicas que poseen estos biomateriales, la ingeniería de diseño de implantes ha optado por emplearlos como recubrimientos de materiales metálicos, de forma que se aprovechan tanto las propiedades mecánicas del metal como las propiedades bioactivas de los vidrios para obtener una buena osteointegración. Sin embargo, existe aún un inconveniente a resolver: la unión deficiente entre recubrimiento y substrato en la intercara.

Tabla 11. Propiedades mecánicas del Bioglass® 45S5 [150].

Propiedad	Valor
Resistencia a la flexión	41 MPa
Tenacidad a la fractura	0.57 MPa·m ^{1/2}
Dureza	620 HV
Módulo de Young	37 GPa

a.3) Rugosidad superficial

La superficie específica, porosidad del vidrio y tamaño de partícula generan una determinada rugosidad superficial de los vidrios bioactivos, que se encuentra estrechamente ligada a la bioactividad. Mayor rugosidad en los vidrios bioactivos

conlleva mayor bioactividad. Como se ha expuesto previamente, una gran liberación de iones Si y Ca en presencia de SBF, así como de los grupos Si-OH en la superficie del material implican una deposición mayor de HA. En este contexto, la topografía del material juega un papel muy importante, ya que materiales con nano-topografía frente a una topografía a escala micro, alcanzan niveles mayores en cuanto a la liberación de iones y de grupos silanol, generando así un mayor grado de nucleación de HA en la superficie [151].

El control de la porosidad del vidrio lleva implícito, en mayor o menor medida, el control de la rugosidad. Así, por ejemplo, la fabricación de vidrio poroso por el método de sol-gel, origina una cierta rugosidad que además puede ser controlada de forma más rigurosa mediante la adición de un ácido.

En el caso de los *scaffolds*, no sólo se puede controlar la porosidad, sino también la morfología del vidrio (*robocasting, freeze extrusion fabrication*) y el propio proceso de sinterizado (*selective laser sintering*). La fabricación aditiva resulta ser una técnica capaz de generar diseños con geometrías complejas, capaces de dirigir el crecimiento del hueso y permitir la vascularización [148]. La Figura 21 muestra un ejemplo de un *scaffold* de vidrio bioactivo fabricado mediante esta técnica.

Capítulo 1

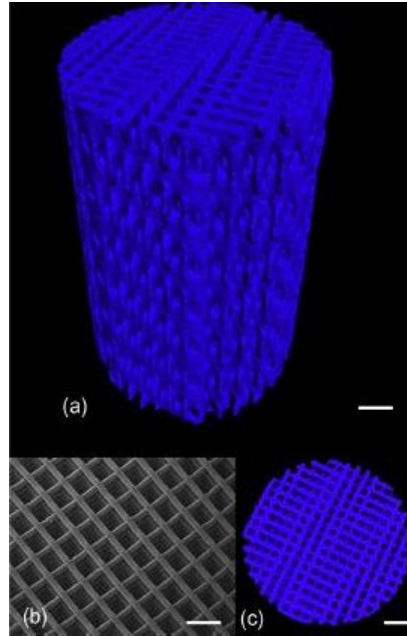


Figura 21. Scaffold de vidrio bioactivo realizado mediante fabricación aditiva [152].

a.4) Tipos de vidrios bioactivos

Existe una amplia variedad de vidrios de distinto carácter reactivo y propiedades. En este contexto, la bioactividad de los vidrios depende fuertemente de su composición, tal y como muestra el diagrama de la Figura 22.

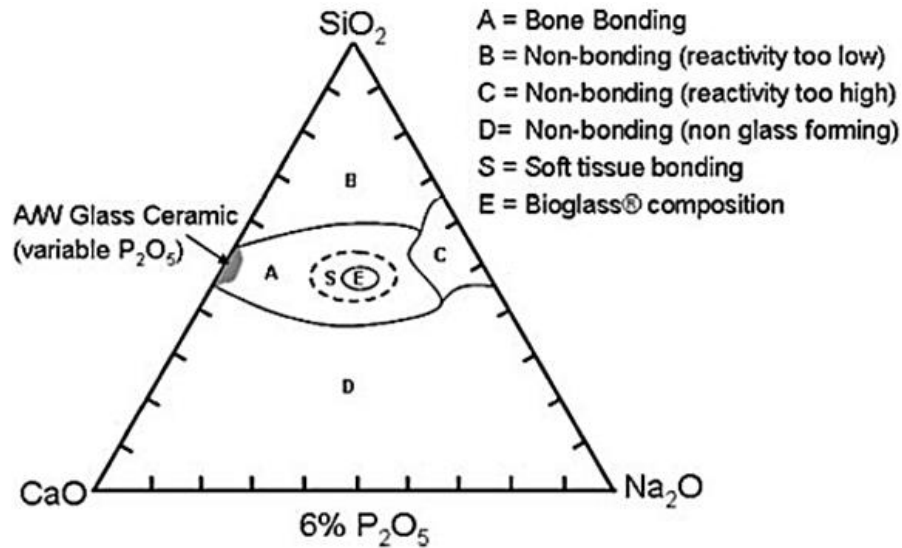


Figura 22. Clasificación de los vidrios bioactivos según su bioactividad atendiendo al diagrama ternario de composición $Na_2O - SiO_2 - CaO$ [153].

Principalmente existen 3 clases de vidrios bioactivos, que se diferencian en función de composición. Entre ellos, se encuentran los vidrios de base sílice (Bioglass® 45S5, 13-93, 6P57), los de base boro (13-93B1, 13-93B3) y los de base fósforo (P₅₀C₃₅N₁₅).

Vidrios de base sílice

Fueron los primeros en aparecer, y su red consiste en una base de óxido de silicio o sílice. Dentro de esta clasificación, el más ampliamente estudiado ha sido el Bioglass® 45S5 (Tabla 12). A pesar de sus buenas propiedades como biomaterial, presenta algunos inconvenientes, como la dificultad de ser procesado en forma de *scaffolds* debido a la cristalización que se produce [148]. Para solucionar estas limitaciones, se procede a la modificación de la composición del vidrio, incrementando la alcalinidad mediante la adición de pequeñas cantidades de flúor y sustituyendo el potasio por sodio, de forma que se reduce la tendencia a la cristalización [154].

Otros vidrios bioactivos de base sílice que se pueden destacar son el 13-93 (Tabla 12), característico por un mayor contenido en sílice y MgO, de manera que reduce

Capítulo 1

la diferencia de coeficiente de dilatación térmica (TEC) pero disminuye la bioactividad. Por su parte, el BG_Ca (Tabla 12), el cual presenta una menor tendencia a la cristalización debido a una mayor relación relativa de CaO frente a Na₂O para el 45S5 [57], además de tener una disolución más homogénea, con valores de pH óptimos para la adhesión, proliferación y diferenciación celular y no presentar grietas [155]. Por último, los vidrios bioactivos 6P (Tabla 12) se caracterizan por tener un 6 % de P₂O₅ fijo, consiguiendo mantener unas buenas propiedades mecánicas al emplearse como recubrimientos [156-158].

Vidrios en base boro

Este tipo de vidrios bioactivos se originan mediante el reemplazo total o parcial de la sílice por óxido de boro (B₂O₃). Debido a ello, se degradan más rápido que los de base sílice, siendo la conversión del vidrio a HA de forma similar [148]. Entre estos vidrios, destacan el 13-93B y el 45S5-B3 (procedentes del 13-93 y del 45S5, Tabla 12).

La degradación de estos vidrios provoca una conversión más rápida a HA, pero a su vez, implica una liberación mayor de iones borato al medio, lo que conlleva cierta inhibición de la proliferación celular [159].

Vidrios en base fósforo

Los vidrios en base fósforo consisten en una red formada por P₂O₅, con CaO y Na₂O como modificadores. Al igual que con los vidrios en base boro, permiten el control de la velocidad de degradación, pudiendo variar desde unas horas hasta semanas. De esta forma, se controla también la bioactividad. Un ejemplo que destacar dentro de este grupo es el P50C35N15 (Tabla 12).

Estos vidrios tienen la posibilidad de ser obtenidos en fibras cuando el contenido molar de P₂O₅ es mayor del 45 %. La fabricación en fibras permite su uso en la reconstrucción de tejido blando. Además, este tipo de vidrio bioactivo presenta capacidades antibacterianas gracias a la adición de partículas de cobre, plata o galio, que se liberan conforme el vidrio se degrada [160].

Tabla 12. Composición en peso de vidrios bioactivos [148, 156, 161].

% en peso	SiO ₂	Na ₂ O	K ₂ O	MgO	CaO	P ₂ O ₅	B ₂ O ₃
BG ® 45S5	45.0	24.5	0.0	0.0	24.5	6.0	0.0
13-93	53.0	6.0	12.0	5.0	20.0	4.0	0.0
BG_Ca	47.3	4.3	0.0	0.0	45.6	2.6	0.0
13-93B1	34.4	5.8	11.7	4.9	19.5	3.8	19.9
13-93B3	0.0	5.5	11.1	4.6	18.5	3.7	56.6
6P57	56.5	11.0	3.0	8.5	15.0	6.0	0.0
6P68	67.7	8.3	2.2	5.7	10.1	6.0	0.0
P50C35N15	0.0	9.3	0.0	0.0	19.7	71.0	0.0

b) Aplicaciones de los vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos son comúnmente empleados en la ingeniería tisular (mantenimiento, restauración y mejora de tejidos dañados) y la medicina regenerativa (auto-reparación y recreación de células, tejidos y órganos) [162].

En este contexto, se usan ampliamente en regeneración de tejido óseo, empleando *scaffolds* como plantillas temporales que sean porosos y con propiedades mecánicas a las del tejido óseo cortical [152]. Sin embargo, en regeneración de tejido blando su aplicación apenas ha sido desarrollada.

Estudios recientes han demostrado que el vidrio bioactivo promueve la angiogénesis, algo fundamental en la regeneración de tejido blando [148]. Sin embargo, para la correcta funcionalidad en la consecución de este objetivo, se necesitan dos requisitos indispensables en los que el colágeno tiene un papel imprescindible: una unión interfacial del vidrio con el mismo que sea rápida y estable de larga duración, de forma que se eviten los micro-movimientos y como consecuencia, la inflamación [163]. El uso de vidrios en forma de fibras para la regeneración de tejido blando permite la reconstrucción de músculos o ligamentos, por lo que los vidrios en base fósforo son más adecuados que los de base sílice para este tipo de aplicaciones [160].

Capítulo 1

Otra de las aplicaciones más conocidas es su empleo como elemento antibacteriano, ya que tienen la capacidad de liberar iones catódicos que eliminan algunos microorganismos como consecuencia del elevado pH [164]. Sin embargo, aún es necesario el estudio del efecto que estos iones pueden provocar en otros tipos de células [25].

Otra opción ampliamente considerada es la inclusión de iones de cobre y plata, de forma que se liberan conforme el vidrio se degrada. En este contexto, pueden evitar el suministro de antibióticos y prevenir infecciones propias de la cirugía de implantes [160, 165, 166].

c) Formas de aplicación de los vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos suelen presentarse en distintas formas. Las más comunes son los *scaffolds*, partículas o como películas (recubrimiento), aunque recientemente están experimentando cierto desarrollo en el campo de los nanomateriales.

c.1) Scaffolds

Los *scaffolds* (traducido como andamios), son estructuras que actúan como plantillas para la formación y/o reemplazo de tejidos que estén dañados o enfermos en el organismo. Pueden ser cultivados *in vitro* para introducirlos posteriormente en el lugar dañado o, por el contrario, implantados directamente para inducir la regeneración de tejido (*in vivo*) [162, 167].

Uno de los objetivos principales de los *scaffolds* es permitir que las células creen su matriz extracelular y vayan reemplazando el lugar que ocupan, para lo cual interesa que sean biodegradables. Esto implica la necesidad de poseer unas propiedades mecánicas adecuadas al lugar anatómico en el que se implantan. Por otro lado, al degradarse, no deben liberar compuestos tóxicos que afecten a los órganos circundantes. Además, requieren de una alta porosidad y porosidad interconectada, que garantice la penetración y una buena distribución celular [167].

Se suelen emplear en la regeneración de tejidos de la piel, vejiga, vías respiratorias, cartílago y hueso [167].

c.2) Partículas de vidrio bioactivo

Las partículas de vidrio bioactivo se suelen usar en cirugía ortopédica y odontología. Son excelentes reparadores de defectos óseos, ya que tienen la capacidad de regenerar el propio tejido. El tamaño de las partículas se encuentra entre las 90-710 μm , y su empleo comenzó a sustituir la técnica del autotrasplante. Algunos de estos productos son comercialmente conocidos como PerioGlass®, NovaBone® y NovaMin® [25].

c.3) Recubrimientos

El empleo de los vidrios bioactivos como recubrimientos de materiales metálicos, solventa las limitaciones que presentan sus propiedades mecánicas. Sin embargo, es aún un reto conseguir recubrimientos con buena adhesión al substrato y con una degradación controlada. Para lograr una adhesión adecuada, los TEC del metal y del vidrio deben ser similares, de forma que al aplicar el tratamiento térmico no se generen tensiones que puedan generar grietas y la rotura del implante [156, 168].

Los vidrios bioactivos con alto contenido en sílice presentan TEC cercanos a los del titanio. Sin embargo, tal y como se ha comentado, un aumento de sílice en la composición puede comprometer la capacidad bioactiva de los mismos, comprometiendo en este sentido su funcionalidad [168, 169].

El empleo de recubrimientos bioactivos permite mejorar la osteointegración del implante, así como estabilizar la unión al hueso y evitar la posible liberación de iones metálicos al fluido fisiológico que puedan ser tóxicos. Sin embargo, la degradación del vidrio bioactivo puede conllevar la inestabilidad del propio implante. En este contexto, se busca tener composiciones distintas en la superficie del recubrimiento y en la intercara del metal (composición gradiente), con el fin de conseguir el objetivo dual de una buena adhesión (distintas composiciones implicarían distintos TEC), a

Capítulo 1

la vez que se limita su grado de disolución, beneficiando así la estabilidad del implante a largo plazo [170].

d) Técnicas de recubrimiento de vidrio bioactivo

La elección de la técnica de recubrimiento influye en propiedades como la adhesión al sustrato, la porosidad y, por tanto, a la bioactividad [171]. Entre las técnicas más usadas, destacan la deposición electroforética (EPD) [172, 173], deposición por láser pulsado [174], *laser cladding* [175, 176], proyección térmica [177-179], la técnica de sol-gel y el esmaltado.

d.1) Sol-gel

La técnica de se basa en la síntesis de una suspensión coloidal o de partículas sólidas que, tras la hidrólisis y condensación forman un material sólido lleno de solvente, como se comentó en el apartado Técnicas de recubrimientos de HA. Una de las principales ventajas de este método es que no requiere de altas temperaturas, lo que evita la cristalización del vidrio. Por otro lado, las partículas obtenidas presentan una composición homogénea [180].

Este proceso genera materiales policristalinos y amorfos de forma sencilla, con características especiales en su composición y propiedades. Esto se consigue por medio del proceso de envejecimiento y del posterior tratamiento térmico, de forma que se obtiene el material o bien en forma de monolito o bien como película delgada [181] (Figura 23).

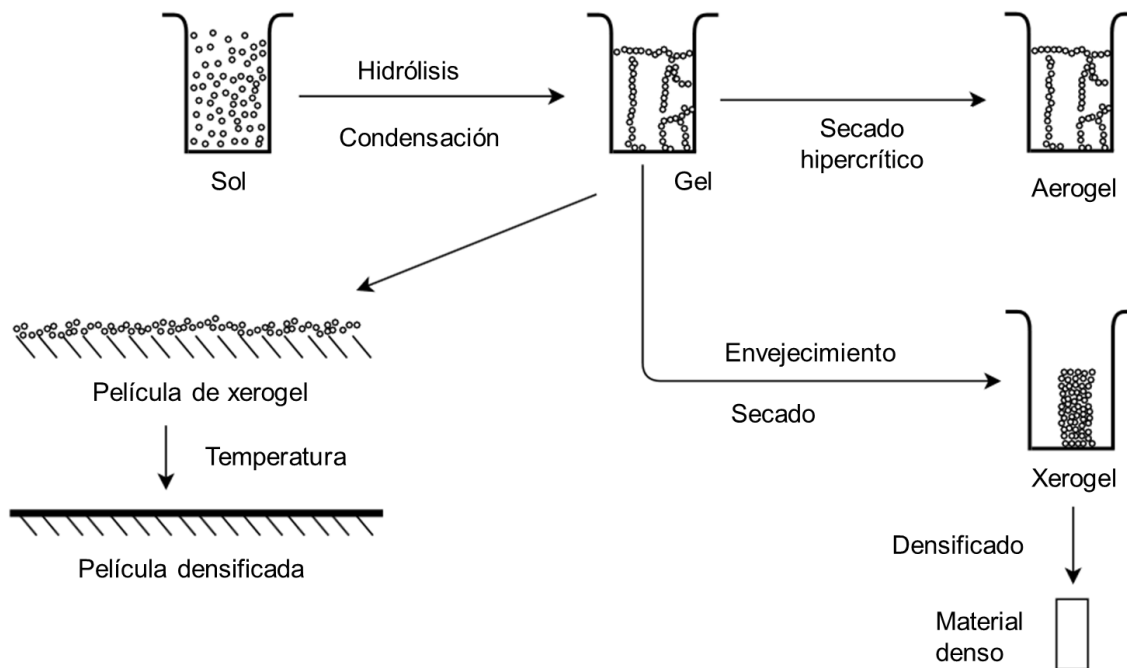


Figura 23. Método de sol-gel [181].

Los procesos de mezcla de este método tienen lugar a escala nanoscópica, de forma que se consiguen recubrimientos con una gran homogeneidad y que se adaptan a formas muy complejas de topografía. En cuanto a los métodos de deposición, existen diversas posibilidades, como son el rociado, la inmersión (*dip coating*), la aplicación centrífuga (*spin coating*), etc [142].

d.2) Sinterizado y esmaltado del vidrio.

El proceso de sinterizado a altas temperaturas es uno de los métodos principales tanto en la fabricación de vidrio bioactivo como en el empleo de recubrimientos. Este proceso permite una buena unión entre las partículas, pero a su vez, se produce la cristalización total o parcial del vidrio. El esmaltado, por su parte, se trata de una técnica empleada ampliamente para recubrir sustratos metálicos con vidrio, con una temperatura del proceso que debe evitar tanto la cristalización del vidrio como la degradación del sustrato, por lo que debe ser elegida con precaución. En general, la temperatura debe ser superior a los 600 °C. En ambos procesos de recubrimiento, se emplea una pieza de vidrio o una suspensión en polvo, de forma que, tras ser depositados, se someten al correspondiente tratamiento térmico.

Capítulo 1

El proceso de esmaltado permite crear capas de tan solo unos micrómetros de espesor hasta capas gruesas (centenares de micrómetros) [20]. Sin embargo, debido a que las temperaturas son menos elevadas que para el sinterizado, se pueden originar reacciones e interacciones vidrio-metal que disminuyan la adhesión. De este modo, la diferencia del TEC puede provocar estrés térmico, y con ello la aparición de grietas. Para solucionar estos problemas, se propone la creación de una capa intermedia entre el vidrio y el metal [20].

Entre los factores más influyentes en el proceso de sinterizado, cabe destacar el tamaño de las partículas de vidrio. Al reducir las partículas, el proceso de sinterizado mejora, pero también aumenta la cristalización. El inconveniente de la cristalización es que conlleva una reducción de la bioactividad y, en el caso de cristalización parcial, inestabilidad como consecuencia de la degradación de la estructura amorfa [25], pudiendo desembocar en el fallo del implante. Para evitar la cristalización del vidrio, las condiciones del tratamiento térmico deberían situarse en la “ventana de sinterizado”, cuyo rango se encuentra entre la temperatura de transición vítrea y la de fusión del vidrio. En este sentido, se requiere superar la temperatura de transición vítrea pero no la temperatura de cristalización, con el fin de mantener una estructura amorfa. Sin embargo, este margen resulta ser muy estrecho, de forma que es imposible evitar la formación de estructuras cristalinas. Por ello, es necesario llegar a una solución de compromiso, de forma que se consiga un buen sinterizado a la vez que se mantenga la bioactividad de este.

El contenido en sílice resulta ser otra de las variables más importantes en la cristalización del vidrio, de forma que, a mayor contenido, se reduce la formación de estructuras cristalinas. Sin embargo, un mayor contenido implica a su vez una mayor conectividad de la red de sílice, disminuyendo el grado de degradación del vidrio y, por tanto, su bioactividad.

Sin embargo, ciertos estudios de carácter cuantitativo han demostrado que la cristalinidad reduce la cinética de formación de HA, si bien no inhibe su generación [182-184]. De acuerdo con los resultados, no existen diferencias sustanciales en cuanto a cristalinidad en el rango de temperaturas entre los 800–1000°C, donde

aparece la fase cristalina del silicato de calcio sódico ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) (Figura 24). Los patrones característicos de esta fase se encuentran en la cartografía estándar PDF 22.1455. En cuanto a la formación de HA, el factor más influyente resulta ser la microestructura y la porosidad del vidrio, relacionado directamente con la densificación (sinterizabilidad) que experimentan sus partículas.

Capítulo 1

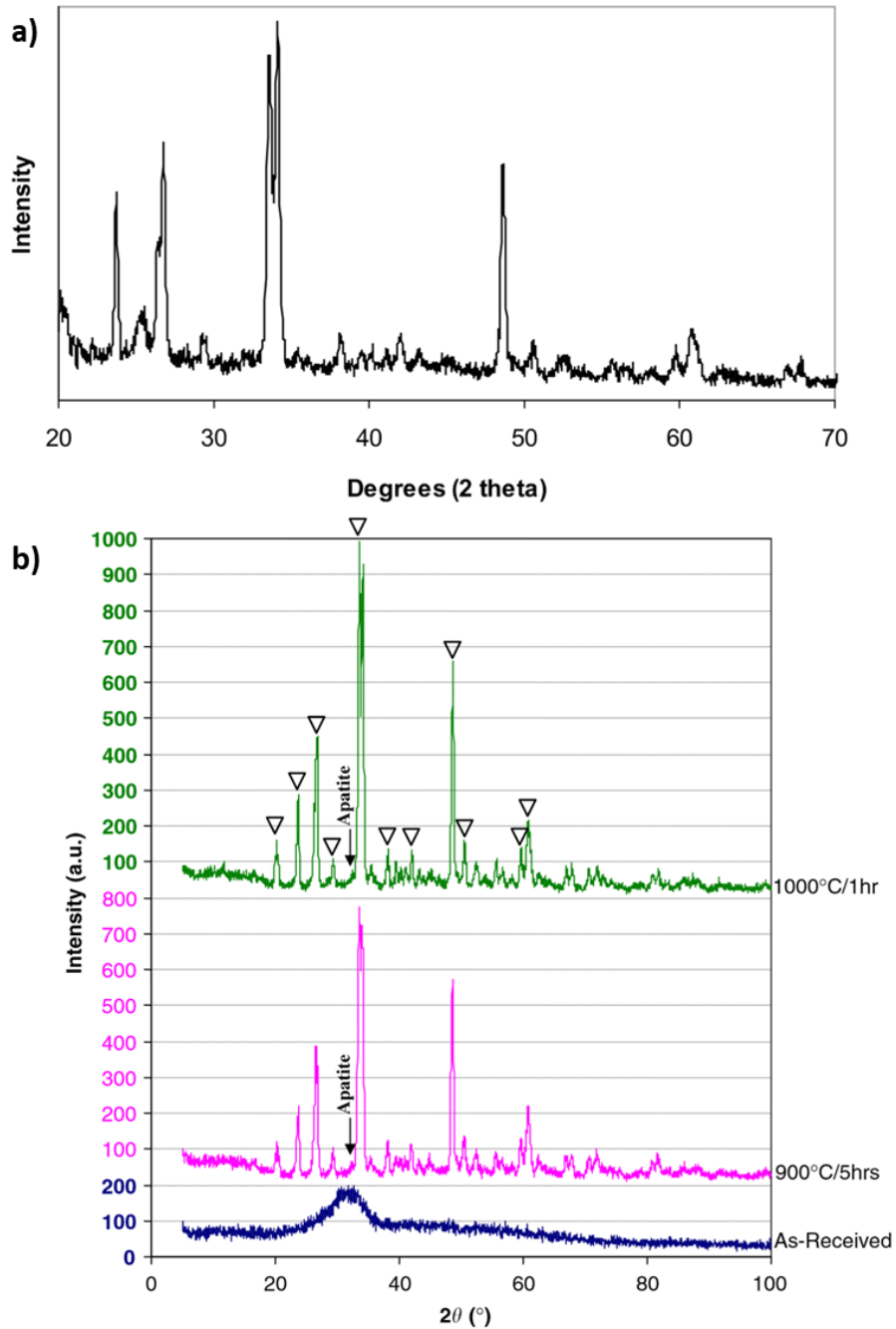


Figura 24. Difractogramas de a) vidrio 45S5 sinterizado a 1000 °C (25 °C/min) [183] y b) polvo de vidrio 45S5 en estado de recepción, sinterizado a 900 °C durante 5 h y a 1000 °C durante 1 h [184]. En todos los vidrios sinterizados se identifica la fase cristalina de $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$.

Otra de las opciones para reducir la cristalización es ampliar la “ventana del proceso de sinterizado”, variando la composición química del vidrio. A raíz de esto, se han

desarrollado nuevos vidrios bioactivos con mayor contenido en sílice, como el 13-93 [25], así como otros métodos de síntesis de vidrio bioactivo, destacando el sol-gel, que consigue un vidrio amorfo con nanoporosidad que mejora la respuesta celular debido a una mayor superficie [25].

Por el contrario, ciertos estudios afirman que la cristalización del vidrio no inhibe la bioactividad, sino que afecta a la cinética de formación de HA en presencia de SBF, reduciéndola a la mitad para vidrios bioactivos de más de un 60 % de cristalización. Además, demostraron también la importancia de la porosidad del vidrio, de forma que porosidades menores al 36 % producían capas más gruesas de HA [185].

Los recubrimientos de vidrio graduales (con gradiente) pueden ser una de las opciones para generar una capa intermedia. Un estudio en el que se emplearon los vidrios 6P61 (colocado en la intercara con el metal por tener un TEC similar) y 6P55 (en la superficie por tener una mayor bioactividad), reveló que, tras el esmaltado, se produjo una cristalización parcial del recubrimiento, pero no una disminución de la bioactividad en la estructura amorfa. Una vez realizado el tratamiento térmico, se formaron grietas en la capa superficial, al contrario que en la capa intermedia, como consecuencia de un TEC próximo con el metal. Por ello, las grietas no se difundieron ni atravesaron el recubrimiento, evitando así la delaminación. Otro de los motivos es que la presencia de estructuras cristalinas reduce considerablemente esta propagación [186].

e) Combinaciones de vidrio bioactivo con otros materiales

La buena bioactividad que presentan los vidrios bioactivos ha permitido la realización de combinaciones con otros materiales, con el fin de mejorar las propiedades biológicas de éstos últimos y, a su vez, suplir las carencias mecánicas que presentan (fragilidad y poca resistencia). Dentro de los sistemas de vidrio bioactivo destacan los vidrios con cerámicas, con polímeros y con metales.

Los **sistemas con cerámicas** más conocidos son las combinaciones con HA y con nanomateriales de carbono. Debido a las limitaciones que presenta la HA sintética en cuanto a propiedades mecánicas y baja biodegradabilidad [161, 187], se pueden

Capítulo 1

ocasionar fallos del implante. Como solución, es posible reforzar la HA con vidrio bioactivo. En este sistema, el vidrio bioactivo estimula la formación de hueso gracias a la liberación de iones, teniendo gran influencia en la angiogénesis y en la neovascularización [188], de forma que el sistema se puede degradar y unir con el hueso al mismo tiempo de forma rápida. El principal inconveniente de estos sistemas es la temperatura que se requiere para la sinterización (1200-1300 °C), ya que se pueden producir reacciones entre el vidrio y la HA sintética, formando fases perjudiciales, conllevando la cristalización del vidrio bioactivo y la degradación de la HA. Para solventar esto, se propone emplear vidrios bioactivos con menor temperatura de sinterización, como el BG_Ca [189].

Por su parte, los sistemas con nanomateriales de carbono confieren a los vidrios bioactivos las propiedades tribológicas y de resistencia a fractura de las que carecen. Uno de los materiales más empleados es el grafeno, aunque presenta dos problemas. Por un lado, tiende a aglomerarse, mientras que, por otro, es complicado fabricar grafeno a gran escala. Para solucionar este problema, se introduce óxido de grafeno como precursor gracias a su alta capacidad de dispersión, empleando la descarga de plasma. En este dominio se encuentran sistemas de vidrio bioactivo reforzados con nanoplaquetas de grafeno (GNPs), nanotubos de carbono (CNTs), con el que se consiguen buenas propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas, pudiendo ser de una pared (SWC-NTs) y multipared (MWCNTs), y el sistema MWCTNs/Bioglass® 45S5, que emplea también la descarga de plasma [150, 190].

El hueso está formado por una combinación de polímero natural (colágeno) y una cerámica (HA biológica) [191]. Este sistema sirve de inspiración en el acoplamiento entre **polímeros biodegradables y vidrios bioactivos** en aplicaciones como relleno de defectos en huesos, implantes temporales y *scaffolds* para la regeneración de tejidos. Se caracterizan por ser composiciones en las que se introduce resistencia y bioactividad a los polímeros, a la vez que se mantienen flexibilidad y la capacidad de deformación bajo cargas [192]. El vidrio bioactivo fomenta la nucleación y el crecimiento de la capa de HA sobre la superficie del *scaffolds*, de forma que, a su vez, la degradación del polímero se ve frenada y se

consigue una mayor osteoconducción y crecimiento celular. Los polímeros más frecuentes son como el ácido poliláctico (PLA) (Figura 25), el ácido poliglicólico (PGA) y el poli-láctico-co-glicólico (PLGA) [193].

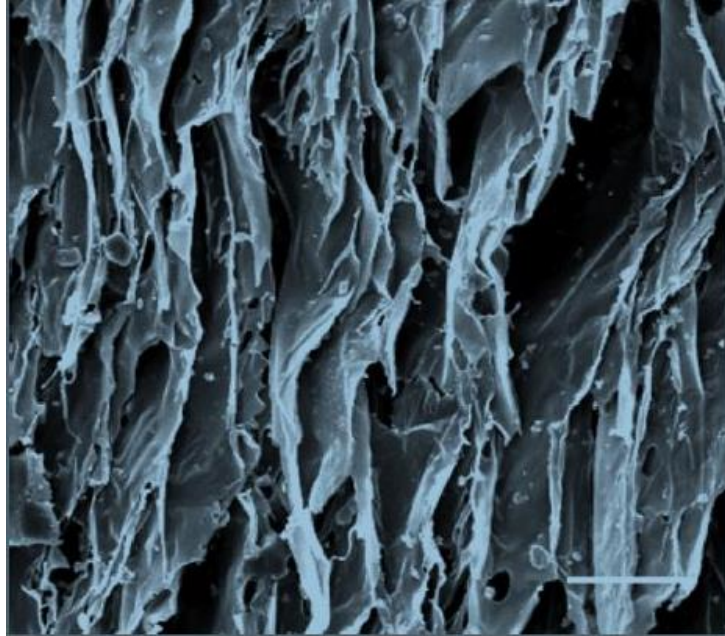


Figura 25. Micrografía SEM de PLLA (variación del PLA) con un 94% de porosidad, con 15% en volumen de Bioglass® 45S5 [152].

Los **sistemas de vidrio bioactivo con metales** se caracterizan por conferir una gran resistencia mecánica. En estas combinaciones, existe la opción de una matriz metálica reforzada con el vidrio o a la inversa, empleando el metal como refuerzo.

Dentro de este grupo, destacan las composiciones con magnesio y sus aleaciones, con acero 316L, titanio, cobre y plata, donde los dos últimos confieren propiedades antibacterianas.

En el caso del magnesio y sus aleaciones, destaca la matriz de la aleación ZK30 (3% peso en Zn, 0,6% peso en Zr y el resto Mg) [194, 195], donde el Zn refuerza el Mg frente a corrosión y se considera un micronutriente esencial en el cuerpo humano, mientras que el Zr mejora la resistencia de la aleación y presenta buena compatibilidad y osteointegración [194]. La inclusión de vidrio bioactivo implica una

Capítulo 1

disminución en cuanto a resistencia, aunque esta sigue siendo mayor que la del hueso cortical, y un aumento de la bioactividad del magnesio [195].

Por su parte, los sistemas de vidrio bioactivo con acero 316L permiten mejorar tanto la resistencia como la capacidad de deformación del vidrio, confiriendo unas propiedades elásticas cercanas a las del hueso [196]. De forma espontánea, aparece una transición gradiente en la intercara del acero y el vidrio, de forma que el hierro del primero se dispersa en el vidrio y el silicio de este hace lo mismo entre las capas de óxido de las fibras de acero [147].

Las combinaciones con titanio permiten fabricar nanocompuestos con mayor resistencia a la fractura en comparación con los vidrios bioactivos y que poseen mejor biocompatibilidad que el titanio microcristalino [197, 198]. Dentro de estas composiciones, es recurrente el empleo del vidrio bioactivo como recubrimiento del titanio y sus aleaciones, consiguiendo una buena adhesión mediante capas nanoestructuradas en la cara de la unión que, a su vez, se puede mejorar mediante la formación de dendritas de Ti_5Si_3 en el vidrio. Como se ha glosado anteriormente, la capa de óxido y el contenido en silicio juegan un papel importante en la delaminación del recubrimiento y en su degradación, por lo que es necesario controlar las reacciones que se puedan producir y afecten a la adhesión e integridad estructural del recubrimiento [156].

f) Ensayos *in vitro* e *in vivo*

Evaluar el comportamiento que los biomateriales presentarán en el cuerpo humano una vez hayan sido trasplantados se hace indispensable para su validación. Los ensayos *in vitro* se caracterizan por ser una reproducción artificial de lo natural, evitando así el uso de animales. En este contexto, es posible simular el plasma de la sangre humana mediante una solución de SBF (fluido corporal simulado, *Simulated Body Fluid*). Este hecho permite el estudio de la bioactividad de un material de una manera bastante cercana a la realidad [199].

El desarrollo de un SBF adecuado ha seguido un camino difícil, en el que la optimización del método para su consecución estaba influida por diversos factores

que afectaban a la composición final [199]. La Tabla 13 muestra la composición de SBF con respecto a la sangre humana.

Tabla 13. Concentración de iones en el plasma sanguíneo y en SBF [199].

Ion	Concentración de iones (mM)	
	Plasma sanguíneo	SBF
Na⁺	142.0	142.0
K⁺	5.0	5.0
Mg²⁺	1.5	1.5
Ca²⁺	2.5	2.5
Cl⁻	103.0	147.8
HCO₃⁻	27.0	4.2
HPO₄⁻	1.0	1.0
SO₄²⁻	0.2	0.5
pH	7.2-7.4	7.4

T. Kokubo estableció que un material capaz de generar HA en SBF puede unirse al hueso en el cuerpo humano siempre que no haya presencia de sustancias tóxicas. De igual forma, se confirmó la existencia de una relación entre la formación de HA en SBF (*in vitro*) e *in vivo* [199].

Los estudios *in vivo*, sin embargo, confieren resultados más reales del comportamiento biológico. Por un lado, permite evaluar la intercara hueso-vidrio bioactivo en cuanto a morfología, donde se obtuvo que promueven la osteogénesis y la ausencia de una respuesta inflamatoria inapropiada [200]. Por otro lado, los estudios *in vivo* han permitido analizar la respuesta biológica frente a recubrimientos de vidrio y de HA, obteniéndose que la osteointegración se mantiene mejor para los implantes de vidrio que para los de HA [201].

1.4.3 Formas de combatir la proliferación microbiana

Los factores como el trauma quirúrgico y la contaminación microbiana (proliferación de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

Capítulo 1

coli, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, etc.) son decisivos a la hora del éxito o fracaso de la funcionalidad de un implante, ya que limitan el rendimiento en servicio de este [45]. La aparición de infecciones, por tanto, afecta de forma directa a la pérdida de capacidad de adherencia o fijación del material al hueso, pudiendo causar problemas incluso más graves como la pérdida de extremidades e incluso la muerte [43, 202-205].

Las vías más comunes de transmisión de bacterias son el agua y los hospitales. El agua es el medio de transporte de multitud de enfermedades, ya que resulta ser el hábitat apropiado para que los microorganismos se desarrollen y vivan. En el campo de la odontología, los implantes dentales son los más vulnerables al riesgo de infecciones, debido a que un deficiente sellado biológico entre el implante y el tejido epitelial implica un mayor contacto y posibilidad de que el agua u otros posibles alimentos contaminados penetren hacia el interior. Así, niveles de 10^{10} UFC/g pueden ser alcanzados en el sarro dental, siendo las más comunes las bacterias tipo Gram negativas [206]. Debido a ello, es imprescindible promover la mejora de la cicatrización y la formación de los tejidos de epitelio de unión y conjuntivo de soporte sobre el implante dental. Esto puede conseguirse mediante la adhesión de fibroblastos y keratinocitos. Por su parte, los hospitales son un medio de transmisión de infecciones a través de los propios pacientes, así como por la utilización de instrumentos sanitarios que hayan sido contaminados eventualmente.

Algunos tipos de cepas comunes en el cuerpo humano son la *E. coli* (Gram negativa), que se encuentra en el intestino grueso de animales de sangre caliente y se transmite mediante alimentos contaminados, contaminación fecal de aguas y por vía oral-fecal. Otro tipo de bacteria conocida es la *P. aeruginosa* (también Gram negativa), que usualmente se desarrolla en ambientes húmedos y puede proliferar en partes del cuerpo humano como orejas, axilas y perineo. Por su parte, la MRSA (Gram positiva) es una mutación de la *S. aureus*, resistente a la meticilina, y se encuentra comúnmente en hospitales y se transmite por contacto tanto directo como indirecto por medio de material sanitario. Puede colonizar partes como la piel, la mucosa de las fosas nasales, el cabello, las uñas, axilas y perineo.

La aparición de infecciones se combate mediante ciertos mecanismos de defensa por parte del cuerpo humano, así como gracias al tratamiento por antibióticos, que atacan principalmente a las bacterias planctónicas que flotan libremente [204, 207]. Sin embargo, estas líneas de defensa no impiden la adhesión y colonización de la superficie de implantes. Las bacterias adheridas al material generan un *biofilm* que es resistente tanto a los antibióticos como a los mecanismos de defensa del cuerpo. Este *biofilm* se incrusta así en una matriz propia de sustancias poliméricas extracelulares, afectando así a la funcionalidad del implante y a su osteointegración [208-213]. Por esta razón, la inhibición de la adhesión bacteriana a la topografía del material implantado resulta ser un factor determinante para tener en cuenta. [205, 212-214].

Diversos métodos para solventar el problema de la aparición de infecciones han sido propuestos, tales como el uso de superficies antibacterianas (*antibiofouling*) [215, 216] y de superficies de rechazo de bacterias (*bacteria release surfaces*) [217]. Las primeras inactivan las bacterias a través de mecanismos o agentes químicos, causando la muerte celular. Se distinguen dos grupos distintos dentro de ellas. Por un lado, las superficies basadas en el contacto y por otro las de liberación. Las basadas en contacto consisten principalmente en recubrimientos compuestos de amonio cuaternario, policones y diversos antibióticos, así como quitosán, péptidos y enzimas antimicrobianos [218]. Las superficies de rechazo de bacterias consisten en la implementación de nano-partículas y óxidos metálicos de base plata [43, 219-221], oro [222], cobre [223, 224] y zinc [225] entre otros [226, 227], así como en la liberación de antibióticos [228, 229] o de óxido nítrico [230].

En el caso de las superficies *antibiofouling*, las bacterias son repelidas mediante la modificación química o física de la superficie del material, de forma que se previene la adhesión inicial de las bacterias. Estas habilidades pueden conseguirse mediante la deposición de recubrimientos que pueden ser sintetizados a partir de polímeros o de nano-partículas [202, 231], de forma que se crea una capa de hidratación a partir de elementos hidrófilos. Estos elementos hidrófilos son comúnmente polímeros y oligómeros basados en etilenglicol [232]. Otro tipo de polímeros usados

Capítulo 1

son los zwitteriónicos biomiméticos, cuya capa de hidratación se mantiene gracias a interacciones electrostáticas [233]. En esta línea, el PEEK (poli-éter-éter-cetona) es un polímero que presenta una buena capacidad antibacteriana, así como una correcta biocompatibilidad [234]. Según ciertos estudios de la literatura, este material ha sido empleado con titanio [234, 235] y en combinación con otros elementos [236]. En cuanto a las nanopartículas, el campo es muy amplio, encontrándose multitud de variantes. Estas pueden ser clasificadas en función de su composición, tal y como muestra la Figura 26.

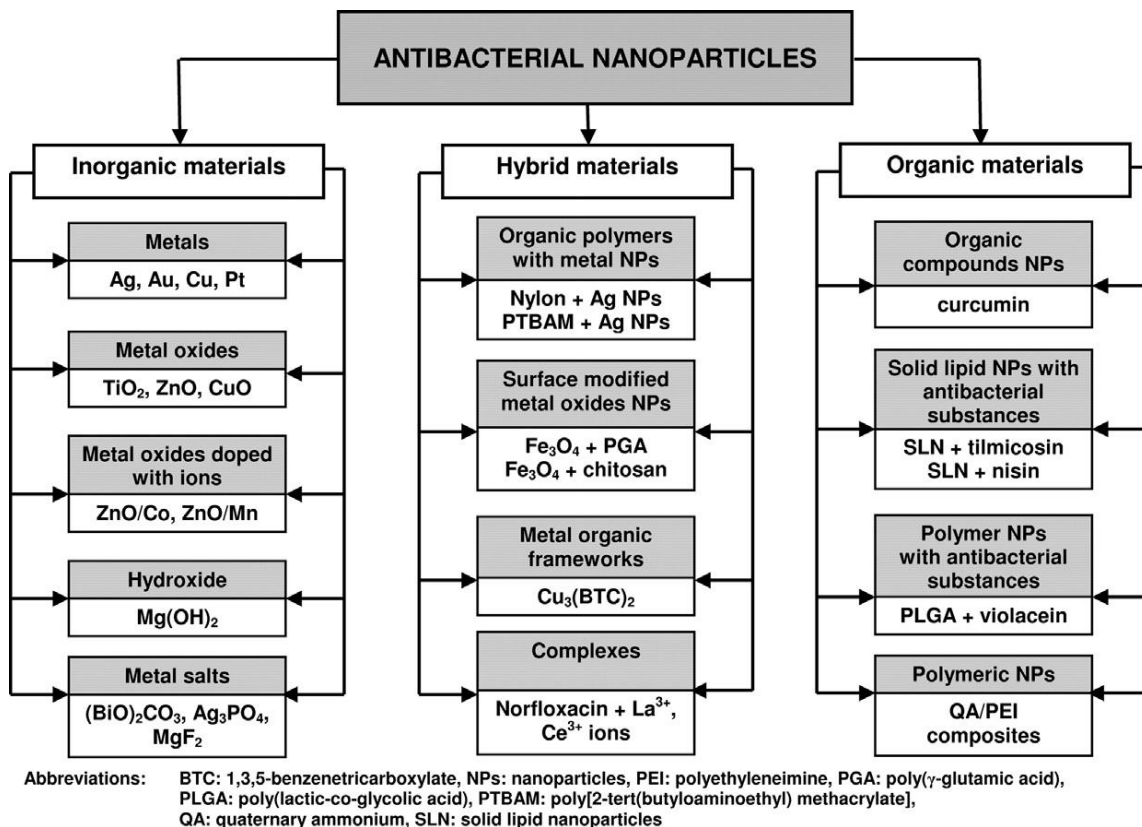


Figura 26. Clasificación de nano-partículas en función de su composición química [231].

A pesar de los buenos resultados obtenidos, ningún material ha mostrado una capacidad completa que evite la adhesión bacteriana, por lo que el implante puede llegar a ser infectado [218]. En el caso de las superficies *antibiofouling*, investigaciones recientes se focalizan en el desarrollo de estructuras jerárquicas presentes en la naturaleza con topografías a escala micro y nano [237].

Introducción

Las superficies de rechazo de bacterias reducen la adhesión de estas a la vez que libera, mediante la acción de una fuerza externa, las que se hayan adherido. Consiste en la modificación de las propiedades físico-químicas de la superficie del material, de forma que el comportamiento de las bacterias pasa de ser adhesivo a repelido. Las modificaciones del substrato se llevan a cabo a través de variaciones de la temperatura, del pH o del voltaje. La poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) es el polímero termosensible más usado y estudiado [217].

Capítulo 2: OBJETIVOS

Capítulo 2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es fabricar y caracterizar discos de titanio poroso modificados superficialmente que permitan garantizar el deseado equilibrio biomecánico (rigidez, resistencia mecánica, al rayado y desgaste) y biofuncional (*bone in-growth*, osteointegración y resistencia a la proliferación de bacterias), necesario para aplicaciones biomédicas (sustitución parcial del tejido óseo cortical).

2.2 Objetivos específicos

A su vez, la consecución del Objetivo principal requiere de hitos y/o tareas relacionados y agrupados en dos objetivos específicos:

Fabricación y caracterización de discos de titanio poroso

- Implementar y validar la viabilidad del uso de la técnica de espaciadores en términos de repetitividad y fiabilidad para fabricar piezas de titanio comercialmente puro con porosidad controlada (tipo, tamaño, distribución y morfología), usando dos rangos de tamaños de espaciadores (100-200 μm y 250-355 μm). El contenido en volumen de espaciador, así como las condiciones de sinterización (temperatura, tiempo y atmósfera) se han propuesto en trabajos

Capítulo 2

previos realizados en el Grupo de investigación (Aplicaciones Porosas Avanzadas), en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral.

- Caracterizar la porosidad (fracción total e interconectada, factor de forma, rugosidad superficial, distribución de tamaños y diámetro equivalente), usando técnicas con distinta resolución espacial (2D y 3D).
- Evaluar el comportamiento tribo-mecánico (escala macro y micro), relacionándolo con el papel de la porosidad. Descripción del tipo y mecanismos de daño asociado a las sollicitaciones.
- Estudio del comportamiento *in vitro* de los sustratos porosos: cultivos celulares (premioblastos C2C12-GFP) y cepas de bacterias (*E. coli*, MRSA y *P. aureginosa*). Influencia de la porosidad, del área y la rugosidad superficial (plana y sustratos).

Modificación superficial. Influencia en la capacidad de osteointegración de los discos de titanio poroso

- Empleo de una ruta de modificación superficial mediante ataque químico por inmersión. Control de los parámetros del proceso y relación con las modificaciones microestructurales (fracción, tamaño y morfología de la porosidad), rugosidad (tipo, grado y generación de texturas) de la superficie plana y las paredes de los poros, así como en el comportamiento tribo-mecánico y celular.
- Implementar las técnicas de sol-gel y goteo para depositar recubrimientos bioactivos frágiles (hidroxiapatita y vidrio bioactivo, respectivamente). Evaluar, controlar y optimizar las variables del proceso de deposición, el papel de las características microestructurales y mecánicas del sustrato, así como la influencia en las características de los recubrimientos obtenidos (composición, homogeneidad, espesor, adherencia, microdureza, bioactividad, etc.).
- Depositar recubrimientos antibacterianos de SPEEK sobre los sustratos de titanio porosos. Evaluar su capacidad antibacteriana, así

Objetivos

como la influencia de la porosidad en el proceso y el comportamiento bactericida.

Capítulo 3: RESULTADOS

Capítulo 3. RESULTADOS

Los capítulos anteriores exponen la problemática de salud mundial que justifica la necesidad de nuevos tipos de materiales para implantes (sustitución total o parcial) de un tejido óseo cortical. En este contexto, el titanio comercialmente puro (Ti cp) con una porosidad controlada y una superficie modificada (física y/o químicamente) se presenta como un serio candidato capaz de garantizar el equilibrio biomecánico y biofuncional que se requiere en la aplicación clínica.

La presente Tesis Doctoral contempla la recopilación de los resultados obtenidos en el marco de este problema de salud. Éstos han sido presentados en los congresos nacionales e internacionales más importantes de las áreas en las que versa esta investigación (biomateriales y materiales porosos). Además, se han concretado en la publicación de seis publicaciones indexadas de alto factor de impacto, por lo que la misma se engloba en la Modalidad “por compendio”.

La Figura 27 presenta un esquema en el que se resumen todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, los cuales se irán desglosando en los sucesivos apartados, para más tarde ser discutidos en el Capítulo 4. Antes de continuar, se listan las técnicas de caracterización empleadas en esta Tesis, pudiéndose consultar detalles de éstas en las citadas publicaciones científicas (ver al final del manuscrito).

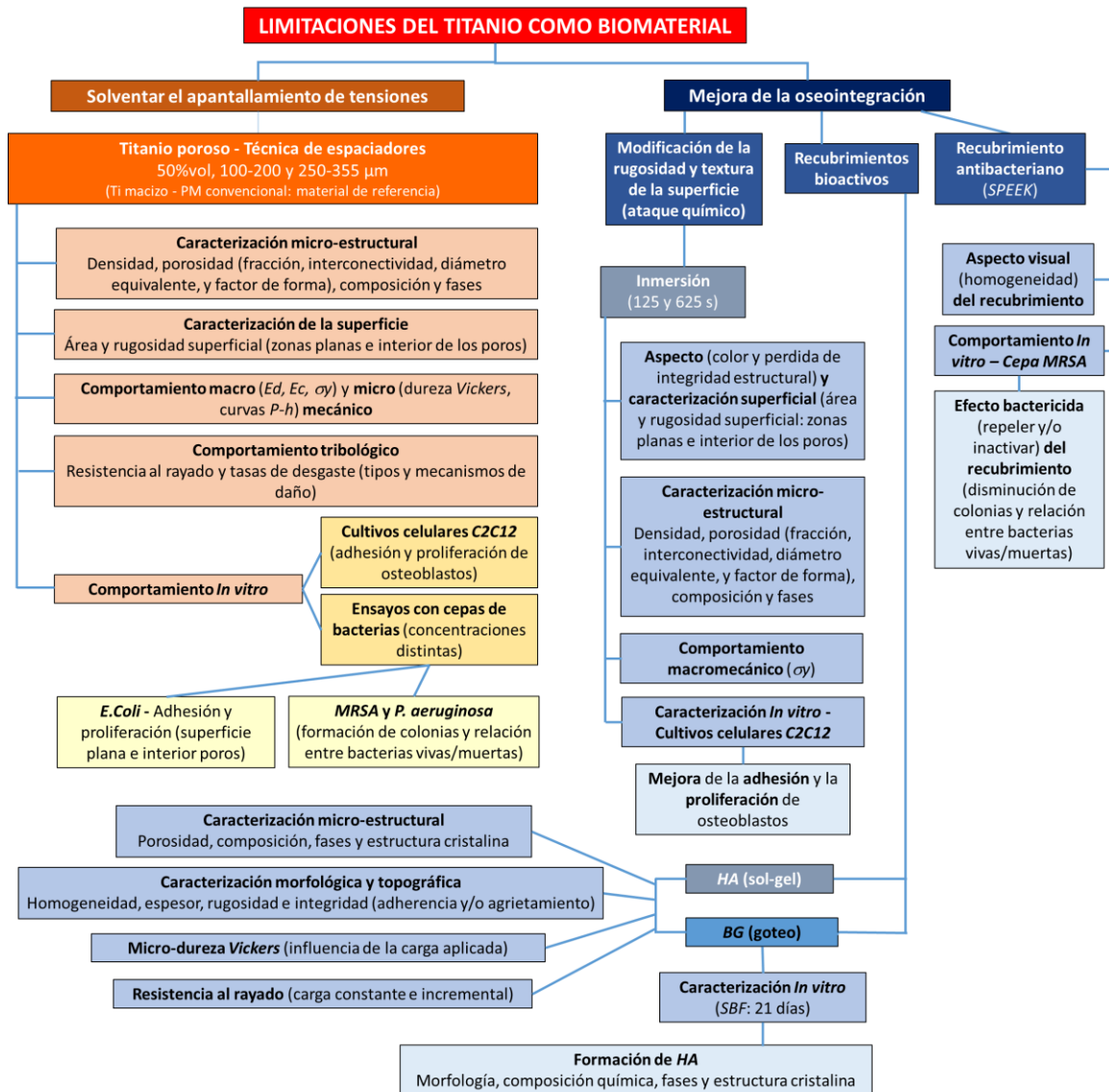


Figura 27. Esquema de presentación de Resultados en esta Tesis doctoral.

Si bien esta Tesis Doctoral sigue la modalidad por compendio, a continuación, se realiza un breve resumen de la fabricación y modificación de los sustratos de titanio.

Para solucionar el apantallamiento de tensiones, primera limitación que presenta el titanio como biomaterial, se han fabricado sustratos de titanio por ruta PM convencional (sustrato denso) y mediante la técnica de espaciadores (sustratos porosos).

Las muestras densas partieron de polvo de titanio de pureza comercial (SE-JONG Materials Co. Ltd., Corea del Sur, D [4,3] de 59 μm), Ti cp, siendo prensadas a 1300 MPa en una máquina Instron modelo 5505, serie H1514

(Reino Unido) y sinterizadas a 1300 °C en un horno de tubo cerámico Carbolyte® STF en alto vacío ($\sim 10^{-5}$ mbar).

Por su parte, los sustratos porosos se fabricaron a partir de una mezcla del 50 % v/v de polvos de hidrogeno carbonato de amonio (NH_4HCO_3 , Cymit Química S.L., España, D [4,3] de 348 μm) y Ti cp, tamizando previamente el hidrogeno carbonato de amonio en los rangos de tamaño de 100-200 y 250-355 μm . Posteriormente, se prensaron a 800 MPa y se eliminaron las partículas de espaciador en una estufa a bajo vacío ($\sim 10^{-2}$ mbar) en dos etapas (60 °C y 110°C, de 12h cada una). Finalmente, se sometieron al proceso de sinterizado a 1250 °C en un horno de tubo cerámico.

En cuanto al segundo problema que plantea el uso del titanio como biomaterial, se lleva a cabo la mejora de la osteointegración y del crecimiento del hueso hacia el interior (*bone in-growth*) mediante la implementación de distintas técnicas que se detallan a continuación:

- a. Modificación de la rugosidad y textura de la superficie mediante ataque químico con ácido fluorhídrico (HF) y caracterización. La solución ácida se prepara a 50 °C, a partir de HF al 45% (22 ml/l), agua destilada y un inhibidor orgánico. Se proponen la ruta de ataque químico: por inmersión (125 y 625 s).
- b. Deposición de recubrimientos bioactivos por distintas vías y su caracterización.
 - i. **Ruta recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel**, partiendo de precursores de calcio y fósforo. El protocolo seguido se encuentra en la literatura [140-144]. El trietil fosfito se hidroliza durante 24 h con agua destilada mientras se agita vigorosamente. A continuación, se añade nitrato cálcico (Aldrich), y se deja agitando durante 24 h. Los sustratos porosos de titanio se recubren mediante inmersión y se secan a 80 °C en una estufa. Posteriormente, se somete a los sustratos a un tratamiento térmico a 450 °C durante 5 h en condiciones de vacío.
 - ii. **Ruta recubrimiento de BG mediante sedimentación por goteo**. El vidrio bioactivo (*bioactive glass*, BG) empleado para la deposición del recubrimiento consiste en partículas de 45S5 SCHOTT Vitryxx®. Se

Capítulo 3

prepara una suspensión de 200 mg de BG en 20 ml de etanol [238] y se agita en el baño de ultrasonidos durante 15 min. Mediante el uso de una pipeta, se gotea la solución y se distribuye por la superficie de los sustratos de titanio, hasta cubrir la totalidad de ésta. A continuación, se dejan reposar los sustratos recubiertos durante 24 h, con el fin de evaporar el etanol. El proceso se repite tantas veces como número de capas se desee depositar. Por último, los sustratos recubiertos se someten a un tratamiento térmico en un horno a 820 °C durante 5 s en condiciones de alto vacío ($\sim 10^{-5}$ mbar).

- c. Deposición de recubrimientos antibacterianos (poli-éter-éter-cetona sulfonado, SPEEK). Para ello, se prepara una solución disolviendo 1 g de poli-éter-éter-cetona (PEEK; Sigma Aldrich) en 25 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 al 95–98%) a 300 rpm durante 4 h. A continuación, se eleva la temperatura a 50 °C y se agita durante toda la noche. Posteriormente, se decanta el polímero en agua helada desionizada a la vez que se agita la solución, con el fin de parar la reacción sulfonada. El polímero es entonces filtrado y lavado varias veces, hasta conseguir un pH neutro. Tras secar las fibras en vacío en dos pasos de 24 h cada uno (primero a temperatura ambiente, y después a 65 °C), el polímero se disuelve en dimetil-formamida (DMF) al 4 % w/w. Finalmente, los sustratos se recubren mediante inmersión en dicha solución de SPEEK, para posteriormente ser secados en una estufa durante 3-4 h a 200–250°C [234-236].

Los sustratos fueron caracterizados de forma física y micro-estructural, superficial, macro y micro-mecánica, tribológica y biológica (comportamiento *In vitro*), antes y después de las modificaciones superficiales realizadas.

- a. Caracterización física y micro-estructural

Los sustratos fueron evaluados en cuanto a pérdida de densidad, variación de la porosidad, de composición, fases y estructura cristalina. Para ello, se emplearon las técnicas siguientes:

- i. **Método de Arquímedes:** Método fundamentado en la norma ASTM C373-14 (2014) [239], por el que se obtuvieron y evaluaron, asimismo,

parámetros como la densidad (ρ), porosidad total (P_T), porosidad interconectada (P_i) y porosidad cerrada (P_c).

- ii. **Análisis de Imagen (*Image Analysis, IA*):** Se empleó un microscopio óptico Nikon Epiphot (Japón), con cámara Jenoptik Progres C3, serie 2206-33-0268 (Alemania), y el software de análisis Image-Pro Plus 6.2.0.424 (Media Cybernetics, Estados Unidos), mediante el que se determinaron parámetros tales como porosidad de la superficie (P_s), tamaño de los poros (diámetro equivalente, D_{eq}) y forma de los mismos (F_i). El error relativo de estas medidas se encuentra en torno a un 2 %.
- iii. **Micro-tomografía computarizada (*micro-Computed Tomography, micro-CT*):** Se llevó a cabo mediante un escáner de rayos X compuesto por la fuente de rayos X Micro Focus L8121-01 (con un ánodo de Wolframio) operado a 100 kV y 100 μ A, 5 μ m, y un detector de panel plano C7943 (120 mm \times 120 mm, 2240 \times 2368 píxeles) (ambos equipos de Hamamatsu, Japón). Mediante el uso del software VGStudioMax 1.2.2 (*Volume Graphics*, Heidelberg, Alemania) se extrajeron las secciones de la muestra en 2D y 3D, mientras que el software AVIZO 9.0.1 (FEI, USA) se empleó en el análisis de datos, obteniendo resultados de porosidad (P_T), rugosidad de la superficie (Rug_{sup} , Rug_{vol}) y tamaño de los poros (D_{eq}) [240, 241].
- iv. **Espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared spectroscopy, FTIR*),** mediante el equipo FTIR-ABB Bomem Inc., serie MB (*Analytical and Advanced Solutions*, Canada).
- v. **Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (*Energy-Dispersive X-ray spectroscopy, EDX*),** empleando el detector EDS-Oxford Inca, Reino Unido, para determinar las composiciones elementales de los recubrimientos.
- vi. **Difracción de rayos X (*X-Ray Diffraction, XRD*),** mediante un difractómetro de polvo modelo D8 de Brucker, Reino Unido, llevado a cabo con una radiación $CuK\alpha$ ($\lambda = 0.154$ nm) de 30 kV y 50 mA para los recubrimientos.

Capítulo 3

- vii. **Espectrometría atómica de masas (ICP-MS)**, mediante un equipo *Spectro Analytical Instruments GmbH*, Alemania.

b. Caracterización de la superficie

La topografía de los sustratos, antes y después de la modificación superficial, fue analizada tanto de forma visual como mediante el uso de distintas técnicas. El objetivo principal es observar la variación de rugosidad de las zonas planas y del interior de los poros, así como evaluar la homogeneidad en el caso de los distintos recubrimientos depositados.

- i. **Microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)**: Se evaluaron la topografía superficial y la morfología de los poros mediante el uso del microscopio electrónico de barrido Jeol 6460LV (Jeol, Japón) de forma cualitativa.
- ii. **Microscopía confocal láser**: Permitió el estudio de la rugosidad 3D de la superficie, así como la topografía en el interior de los poros mediante el microscopio confocal láser Sensofar S Neox (SENSOFAR, España) y el software acoplado SensoScan y SensoMap (SENSOFAR, España) para la adquisición y tratamiento de imágenes y el análisis de datos, respectivamente. La incertidumbre de medida del equipo, registrada según las calibraciones del objetivo empleado (20x), es de 1.48 μm .

c. Caracterización del comportamiento macro y micro-mecánico

El comportamiento macro y micro-mecánico evaluaron la integridad estructural de los sustratos. Para los recubrimientos, se adaptaron los protocolos realizados en el estudio de los sustratos vírgenes, con el fin de analizar la influencia de la carga sobre los mismos.

- i. **Ensayo de Ultrasonidos (US)**: Técnica mediante la que se midieron tanto las velocidades de propagación de ondas longitudinales como transversales, empleando el equipo Krautkramer USM 35, Alemania. El equipo posee un rango de frecuencias entre 0.5 y 20 MHz, con un rango máximo de calibración para el acero de 10 m. A partir de los

resultados obtenidos tras las medidas, se obtuvo el módulo de Young dinámico (E_d) [242, 243].

- ii. **Ensayo de compresión uniaxial:** Se obtuvieron tanto el módulo de Young (E) como el límite elástico (σ_y) empleando una máquina electromecánica universal Instron modelo 5505, serie H1514 (Reino Unido). Se aplicó la norma ASTM E9-09 [244], corrigiendo las curvas tensión-deformación con la rigidez de la propia máquina (87.9 kN/mm). La máquina permite aplicar cargas a compresión comprendidas entre 10 y 100 kN, con un error relativo del 0.3 %.
- iii. **Micro-dureza Vickers:** Se obtuvo de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 6507-1. Las cargas aplicadas fueron de HV0.3 (2.94 N) y HV1 (9.81 N) durante 15 s, empleando un durómetro HMV-G21DT, serie 344-04238 (Shimadzu, Japón). Los límites de carga permitidos por el equipo se encuentran entre HV0.01 y HV2 (98.07 mN y 19.61 N, respectivamente). Las imágenes de las huellas fueron obtenidas por un microscopio óptico Nikon Epiphot (Nikon, Japón) acoplado a una cámara Jenoptik Progres C3 (Jenoptik, Alemania). Simultáneamente, fueron analizadas con el software *Image Pro-Plus* 6.2, Bethesda, MD (USA).
- iv. **Micro-indentación instrumentada:** Se empleó un indentador de punta piramidal Vickers. Se llevó a cabo mediante el equipo Microtest MTR3/50-50/NI Scratchtester (Microtest, Madrid, España). La recopilación de datos se efectuó mediante el software acoplado Tribotester (Microtest, Madrid, España). El rango de carga aplicada está comprendido entre 0.5 y 50 N, tanto en fuerza tangencial como en vertical (error relativo absoluto de hasta un 0.11 %), siendo el equipo capaz de medir profundidades entre 0 y 1 mm.

d. Caracterización del comportamiento tribológico

El comportamiento tribológico proporcionó información tanto de la integridad estructural como de la homogeneidad de los sustratos vírgenes y recubiertos. Al igual que para el comportamiento micro-mecánico, fue necesario adaptar los protocolos seguidos para su aplicación a los recubrimientos, con el fin de evaluar la influencia de la carga sobre los mismos.

Capítulo 3

- i. **Ensayo de rayado:** Se utilizó un indentador cónico-esferoidal de tipo Rockwell, cuya aplicación de cargas (tanto incrementales como constantes). Tanto el equipo como el software empleados fueron los mismos que para la micro-indentación instrumentada.
- ii. **Ensayo de desgaste:** Consistió en un ensayo tipo *ball-on-disk*, realizado en un tribómetro Microtest MT/30/NI V1101 (Microtest, Madrid, España). El equipo trabaja con cargas comprendidas entre 0 y 30 N (error relativo del 0.25 %), siendo capaz de medir profundidades de hasta 4 mm (error relativo del 0.27 %). La bola empleada fue de alúmina (3 mm). La tasa de desgaste para cada uno de los casos fue normalizada.

e. Caracterización del comportamiento biológico in vitro

Estudios previos han confirmado que la rugosidad interna de los poros promueve la adhesión celular [53, 55]. Al mismo tiempo, dicha topografía implica la posibilidad de que también proliferen bacterias sobre el sustrato, trayendo consigo la aparición de infecciones [245]. Debido a ello, se ha realizado un estudio, tanto de la proliferación de osteoblastos como del comportamiento bacteriano en las muestras fabricadas. Asimismo, se ha estudiado la formación de HA tras la inmersión en SBF (*simulated body fluid*) antes y después de las modificaciones superficiales (deposición de recubrimientos).

- i. **Realización de cultivos celulares empleando preoblastos C2C12-GFP** sobre los sustratos vírgenes, donde se estudia tanto la adhesión tras 24 h como la proliferación celular tras varios días de cultivo, mediante el conteo de unidades de fluorescencia relativas (UFR) y la microscopía de fluorescencia, mediante un microscopio de fluorescencia invertida Olympus IX51 (Alemania).
- ii. **Estudio de la adhesión y proliferación bacteriana** de los sustratos vírgenes por dos métodos distintos:
 1. **Método 1, con *E. coli***, mediante el conteo de unidades de formación de colonias.
 2. **Método 2, con *P. aeruginosa* y *MRSA***, empleando el conteo de unidades de formación de colonias y el ensayo de bacterias

vivas/muertas por microscopía confocal, empleando un microscopio Zeiss LSM 700 confocal (Alemania).

iii. Inmersión de los sustratos porosos de titanio recubiertos con BG

en SBF: Se caracterizó y analizó el crecimiento de HA tras la inmersión de los sustratos recubiertos en SBF [199] durante 21 días.

Los detalles de los distintos procedimientos experimentales y de la caracterización pueden ser consultados con mayor profundidad en las publicaciones anexas de esta tesis por compendio.

La Tabla 14 recoge, de manera esquemática, la aplicación de cada una de las técnicas empleadas en la presente Tesis Doctoral para la caracterización de los sustratos antes y después de ser modificados, siendo entre ellas complementarias.

Tabla 14. Aplicación de las técnicas empleadas en la caracterización de sustratos y recubrimientos fabricados en la presente Tesis Doctoral.

		Sustratos vírgenes	Sustratos atacados por inmersión	Recubrimiento de HA	Recubrimiento de BG	Recubrimiento con SPEEK
AI - Porosidad 2D, Topografía visual		X	X			
Micro-CT - Porosidad 2D y 3D, Topografía visual, Rugosidad 3D		X	X			
M. Arquímedes - Porosidad 3D		X	X			
Composición	EDX	X	X	X	X	
	ICP				X	
Fases y estructura cristalina	FTIR			X		
	XRD	X	X	X	X	
SEM - Topografía visual		X	X	X	X	X
Confocal (Topografía visual, Rugosidad 3D)		X	X	X	X	
Integridad estructural y Homogeneidad	US					
	Test de compresión	X	X			
	Micro-dureza			X	X	
Ensayo de rayado - Rugosidad 2D, Integridad estructural y Homogeneidad		X		X	X	
Ensayo de desgaste - Integridad estructural y Homogeneidad		X				
Comportamiento biológico	Cultivos Celulares	X	X			
	Cultivos con cepas bacterianas					X
	Inmersión en SBF				X	

3.1. Disminución del apantallamiento de tensiones: sustratos de Titanio poroso obtenidos por rutas pulvimetalúrgicas

La pulvimetalurgia (*Powder Metallurgy*, PM) convencional, así como la técnica de espaciadores (*space-holder technique*), han sido los métodos empleados en la fabricación de los sustratos de la presente Tesis. Se fabricaron tres tipos de sustratos de Ti cp, uno denso y dos porosos, éstos últimos con una mezcla del 50 % v/v de espaciador. El sustrato denso fue obtenido por PM convencional y los porosos mediante la técnica de espaciadores. Los rangos de tamaño de partícula de espaciador (NH_4HCO_3) fueron de 100-200 y 250-355 μm , y fueron escogidos para lograr un equilibrio entre las propiedades mecánicas y biofuncionales del sustrato. El menor rango empleado (100-200 μm) genera un tamaño de poro tal que permite la infiltración del hueso hacia el interior de los poros del sustrato sin comprometer el comportamiento mecánico del material, más estudiado en la literatura y en trabajos previos [36,52,53,55,58]. Por su parte, el mayor rango de tamaño elegido (250-355 μm) pretende facilitar una mejor infiltración hacia el interior, promoviendo en mayor medida la penetración de los recubrimientos ensayados, el crecimiento del hueso hacia el interior (*bone in-growth*) y la adhesión celular. Sin embargo, un mayor tamaño de poro puede suponer pérdida de resistencia mecánica, aunque se podría ver compensada por la propia formación de hueso en el interior de los poros. En cualquier caso, la meta propuesta, es conseguir un equilibrio biomecánico y biofuncional.

La Figura 28 recoge, de manera ordenada, la caracterización realizada sobre estos sustratos vírgenes (sin ningún tipo de tratamiento sobre su superficie), así como los parámetros y variables significativas estudiadas en cada una de ellas.

Capítulo 3

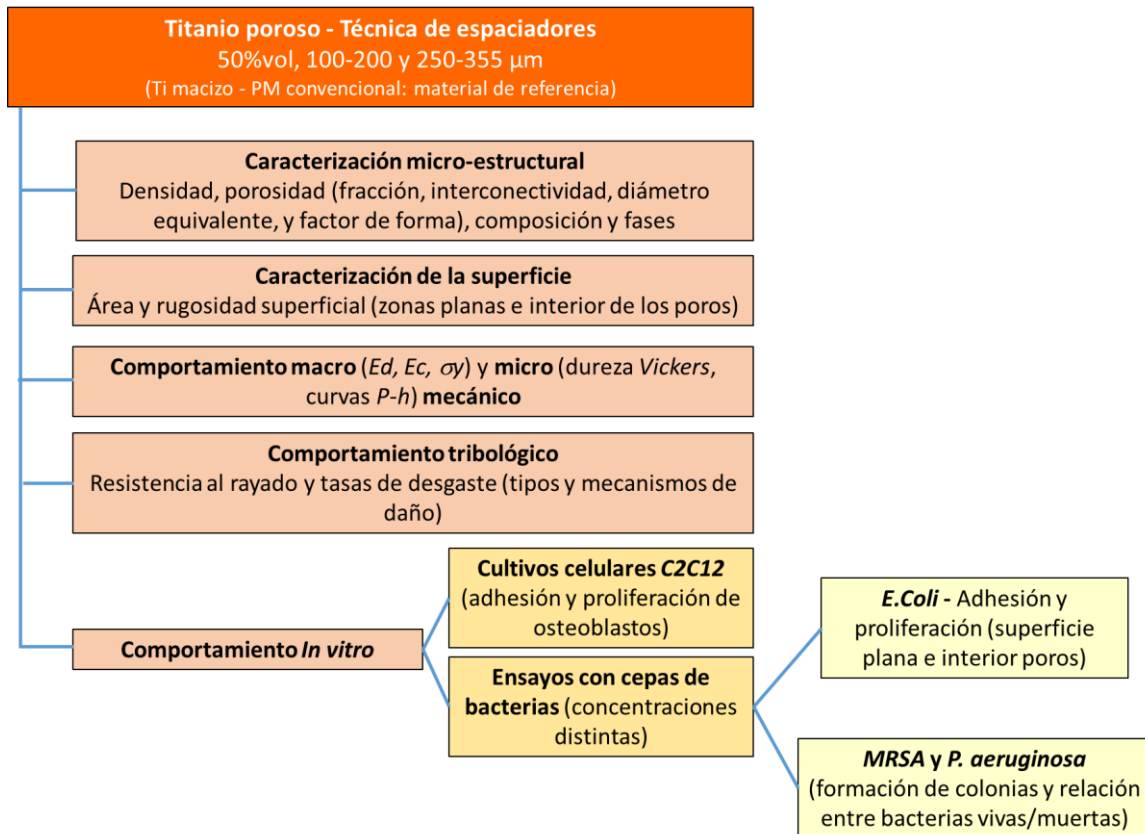


Figura 28. Caracterización de los sustratos porosos de titanio fabricados para solventar el apantallamiento de tensiones (extraído del esquema de la Figura 27).

3.1.1 Caracterización microestructural de los sustratos porosos

Los sustratos obtenidos, en cuanto a la similitud con el diseño de partida, dependen fuertemente del polvo metálico y de las partículas de espaciador empleado. En este contexto, se hace necesaria el estudio de las curvas de compresibilidad de los materiales para fabricar los sustratos de forma óptima. Las curvas de compresibilidad de las muestras porosas y densa se presentan en la Figura 29. Se aprecia que para bajas presiones de compactación (< 800 MPa) la densidad relativa obtenida en ambos sustratos porosos es similar entre ellos, pero superior a la de la muestra densa. Sin embargo, a mayores presiones de compactación (> 800 MPa), éstas pasan a tener una densidad inferior a la de la muestra densa, si bien se mantiene el comportamiento relativo entre las muestras porosas.

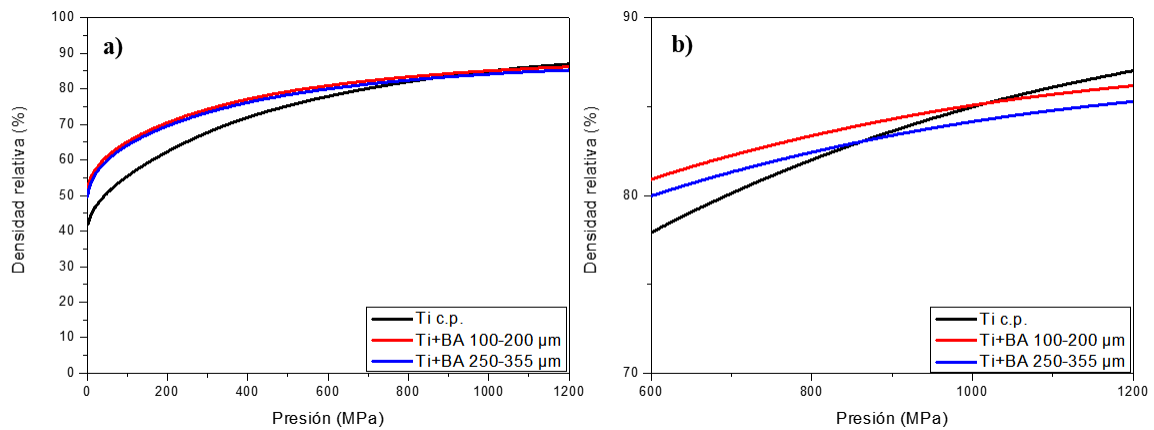


Figura 29. Curvas de compresibilidad del polvo de Ti c.p. y de las mezclas de éste con el hidrógeno carbonato de amonio (BA) de rangos de tamaño de espaciador de 100-200 μm y 250-355 μm: a) Para 0-1200 MPa; b) Detalle de la anterior para 600-1200 MPa.

La caracterización microestructural de los sustratos, se llevó a cabo por diversas técnicas, siendo objeto de estudio, entre otros, parámetros como la P_T y P_i , morfología de los poros generados por el espaciador (D_{eq} y F_T) y topografía (rugosidad de la superficie).

Se empleó el método de Arquímedes para caracterizar la porosidad de los sustratos fabricados. La Tabla 15 muestra la porosidad (%), total e interconectada, de los sustratos de titanio, representadas de menor a mayor rango de tamaño de espaciador. Se observa que la porosidad total es siempre superior a la interconectada, como era de esperar. Asimismo, los valores de porosidad total son de 45.9 % para ambos sustratos porosos, mientras los de porosidad interconectada corresponden al 43.7 y 41.0 % para las muestras porosas de menor y mayor rango de tamaño de espaciador, respectivamente. La diferencia entre ambas porosidades corresponde a la porosidad cerrada o aislada. Es interesante remarcar las porosidades obtenidas en el sustrato denso, siendo de 2.4 % para P_T y de 1.3 % para la P_i .

Capítulo 3

Tabla 15. Porosidad total e interconectada por el método de Arquímedes de los sustratos denso y porosos de titanio de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador tras el proceso de sinterizado.

	P_T (%)	P_i (%)
Densa	2.4 ± 0.2	1.3 ± 0.2
100-200 μm	45.9 ± 0.6	43.7 ± 0.8
250-355 μm	45.9 ± 0.2	41.0 ± 0.1

La Figura 30 muestra las micrográficas de los sustratos de titanio (denso y porosos). Pueden observarse claramente dos poblaciones distintas de poros. Por un lado, aparece una porosidad más fina en todos los sustratos, que incluye la muestra densa (Figura 30 a). Esta es una porosidad inherente al propio proceso PM convencional. En segundo lugar, se obtiene una población de poros de tamaño mucho mayor, Figura 30 b y c, debida a los poros generados por las partículas de espaciador en la técnica de espaciadores, correspondiente a los sustratos porosos de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , respectivamente.

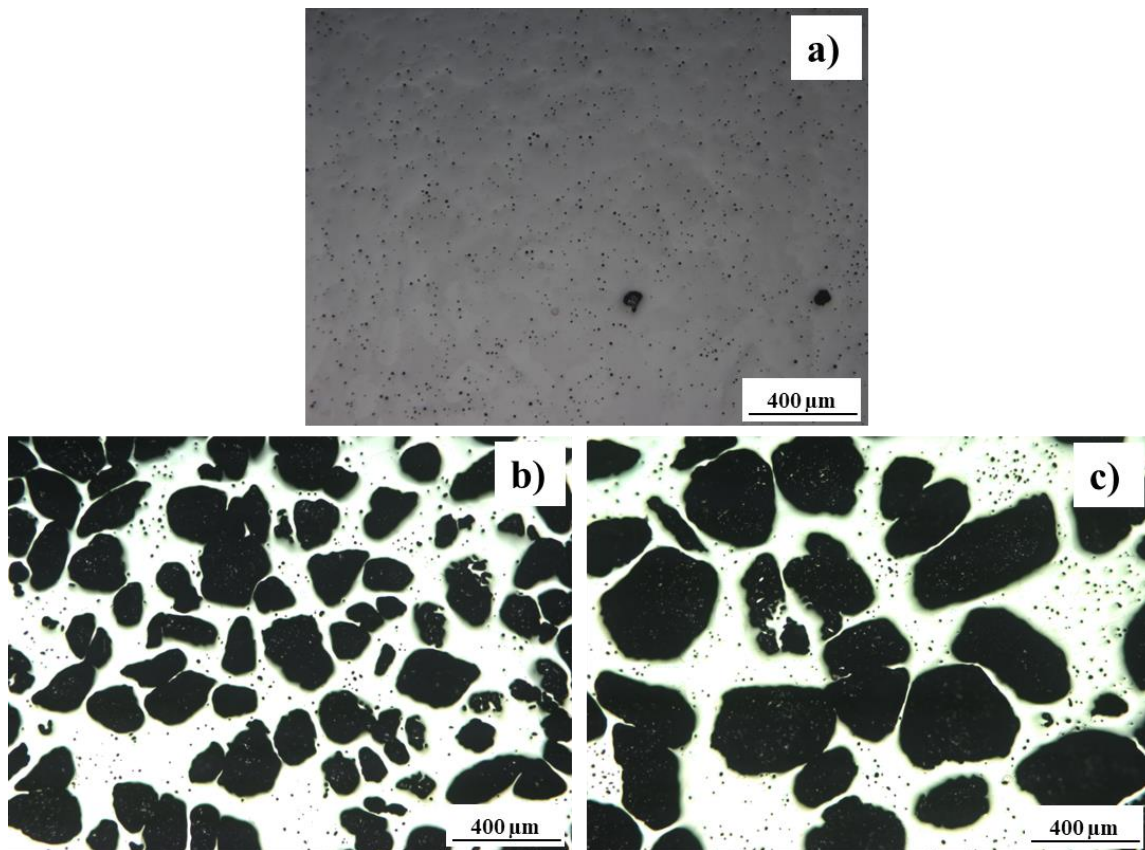


Figura 30. Micrografías de los sustratos de titanio. a) sustrato denso, b) y c) sustratos porosos de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , respectivamente.

La Tabla 16 presenta la porosidad total (P_T) y las propiedades principales de la morfología de los poros obtenidas por IA, tales como el diámetro equivalente (D_{eq}) y el factor de forma (F_f) de los poros, para cada tipo de sustrato.

Tabla 16. P_T , D_{eq} y F_f de los poros por la técnica de IA.

	IA		
	P_T (%)	D_{eq} medio (μm)	F_f
Densa	1.2 ± 0.2	5.5 ± 0.2	0.99 ± 0.00
100-200 μm	50.3 ± 1.3	161.1 ± 28.5	0.67 ± 0.03
250-355 μm	48.7 ± 1.9	261.5 ± 9.0	0.67 ± 0.01

La porosidad total de la muestra densa, observada en la Figura 30 a, es 1.2%. Asimismo, resulta ser del 50.3 y 48.7% para los sustratos porosos. El tamaño de los poros, medido por el D_{eq} medio, muestra que los poros de la muestra densa tienen un tamaño medio de 5.5 μm . Asimismo, resultan ser de 161 y 261 μm para los sustratos porosos. Por otra parte, el factor de forma (F_f) es de 0.99 para el

Capítulo 3

sustrato denso, mientras es de 0.67 para ambos sustratos porosos. En dicho análisis, en los sustratos porosos no se ha tenido en cuenta la porosidad más fina, identificada en el sustrato denso, con el fin de obtener únicamente la caracterización de los poros que genera el espaciador empleado.

La distribución de tamaños de poro (Figura 31) también es posible realizarla a partir de los datos obtenidos por análisis de imagen.

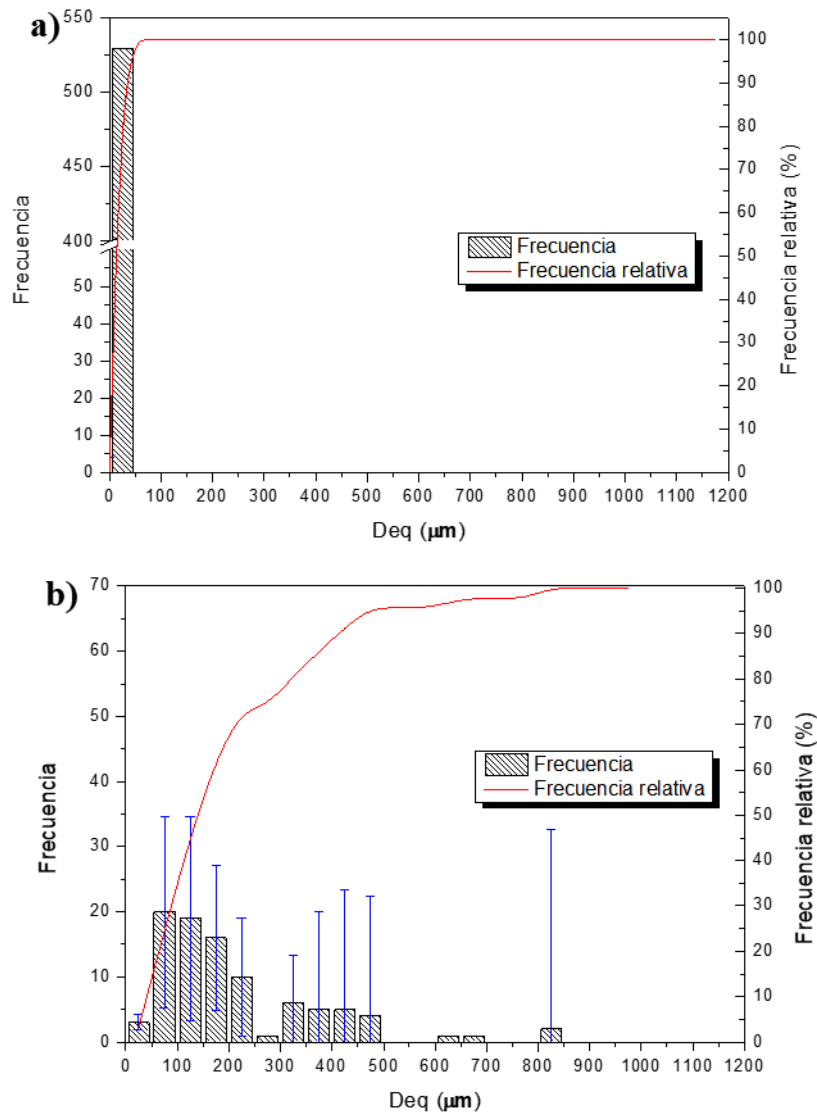


Figura 31. Distribuciones del D_{eq} de los poros, obtenidas por IA, de los sustratos de titanio a) denso y b) poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.

La Figura 31 a muestra que el 100% de los poros en el sustrato denso (del orden de 500 poros), son menores de 50 μm . Por el contrario, en los sustratos porosos

sólo se han contado menos de 5 poros de hasta 50 μm . Asimismo, los poros mayores de 50 μm son mucho menos numerosos, alcanzando algunos tamaños frecuencias de hasta 20 poros, mientras el total del número de poros mayores de 50 μm es alrededor de 100. No se ha presentado la gráfica correspondiente al sustrato poroso de 250-355 μm , cuyo resultado es similar.

La Tabla 17 recoge los valores de P_T (%), D_{eq} medio (μm), y rugosidad superficial del interior de los poros por unidad de volumen, Rug_{sup} (mm^2/mm^3), de los sustratos porosos de ambos rangos de tamaño de espaciador, obtenidos por micro-CT. Los sustratos densos, por su parte, no se contemplaron en el estudio de porosidad debido a las limitaciones en la resolución del equipo para micro-CT.

Tabla 17. Parámetros obtenidos por micro-CT de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm .

	Micro-CT		
	P_T (%)	D_{eq} medio (μm)	Rug_{sup} (mm^2/mm^3)
100-200 μm	49.8 \pm 11.4	172.6 \pm 6.4	17.3 \pm 1.3
250-355 μm	40.8 \pm 11.4	240.3 \pm 6.4	10.7 \pm 0.8

La porosidad total es de 49.8 y 40.8% para los sustratos porosos de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente. Es decir, disminuye al aumentar el tamaño del espaciador. Un comportamiento similar se observa con la Rug_{sup} , que pasa de 17.3 a 10.7 mm^2/mm^3 . Por el contrario, el tamaño medio de los poros pasa de 172.6 a 240.3 μm , al aumentar el tamaño del espaciador.

La Figura 32 muestra, para ambos sustratos porosos, la distribución de tamaño de los poros, representando la fracción volumétrica (%) frente al D_{eq} (μm). El D_{eq} , obtenido mediante micro-CT, presenta una distribución del tipo campana de Gauss, con valores de la anchura a media altura ($FWHM$) de 106.6 y de 98.5 μm para las muestras con tamaños de partícula de espaciador de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente, y desviaciones típicas de 45.3 y 41.8 μm , igualmente.

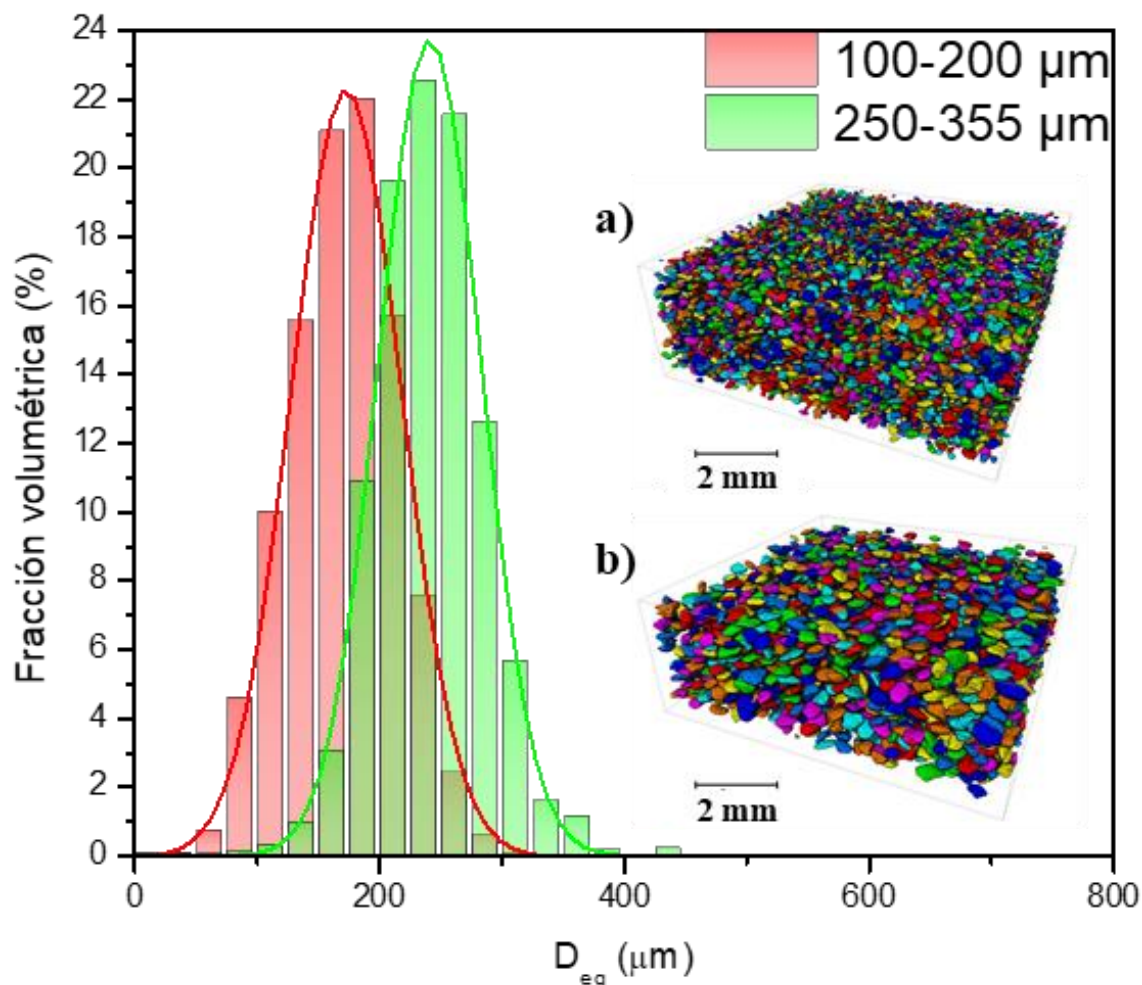


Figura 32. Distribución de tamaños de los poros. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) y reconstrucción en 3D de la tomografía de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador de a) 100-200 μm y b) 250-355 μm .

Adicionalmente, en la Figura 32 se representan en una reconstrucción 3D, la totalidad de poros segmentados y diferenciados en colores dentro de una matriz transparente que simula la matriz de titanio para cada sustrato poroso obtenido por micro-CT.

3.1.2 Caracterización de la superficie de los sustratos y las paredes de los poros

Las características de la superficie tienen una gran importancia pues nos permitirá conocer ésta y poder estudiar como varían con las modificaciones superficiales que se van a realizar y relacionar éstas con su influencia en la mejora del comportamiento biofuncional.

La caracterización por IA tratada anteriormente ha inferido características volumétricas de los sustratos tales como P_T , D_{eq} medio y F_f . Sin embargo, éstas fueron obtenidas propiamente a partir de una caracterización superficial de imágenes de microscopía óptica (*optical microscopy*, OM) y posterior IA. Por ello, todas estas características corresponden realmente a la porosidad de la superficie del material. La Figura 30 y la Tabla 16 presentaba, por lo tanto, micrografías de la superficie vírgenes de estudio, así como la P_T , D_{eq} medio y F_f de esas mismas características, justamente en el plano de la superficie del sustrato, respectivamente.

Tras el IA realizado, es de interés observar la superficie interna de los poros. En este sentido, la microscopía SEM muestra, de forma cualitativa, la topografía de los sustratos fabricados, así como del interior de los poros generados por el espaciador. La microscopía SEM, por tanto, muestra la superficie de los sustratos porosos una vez pulido (Figura 33 a y b), proporcionando las imágenes correspondientes a las de OM (Figura 30). Adicionalmente, a mayor magnificación, al adentrarse en los poros y observar sus paredes, se aprecia un cierto patrón de rugosidad (Figura 33 c y d), cuyo interés se discutirá más adelante.

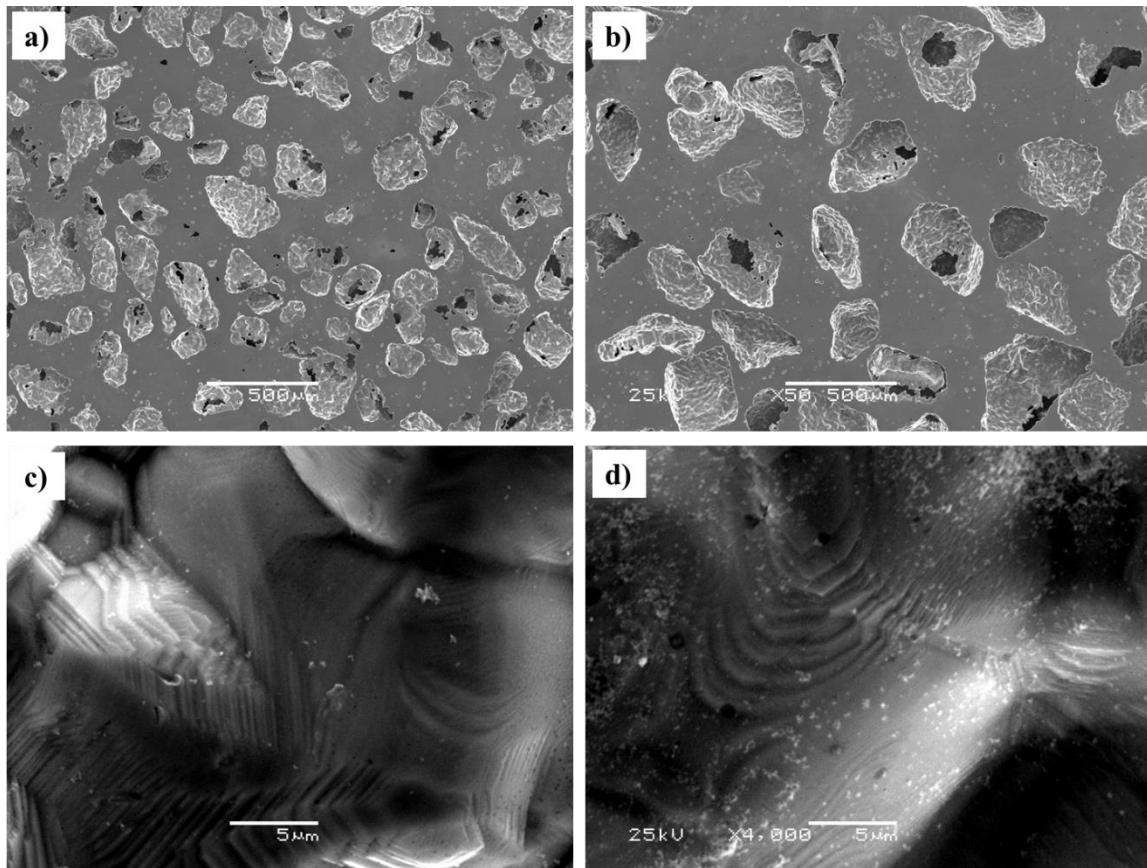


Figura 33. Micrografías SEM de la superficie y del interior de un poro de los sustratos porosos de titanio para diferente rango de tamaño de partícula de espaciador: a y c) 100-200 μm , b y d) 250-355 μm .

Adicionalmente, la técnica de micro-CT revela más información de forma detallada y visual de los sustratos porosos fabricados. Partiendo de los resultados de Rug_{sup} en mm^2/mm^3 obtenidos (Tabla 17), fue posible estimar el área plana (*flat area*, A_F), porosa (*porous area*, A_P) y total (*total area*, A_T) de cada uno de los sustratos (Tabla 18) justamente en la superficie de estos.

Tabla 18. Área estimada (A_F , A_P y A_T) de los sustratos porosos a partir de los datos obtenidos por micro-CT.

	Rug_{sup} (mm^2/mm^3)	Estimado			Volumen (mm^3)
		A_F (mm^2)	A_P (mm^2)	A_T (mm^2)	
Denso	-	107.7 ± 0.4	-	107.7 ± 0.4	-
100-200 μm	17.3 ± 1.3	54.0 ± 13.8	321.0 ± 44.8	375.0 ± 148.4	18.6 ± 1.2
250-355 μm	10.7 ± 0.8	59.9 ± 17.5	260.2 ± 29.6	320.1 ± 129.8	24.3 ± 0.9

Los resultados de Rug_{sup} obtenidos por micro-CT presentan valores de 17.4 y 10.7 mm^2/mm^3 para los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente. La estimación de áreas a partir de estos datos muestra un mayor A_P para la muestra de menor tamaño de espaciador (321.0 mm^2) frente a la de 250-355 μm (260.1 mm^2), mientras que el volumen revela una tendencia contraria (18.6 y 24.3 mm^3 para 100-200 y 250-355, respectivamente). Sin embargo, los valores de A_F , para ambos sustratos porosos, son similares entre ellos, siendo de 54.0 y 59.9 mm^2 para las muestras de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente. Como cabe esperar, el A_F de la muestra densa presenta una superficie mucho mayor que las porosas, de 107.7 mm^2 , siendo además el área total de la misma. Por su parte, las áreas totales A_T son mayores para las muestras porosas en comparación a la densa, consecuencia de la superficie adicional generada en los poros (rugosidad). El sustrato poroso de 100-200 μm muestra un valor total de 375.0 mm^2 , siendo de 320.1 mm^2 para el de 250-355 μm .

Por otra parte, la técnica de caracterización micro-CT, además, permite el estudio cuantitativo de la topografía del interior de los poros, obteniéndose parámetros de rugosidad de las paredes de éstos. En este contexto, la Figura 34 grafica la distribución de la rugosidad ponderada al volumen, Rug_{vol} (%) de los sustratos porosos. Asimismo, se acompaña de una reconstrucción del corte transversal en 2D de cada uno de los sustratos, donde se aprecian cualitativamente los distintos rangos de tamaño de poro.

Este parámetro, Rug_{vol} (%), no es un parámetro de rugosidad normalizado. Sin embargo, nos ofrece la posibilidad de comparar sus resultados entre los dos sustratos estudiados. Se observa que los valores de Rug_{vol} (%) son mucho menores para el sustrato 250-355 μm que para el 100-200 μm , mostrando, para las mayores frecuencias (904 y 1518, respectivamente), los valores correspondientes de 6.6 y 10.2 % de Rug_{vol} . Por el contrario, la distribución de este parámetro es más amplia para los sustratos de 100-200 μm que la del sustrato 250-355 μm . Las imágenes de la reconstrucción de un corte plano de los sustratos resultan muy ilustrativas y similares a la obtenidas por OM, lo que pone de manifiesto el potencial de esta técnica.

Capítulo 3

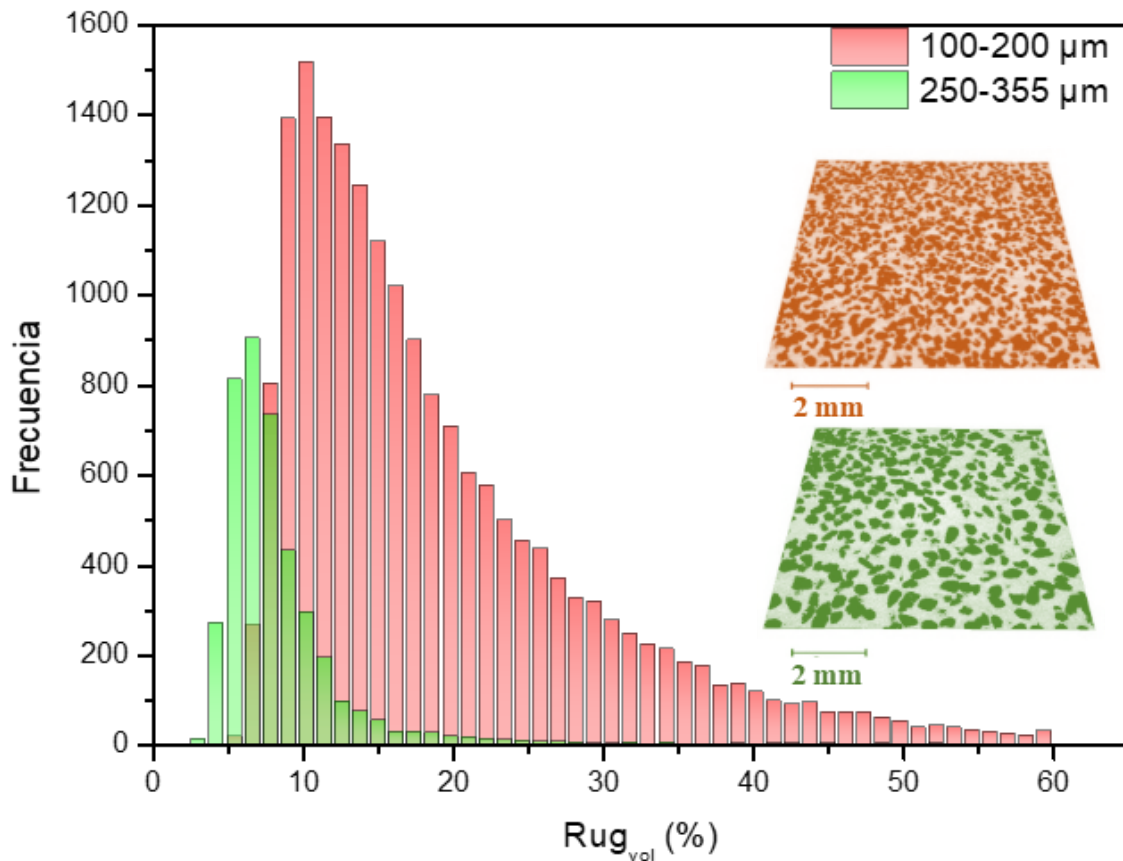


Figura 34. Distribución de Rug_{vol} (%) y corte transversal 2D de la tomografía de los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm.

Por su parte, igualmente, la microscopía confocal proporciona información no sólo cualitativa, sino también cuantitativa acerca de la rugosidad de los sustratos. La Figura 35 muestra las imágenes 2½ D de cada tipo de muestra porosa, distinguiendo entre zona plana e interior de los poros. En este tipo de imágenes es posible apreciar la profundidad de éstos mediante la asignación de una escala de colores adjunta, siendo las zonas más oscuras las correspondientes a mayor profundidad, es decir, la correspondiente a los poros.

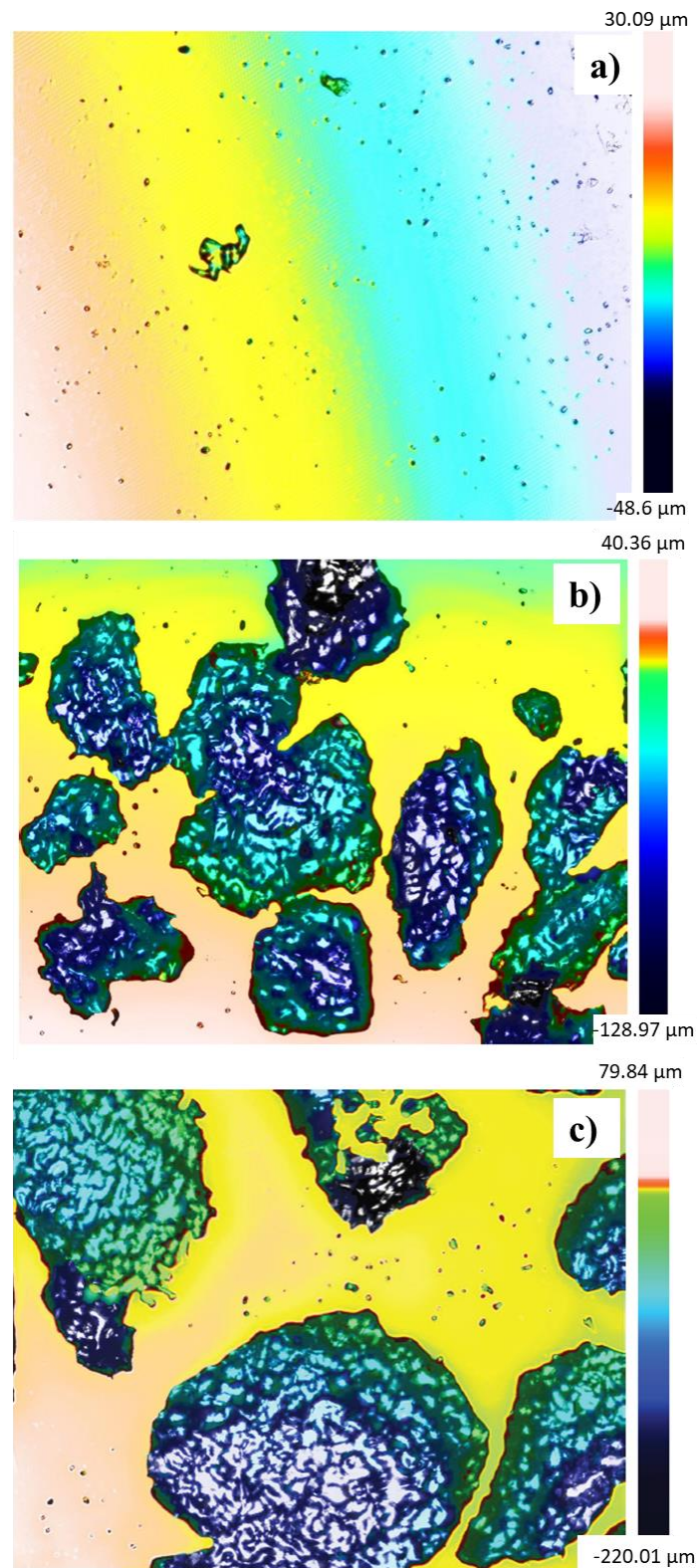


Figura 35. Imágenes 2 1/2 D de microscopía confocal láser de la superficie de los sustratos denso y porosos de titanio con diferente rango de tamaño de partícula de espaciador: a) denso, b) 100-200 μm y c) 250-355 μm . En estas imágenes se emplea una escala de colores para representar el relieve.

Capítulo 3

De la misma manera, la Figura 36 presenta la topografía de todos los sustratos en 3D mediante microscopía confocal, junto con las imágenes 2 ½ D correspondientes.

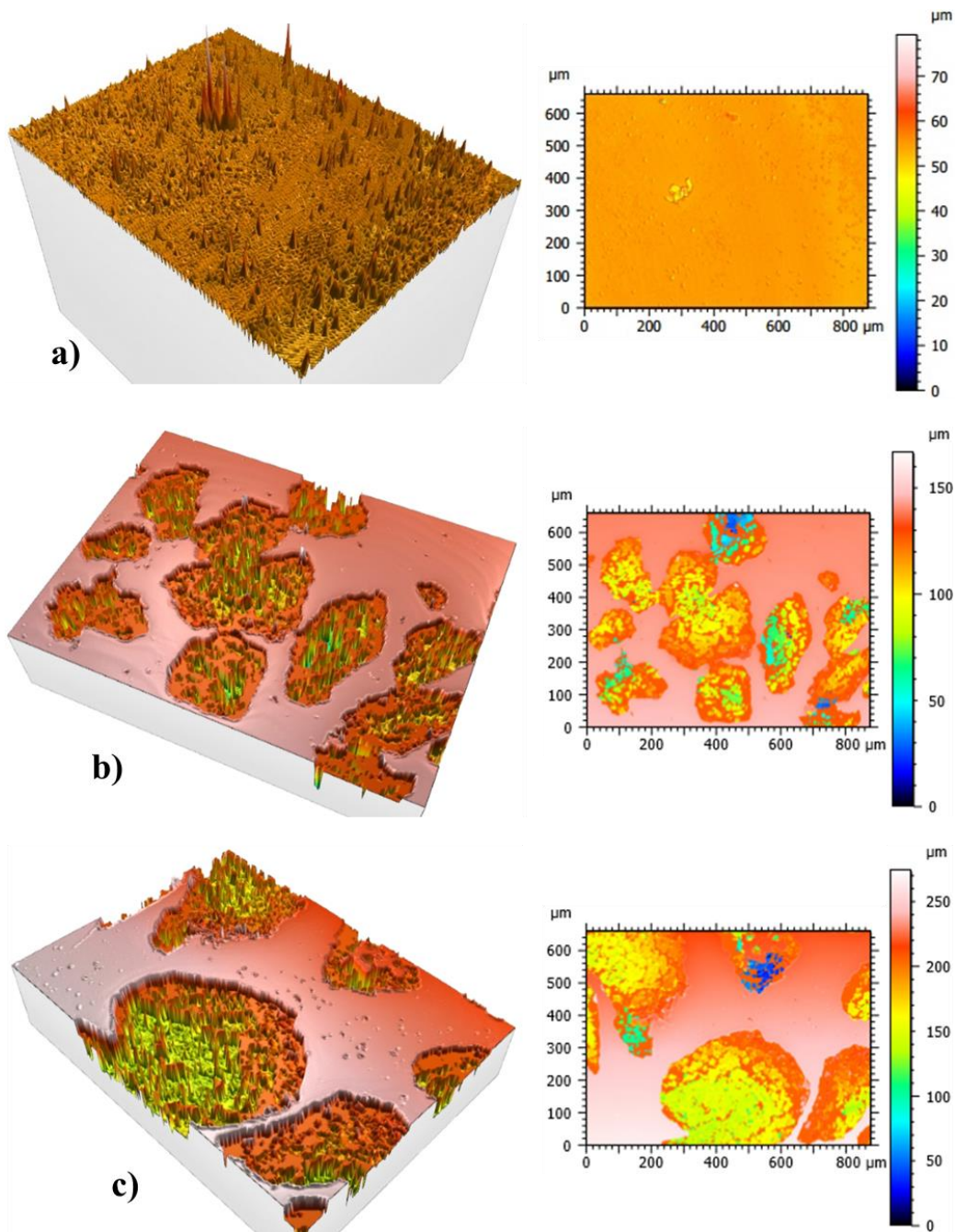


Figura 36. Imágenes 3D de microscopía confocal láser de la superficie de los sustratos denso y porosos de titanio con diferente rango de tamaño de espaciador: a) denso, b) 100-200 μm y c) 250-355 μm .

Además de las representaciones superficiales anteriores la microscopía confocal láser nos permite determinar los parámetros de rugosidad 3D normalizada

(Norma ISO 25178, [246]) presentados en la Tabla 19. Estos parámetros característicos corresponden a la altura media aritmética (S_a), altura media cuadrática (S_q) y altura máxima medida (S_z). Para ello, se ha diferenciado en la zona correspondiente a la matriz de titanio (zona plana) y los poros de la superficie (zona porosa).

Tabla 19. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z) obtenidos por microscopía confocal láser de las superficies de los macro-poros y la matriz de Ti en función del contenido y rango de tamaño de espaciador.

		P_T (%)	Parámetros de Rugosidad		
			S_a (μm)	S_q (μm)	S_z (μm)
Densa	Plana	2.9	0.7	11.0	79.2
100 – 200 μm	Plana	47.0	5.0	9.0	97.6
	Porosa		15.5	22.2	166.7
250 – 355 μm	Plana	46.4	3.4	8.8	147.2
	Porosa		30.8	4.0	274.2

En la parte plana, S_a es de 0.7 μm para el sustrato denso, siendo de 5.0 y 3.4 μm para los sustratos de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente. S_q es de 11.0 μm para el sustrato denso, al igual se ha obtenido 9.0 μm para el sustrato de 100-200 μm y 8.8 μm , para el de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador. Asimismo, S_z es de 79.2 μm para el sustrato denso, mientras que resulta ser de 97.6 y 147.2 μm , para los sustratos de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente.

En la parte porosa, el valor de S_a es de 15.5 y 30.8 μm , para los sustratos de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente. S_q por su parte, resulta ser 22.2 μm para el sustrato de 100-200 μm , mientras que para la muestra porosa de 250-355 μm es de 40.1 μm . Finalmente, para la parte porosa, S_z es de 166.7 y 274.2 μm , para los sustratos de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente.

3.1.3 Comportamiento macro y micro-mecánico

El análisis del comportamiento mecánico se llevó a cabo a través de dos técnicas distintas. Por un lado, mediante la técnica de ultrasonidos (US) se evaluó el módulo de Young dinámico gracias a la propagación de ondas transversales y longitudinales a lo largo de los sustratos. En segundo lugar, se realizó el ensayo

Capítulo 3

de compresión uniaxial con un objetivo similar: obtener el módulo de Young a través del análisis de la curva de tensión-deformación, así como el límite de fluencia. Este ensayo se realiza por la aplicación de la norma convencional del ensayo de compresión de materiales metálicos a temperatura ambiente, ASTM E9-9 [244]. Una vez se obtienen las propiedades mecánicas correspondientes de cada sustrato por estas vías, es posible compararlas con las correspondientes al hueso cortical, comprobando así si mediante el proceso de fabricación del titanio poroso empleado se resuelve el apantallamiento de tensiones.

La Figura 37 grafica las curvas de tensión (σ) - deformación (ε) de cada uno de los sustratos porosos de titanio tras el ensayo de compresión. No ha sido posible representar la gráfica del sustrato denso, ya que la máquina Instron tendría que aplicar cargas mayores de lo que nominalmente puede, por lo que no fue posible completar el ensayo.

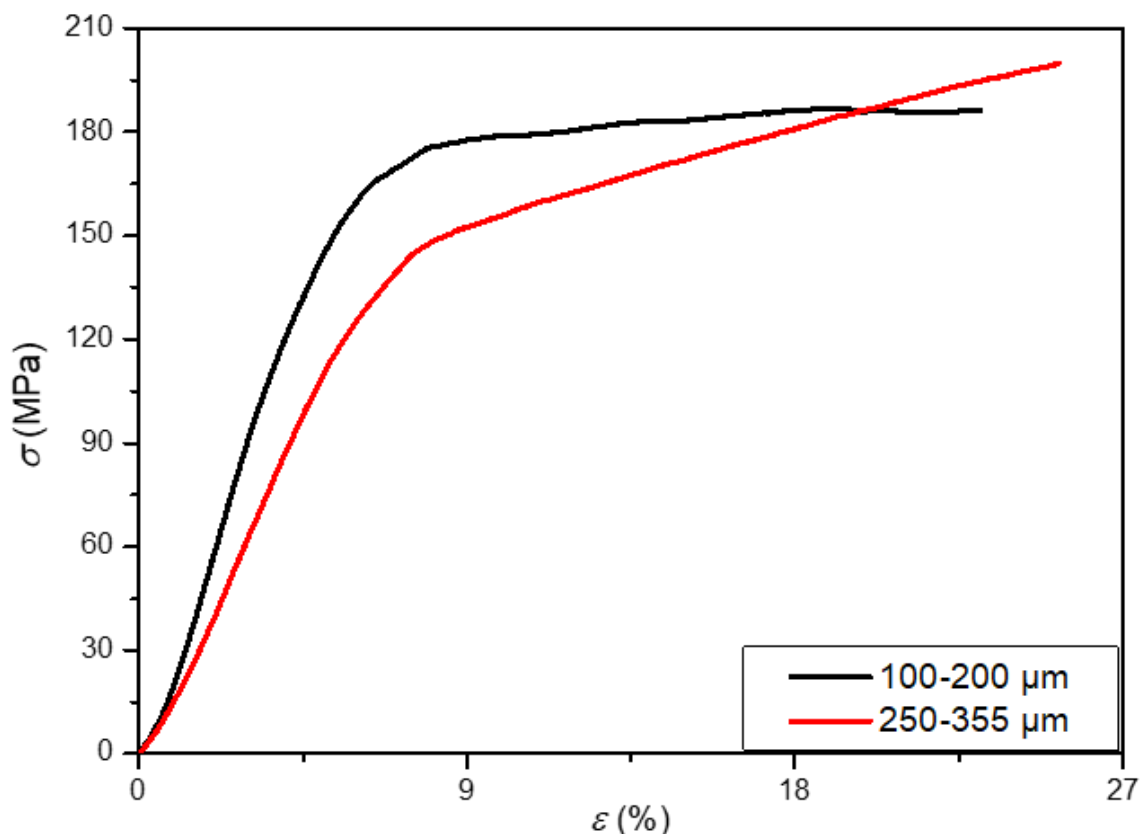


Figura 37. Curvas tensión (σ) -deformación (ε) obtenidas por el ensayo de compresión para los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm . Ensayo realizado bajo la norma ASTM E9-09 [244].

La Tabla 20 muestra los valores de las muestras de estudio del Módulo de Young dinámico obtenido por el ensayo de ultrasonidos, y del módulo de Young y límite de fluencia, obtenidos por el ensayo de compresión (Figura 11). Como referencia, los valores correspondientes del hueso de estos parámetros son de 20-25 GPa para el módulo de Young y de 150-180 MPa de límite de fluencia.

Tabla 20. Propiedades mecánicas de las muestras densa y porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm . E_d : módulo de Young dinámico obtenido por la técnica de ultrasonidos. E_c y σ_y : módulo de Young corregido y límite de fluencia, respectivamente, calculados por la norma convencional ASTM E9-09 [244].

	Técnica de US	Ensayo de compresión uniaxial ASTM E9-09	
	E_d (GPa)	E_c (GPa)	σ_y (MPa)
Denso	101.2 \pm 0.3	95.0 \pm 1.0	628.0 \pm 5.0
100-200 μm	20.8 \pm 0.1	26.0 \pm 0.9	126.9 \pm 21.0
250-355 μm	22.8 \pm 0.2	23.1 \pm 1.0	117.8 \pm 14.0

Los resultados de US muestran que E_d es 101.2 GPa para el sustrato denso y de 20.8 y 22.8 GPa, para los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente. El ensayo de compresión revela valores de E_c de 95.0 GPa para la muestra densa, así como de 628.0 MPa para σ_y . Por su parte, las muestras porosas de 100-200 y 250-355 μm presentan unos resultados de 26.0 y 23.1 GPa para el E_c , respectivamente, y de 126.9 y 117.8 MPa para el σ_y , respectivamente.

La Tabla 21 muestra la microdureza Vickers de cada una de las muestras de titanio, tanto densa como porosas, para distintas cargas aplicadas. En ambos casos, el ensayo se ejecutó en la matriz de titanio de los sustratos, con el fin de observar la influencia de la existencia y tamaño de los poros.

Capítulo 3

Tabla 21. Micro-dureza Vickers para cargas HV0.3 y HV1 sobre los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.

	Micro-dureza Vickers	
	HV0.3	HV1
Denso	377 \pm 39	342 \pm 16
100-200 μm	401 \pm 4	167 \pm 28
250-355 μm	356 \pm 25	152 \pm 28

Los resultados revelan que, para cargas de indentación bajas (HV0.3), los valores de microdureza son similares para ambos tipos de sustrato (denso y porosos), encontrándose en un intervalo de 350-400 HV0.3. Sin embargo, al incrementar la carga aplicada hasta HV1, disminuye la microdureza para los porosos, siendo 167 HV1 para el menor rango de tamaño de espaciador y ligeramente inferior para el mayor, con un valor de 152 HV1.

La Figura 38 muestra los ensayos de micro-indentación instrumentada Vickers con carga máxima de 1 N de los sustratos de titanio tras el proceso de sinterizado (denso y poroso de tamaño de espaciador 100-200 μm), donde P es la carga aplicada en N y h la penetración en el sustrato en μm [247-250]. Los ensayos se ejecutaron en matriz de titanio (sin abarcar poros) en todos los sustratos, con el objetivo de analizar la influencia de éstos.

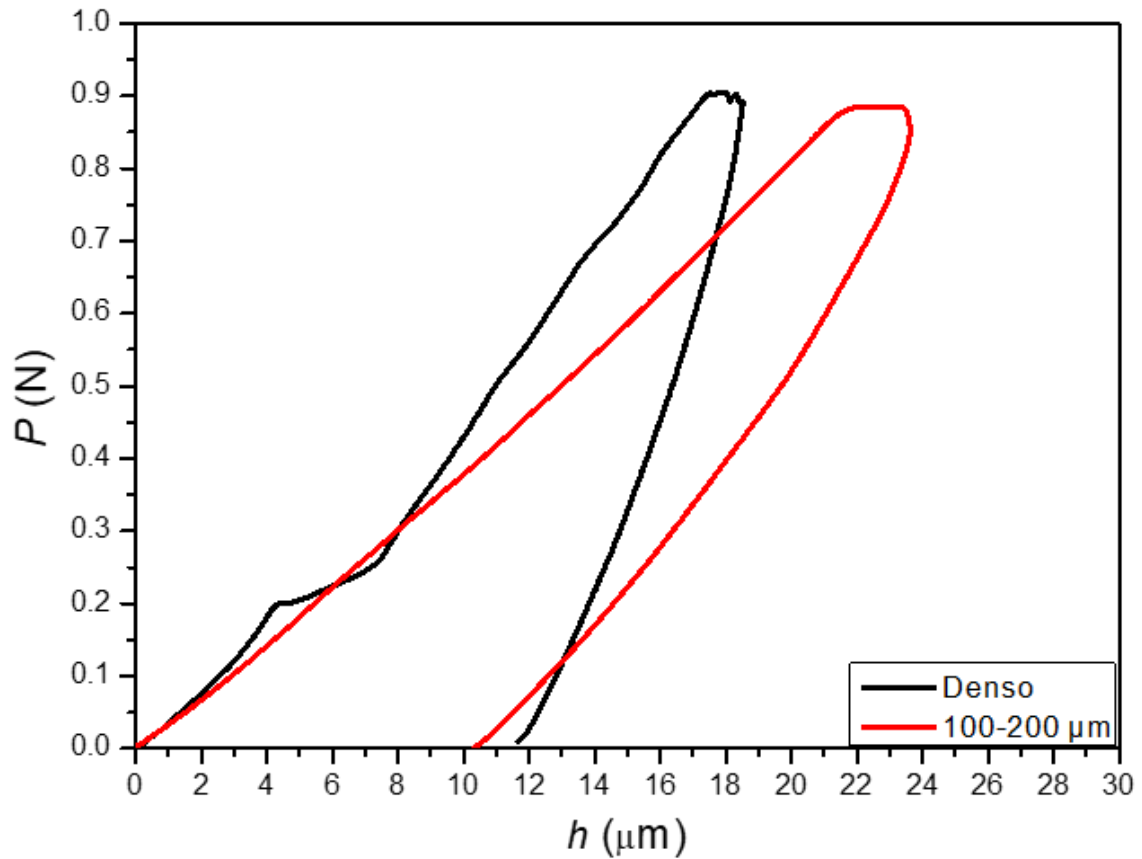


Figura 38. Curvas P-h para el sustrato denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.

La forma de las curvas sigue el esquema de la Figura 39. A partir de la misma, se realiza el análisis de las curvas, sabiendo que *A* corresponde a la carga máxima del ensayo, *B* a la penetración máxima y *C* a la penetración permanente. A partir de dichos puntos, se puede calcular la fluencia o fenómeno de *creep* a carga constante ($B-A$), así como la recuperación elástica $(B-C)/B$.

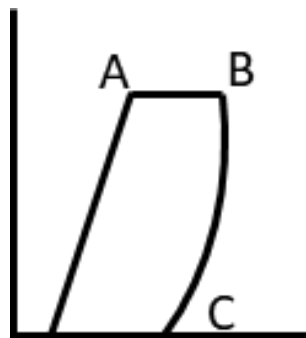


Figura 39. Esquema de las curvas P-h tras el ensayo de micro-indentación instrumentada para cada sustrato.

Capítulo 3

Los resultados obtenidos tras el estudio de las curvas de la Figura 38 se recogen en la Tabla 22.

Tabla 22. Parámetros principales de las curvas P-h del ensayo de micro-indentación instrumentada de los sustratos denso y poroso de tamaño de espaciador 100-200 μm vírgenes: A (carga máxima del ensayo), B (penetración máxima), C (penetración permanente), B-A (fluencia o creep a carga constante), (B-C)/B (recuperación elástica).

	A (μm)	B (μm)	C (μm)	B-A (μm)	(B-C)/B (%)
Densa	17.5	18.3	11.7	0.9	36.3
100-200 μm	21.7	23.1	10.3	1.4	55.5

Como era de esperar, la penetración máxima (B) resulta ser mayor para la muestra porosa de 100-200 μm frente a densa, con valores de 23.1 y 18.3 μm respectivamente. Sin embargo, la penetración permanente (C) presenta un valor algo mayor para la densa (11.7 μm) que para la porosa (10.3 μm), como consecuencia de una menor recuperación elástica (B-C)/B (36.3 y 55.5 %, respectivamente). En cuanto al fenómeno de *creep*, se obtiene un valor de 1.4 μm para el sustrato poroso de 100-200 μm algo mayor que para el denso que es de 0.9 μm .

3.1.4 Resistencia al rayado y desgaste

El estudio del comportamiento del sustrato tras someterlo a distintas cargas superficiales se hace indispensable con vistas a emplearlo como sustituto del hueso cortical. Una vez los implantes son insertados en el cuerpo humano, están sometidos a distintas cargas, que dan lugar a fricciones que generan desgaste. Por ello, se requiere un análisis de la respuesta que proporciona el material ante estas situaciones. Se analizaron diversas propiedades, además de la dureza del material, como la resistencia al rayado y la resistencia al desgaste.

El ensayo de rayado se ejecuta en tres etapas. La primera etapa corresponde a la pre-palpación, en la que se obtiene el perfil topográfico del sustrato, prácticamente sin ejercer carga. La segunda consiste en el propio rayado, aplicando una carga (constante o incremental) a la vez que el indentador se desplaza una determinada longitud, de forma que se genera un surco en la superficie de la muestra. Finalmente, la tercera etapa es conocida como penetración permanente, donde el indentador recorre de nuevo el surco

generado, prácticamente sin aplicar carga, obteniendo un nuevo perfil topográfico. Esta técnica permite determinar la recuperación elástica del sustrato, definiéndose como la diferencia existente entre las etapas de rayado y penetración permanente.

El ensayo de rayado se llevó a cabo a carga constante de 5 N y con un desplazamiento del indentador cónico-esferoidal tipo Rockwell de 2.5 mm. Los resultados del ensayo para las muestras densa y porosa de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm se grafican en la Figura 40. El otro sustrato de mayor rango de tamaño de espaciador presentó resultados similares a los correspondientes a 100-200 μm .

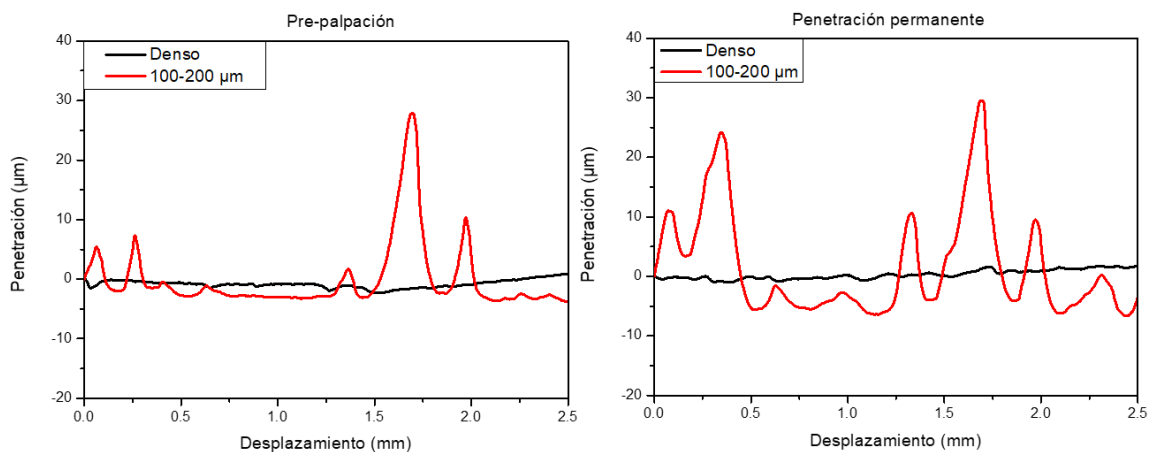


Figura 40. Perfil topográfico de los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm para la pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).

Las curvas anteriores presentan el perfil de la superficie de los sustratos, antes y después del rayado. Para el caso del sustrato denso, el perfil resulta ser muy homogéneo, sin apenas variaciones en su longitud. Sin embargo, la muestra porosa revela grandes diferencias de altura a lo largo de todo el recorrido en la etapa de pre-palpación, consecuencia de la existencia de poros. Por su parte, tras el rayado, las diferencias se acentúan, mostrando un perfil incluso más heterogéneo que el correspondiente a la pre-palpación, tanto en el interior de los poros como en la parte plana.

La interpretación de estas gráficas requiere la determinación varios parámetros. Los parámetros de rugosidad 2D tras el ensayo de rayado, tales como la

Capítulo 3

rugosidad media aritmética (R_a), media cuadrática (R_q) y la altura de las irregularidades en 10 puntos (R_z), se recogen en la Tabla 23.

Tabla 23. Parámetros de rugosidad de la topografía de los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm para la pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).

		R_a (μm)	R_q (μm)	R_z (μm)
Denso	Pre-palpación	1.1	1.3	5.5
	Penetración permanente	1.0	1.3	4.7
100-200 μm	Pre-palpación	3.5	5.2	32.5
	Penetración permanente	6.7	9.1	36.3

Los datos de la Tabla 23 muestran valores similares tanto en la etapa de pre-palpación como en la de penetración permanente para el sustrato denso (del orden de 1.0 μm para R_a , de 1.3 μm para R_q , y de 5.5 μm para R_z), mientras que para el poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, los resultados son ligeramente mayores en la etapa de penetración permanente. En este sentido, para el poroso se revela un R_a de 3.5 y de 6.7 μm en las etapas de pre-palpación y de penetración permanente, respectivamente, siendo de 5.2 y 9.1 μm para R_q en las correspondientes etapas y de 32.5 y 36.3 μm para R_z , respectivamente.

Tras el ensayo de rayado, los sustratos, denso y porosos de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador, experimentan una recuperación elástica en el surco generado. Esa recuperación elástica resulta ser la diferencia entre la penetración durante el rayado y la profundidad de penetración permanente que queda en el sustrato, las cuales se grafican en la Figura 41 para ambos materiales. Los parámetros principales de este análisis se presentan en la Tabla 24 para ambos tipos de sustrato, denso y de tamaño de espaciador 100-200 μm . Para el caso de la muestra de 250-355 μm , los resultados fueron similares al este último.

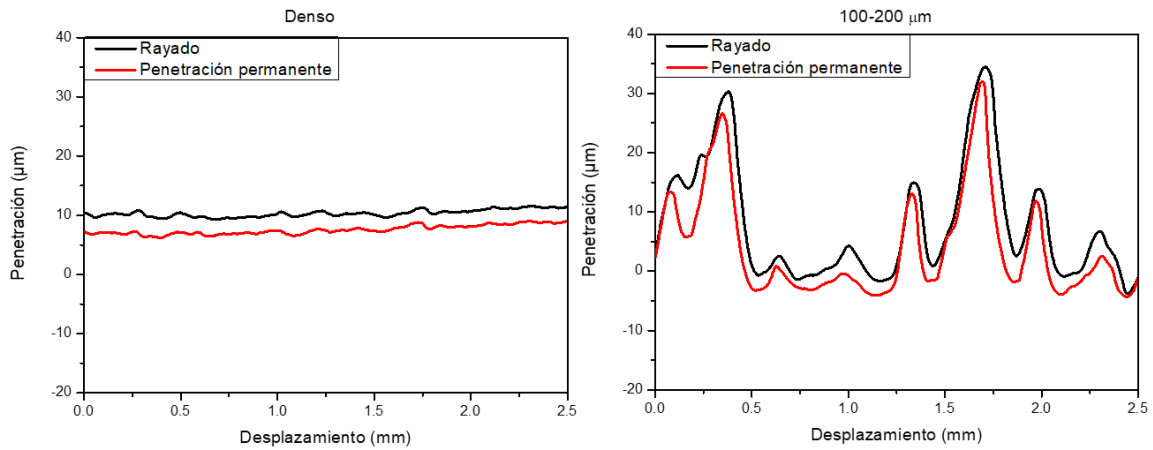


Figura 41. Recuperación elástica de los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 µm durante y tras el rayado (penetración permanente).

De igual forma que anteriormente, la interpretación de estas gráficas requiere la determinación varios parámetros. Los parámetros de rugosidad 2D tras el ensayo de rayado, tales como, valor medio de penetración (V_m), recuperación elástica (RE), penetración máxima ($Máx$) y mínima ($Mín$) y diferencia máxima ($\Delta máx$) y mínima ($\Delta mín$) de los valores máximo y mínimo de penetración, se recogen en la Tabla 24.

Tabla 24. V_m , RE , $Máx$ y $Mín$, y $\Delta máx$ y $\Delta mín$ de los valores máximo y mínimo de penetración para los sustratos denso y poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 µm durante y tras el rayado (penetración permanente).

		V_m (µm)	RE (µm)	$Máx$ (µm)	$Mín$ (µm)	$\Delta máx$ (µm)	$\Delta mín$ (µm)
Densa	Rayado	10.7	2.8	13.6	9.3	7.4	1.6
	Penetración permanente	7.9		10.9	6.2		
100-200 µm	Rayado	8.8	4.0	34.5	-4.4	38.8	36.3
	Penetración permanente	4.9		31.9	-4.4		

Los valores medios de penetración (V_m) son mayores para la muestra densa que para la porosa de 100-200 µm, siendo 10.7 µm para el rayado y 7.9 µm para la penetración permanente, frente a 8.8 µm y 4.9 µm para el sustrato poroso, respectivamente. Dichos resultados originan una recuperación elástica (RE) mayor para el sustrato poroso (4.0 µm) que para el denso (2.8 µm). Sin embargo,

Capítulo 3

la muestra porosa presenta valores mayores de penetración, tanto mínima (*Mín*) como máxima (*Máx*), en ambas etapas de rayado (-4.4 y 34.5 μm , respectivamente) y de penetración permanente (-4.4 y 31.9 μm , respectivamente). El sustrato denso, por su parte, obtuvo valores de penetración permanente máxima (*Máx*) y mínima (*Mín*) en la etapa de rayado de 13.6 y 9.3 μm , y de 10.9 y 6.2 μm . Estos resultados, generan una diferencia máxima (Δ *máx*) de 7.4 μm para la densa y 38.8 μm para la porosa, así como diferencias mínimas (Δ *mín*) de 1.6 y 36.3 μm , respectivamente.

La Figura 42 presenta micrografías SEM de los surcos generados en el ensayo de rayado.

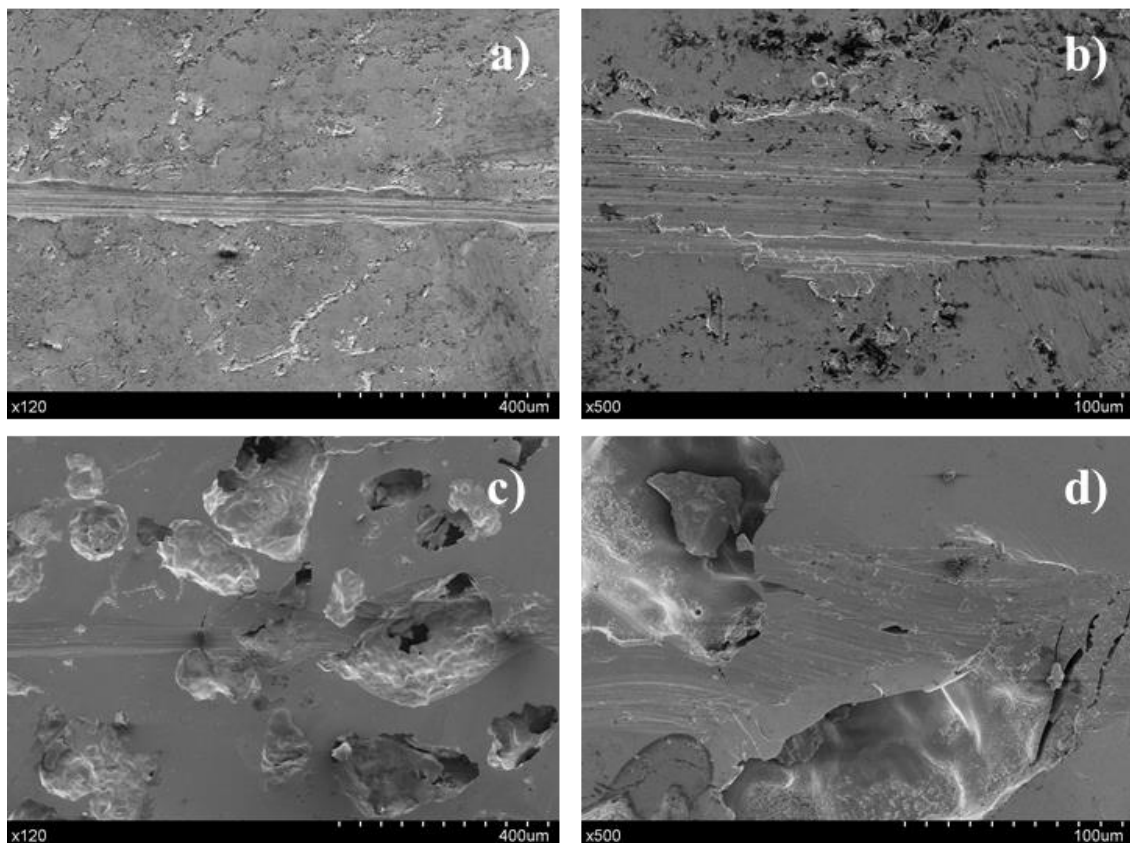


Figura 42. Imágenes SEM del surco generado en el ensayo de rayado para las muestras densa a) 120X, b) 500X y porosa de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador c) 120X, d) 500X.

El surco generado en el sustrato denso resulta ser continuo, claro y bien definido, con un ancho regular a lo largo de todo el recorrido. Por el contrario, el surco correspondiente al sustrato poroso es discontinuo como consecuencia de la

existencia de poros, además de presentar un ancho de surco variable a lo largo de su longitud.

El ensayo de desgaste es de gran interés en el estudio del comportamiento tribológico de los sustratos. Como se ha referido anteriormente, los implantes se encuentran sometidos a grandes esfuerzos de fricción una vez son introducidos en el cuerpo humano. La necesidad de análisis de la resistencia de los sustratos fue, en este contexto, de suma importancia.

El par tribológico empleado en estos ensayos ha sido una bola de alúmina sobre el sustrato de titanio a 5 N y 500 rpm. La elección de la alúmina está ligada a dos razones fundamentales. En primer lugar, la alúmina es un material más duro que el titanio, lo que garantiza que sea este último el que se desgaste por la alúmina y no al revés. La segunda razón, es que hoy en día existen biomecanismos implantados en el cuerpo humano que son una combinación de alúmina y titanio, por lo que la ejecución de dicho ensayo se aproxima a situaciones reales.

La Figura 43 muestra el coeficiente de fricción y la profundidad del surco (*linear variable differential transformer*, LVDT), en función de la distancia recorrida para las probetas densa y porosa de rango de tamaño de espaciador 100-200 μm generados *in situ* durante el ensayo de desgaste.

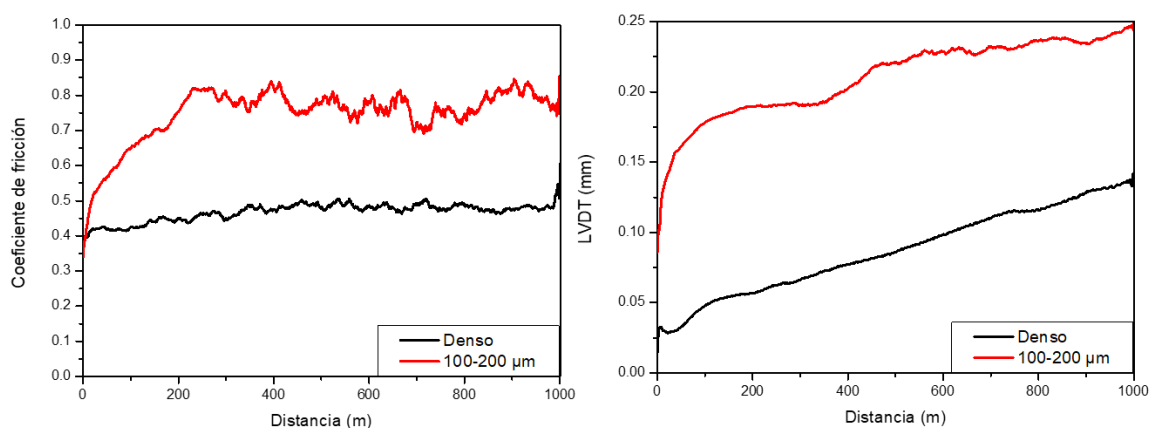


Figura 43. Coeficiente de fricción (izquierda) y profundidad del surco-LVDT en mm (derecha) en función de la distancia recorrida en m para los sustratos denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de espaciador.

Las gráficas obtenidas muestran valores del coeficiente de fricción en torno al 0.8 para el sustrato poroso, siendo del orden de 0.4 para el denso. En cuanto al

Capítulo 3

LVDT, ambas presentan una tendencia creciente con la distancia recorrida, semejante a una recta para el caso de la muestra densa, la cual presenta un valor máximo de 0.12 mm tras recorrer una distancia de 1 km. La porosa, sin embargo, es menos homogénea y de mayor valor que la densa, alcanzando los de 0.25 mm. muestra la evolución de la penetración del indentador en función de la distancia recorrida en cada uno de los ensayos. Estas gráficas muestran una primera etapa llamada de rodaje, y corresponde al tiempo necesario del acoplamiento entre la superficie de la bola y del sustrato. Seguidamente, tiene lugar la etapa de desgaste lineal estable, en la que puede evaluarse la tasa de desgaste del material en las condiciones del ensayo impuestas.

La Figura 44 muestra la micrografía de la totalidad de la superficie (a y c), así como una sección del surco generado (b y d) tras el ensayo de desgaste para el sustrato denso y el poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador. Los resultados obtenidos para la muestra porosa de 250-355 μm fueron muy similares a los del menor rango de tamaño de partícula de espaciador en comparación con el denso.

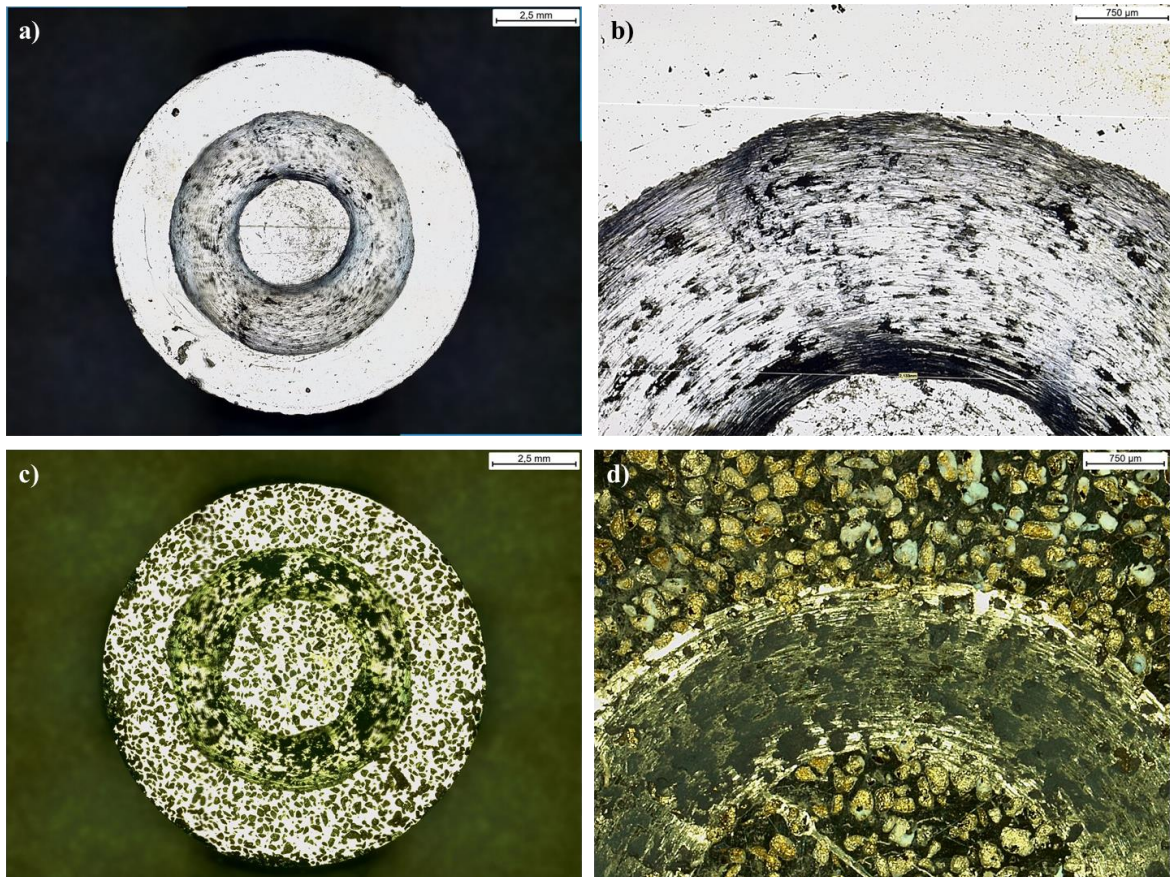


Figura 44. Micrográficas de la superficie de los sustratos tras el ensayo de desgaste por OM: a) denso y c) poroso de 100-200 μm , así como, con más detalle, por microscopía confocal para los sustratos: b) denso y d) poroso de 100-200 μm .

El estudio micrográfico, junto con la masa de las muestras, nos permite obtener la Tabla 25, que recopila los valores de los parámetros principales del ensayo de desgaste para las muestras densa y porosa de tamaño de partícula de 100-200 μm . Estos parámetros son: pérdida de masa del disco (Δm), volumen desgastado (ΔV), ancho del surco (w), penetración del surco (h), tasa de desgaste absoluto (K_{abs}) y tasa de desgaste normalizado (K)

Tabla 25. Parámetros principales del ensayo de desgaste para la muestra densa y la muestra porosa de 100-200 μm de rango de tamaño de espaciador: Δm , ΔV , w , K_{abs} y K .

	Δm (g)	ΔV (mm^3)	w (mm)	h (mm)	K_{abs} (mm^3/m)	K
Densa	$1.7 \cdot 10^{-2}$	2.5	2.1	0.4	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$
100-200 μm	$4.8 \cdot 10^{-3}$	1.2	1.7	0.3	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$8.4 \cdot 10^{-4}$

Capítulo 3

La Tabla 25 revela que la Δm es de $1.7 \cdot 10^{-2}$ y de $4.8 \cdot 10^{-3}$ g para la muestra densa y porosa de 100-200 μm , respectivamente. Por su parte, el ΔV resulta ser de 2.5 mm^3 para el sustrato denso, mientras que es de 1.2 mm^3 para el poroso. En cuanto a w , presenta valores de 2.1 y 1.7 mm para el sustrato denso y poroso de 100-200 μm , respectivamente. La penetración del surco, h , presenta resultados de 0.4 mm para la muestra densa y de 0.3 mm para la porosa. Las tasas de desgaste absoluto, así como las tasas normalizadas, obtienen valores de $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3/\text{m}$ y de $2.2 \cdot 10^{-3}$ para el sustrato denso, respectivamente. Asimismo, para la porosa los valores son de $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3/\text{m}$ y de $8.4 \cdot 10^{-4}$, respectivamente.

3.1.5 Evaluación del comportamiento *In vitro*

La necesidad de conocer el comportamiento biológico de los sustratos fabricados resulta indispensable para completar la caracterización realizada. Para una mejor osteointegración, se requiere de una buena adhesión, proliferación y diferenciación celular hacia el tejido óseo. Sin embargo, al mismo tiempo, se ha de evitar la adhesión y colonización bacteriana que desemboca en infecciones y, por tanto, en la pérdida de funcionalidad del material empleado en el reemplazo de tejido óseo.

Cultivos celulares C2C12

Para el estudio de citotoxicidad (adhesión y proliferación celular) sobre los sustratos de titanio, se empleó la línea celular C2C12 de preoblastos de ratón (*ATCC, American Type Culture Collection*). Dichas células fueron transfetadas con un lentivirus, con el fin de introducir una proteína verde fluorescente (GFP) que permitirá realizar el análisis por microscopía invertida de fluorescencia.

La adhesión celular (Figura 45), así como la proliferación sobre los sustratos (Figura 46), se llevó a cabo mediante el ensayo Alamar Blue (ThermoFisher, USA). De esta forma, ha sido posible cuantificar la viabilidad y citotoxicidad celular.

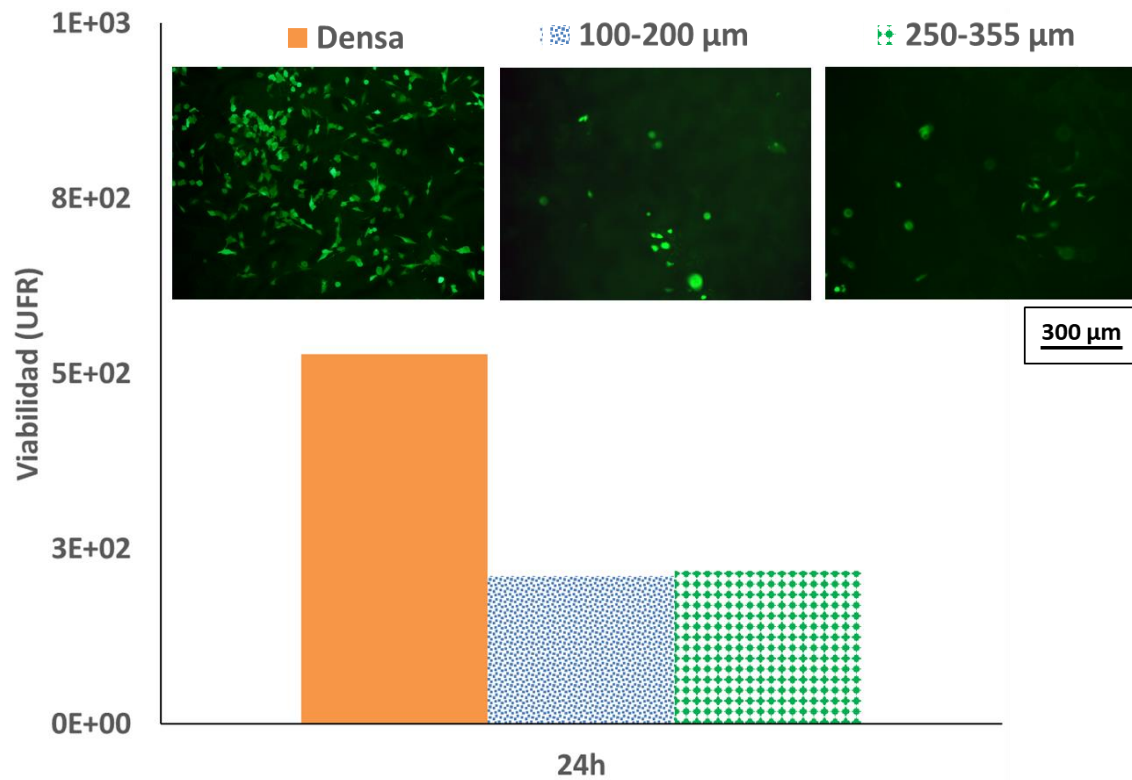


Figura 45. Adhesión celular C2C12-GFP sobre los sustratos denso y porosos de rango de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm tras 24 h de cultivo. Viabilidad e imágenes obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia.

Capítulo 3

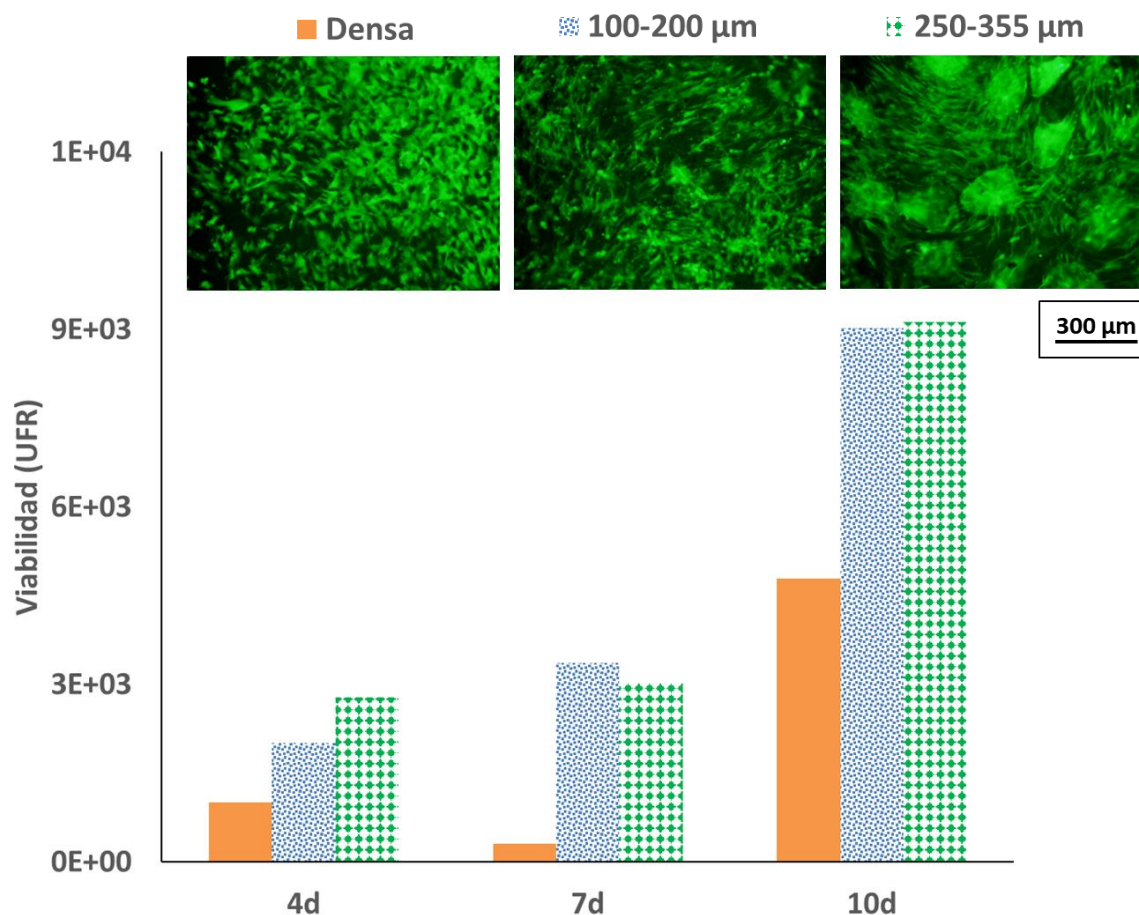


Figura 46. Proliferación celular C2C12-GFP sobre los sustratos denso y porosos de rango de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm tras 4, 7 y 10 días de cultivo. Viabilidad e imágenes obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia.

La Figura 45 presenta, tras 24 h, mayor adhesión celular para la muestra densa que para las porosas, alcanzando los $5.3 \cdot 10^2$ UFR frente a $2.1 \cdot 10^2$ y $2.2 \cdot 10^2$ UFR para los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm, respectivamente. En cuanto a las imágenes de adhesión correspondientes de microscopía invertida de fluorescencia (Figura 45), se observa una mayor densidad celular sobre el sustrato denso que sobre ambos porosos tras 24 h de cultivo.

Sin embargo, la Figura 46 presenta una tendencia distinta en cuanto a la proliferación celular, de forma que los sustratos porosos revelan unos niveles mucho mayores que el denso. Así, tras 4 días de cultivo, las muestras porosas de 100-200 y 250-355 μm muestran valores de $2.0 \cdot 10^3$ y $2.7 \cdot 10^3$ UFR, respectivamente, mientras que la densa obtuvo $1.0 \cdot 10^3$ UFR. Transcurridos 7 días de cultivo, las diferencias entre sustratos se hacen más acusadas,

mostrando valores de $3.4 \cdot 10^3$ UFR para el de 100-200 μm , de $3.0 \cdot 10^3$ UFR para 250-355 μm y un gran descenso para el denso ($0.3 \cdot 10^3$ UFR). Finalmente, tras 10 días la proliferación celular experimenta un crecimiento elevado en la totalidad de muestras, presentando valores muy similares y significativos en el caso de las porosas ($9.0 \cdot 10^3$ y $9.1 \cdot 10^3$ UFR para 100-200 y 250-355 μm , respectivamente), frente al sustrato denso ($4.8 \cdot 10^3$ UFR). Por su parte, las imágenes análogas de proliferación celular (Figura 46) revelan una densidad celular muy similar para las tres muestras en la parte plana. Sin embargo, destaca en los sustratos porosos una concentración celular mucho mayor tanto en los bordes como en el interior de los poros, especialmente en el de 250-355 μm .

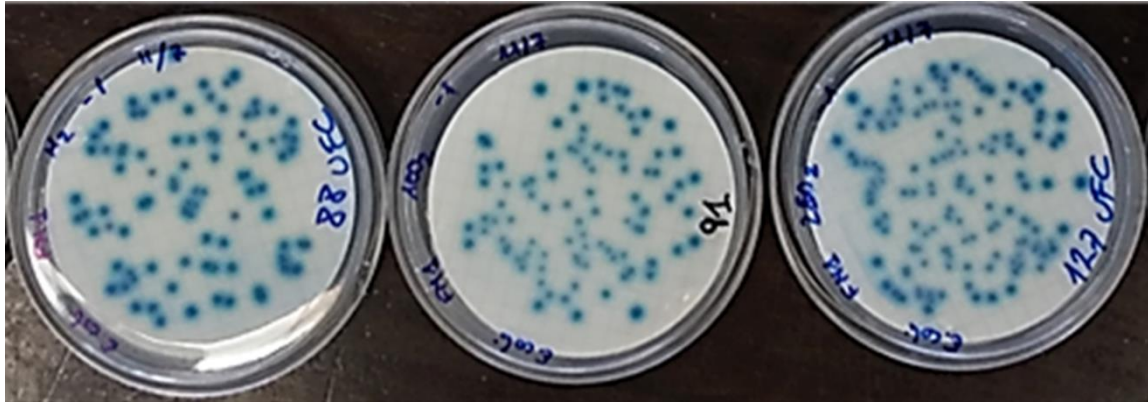
Proliferación de cepas de bacterias (*E. coli*, *MRSA* y *P. aeruginosa*)

La viabilidad celular sobre los sustratos de titanio implica de forma directa la posibilidad de proliferación de bacterias y, por tanto, de la aparición de infecciones, tal y como se comentó anteriormente. En este contexto, se realizó un estudio de proliferación bacteriana por dos métodos distintos. El primer método (método 1), se llevó a cabo mediante el empleo de una cepa de *E. coli*. Por su parte, el segundo método (método 2), se siguió para dos cepas distintas: *MRSA* y *P. aeruginosa*.

El método 1 para la cepa gramnegativa *E. coli* (ATCC 25922), se compuso de tres protocolos de estudio distintos (P1, P2 y P3) y para tres concentraciones distintas: $7.8 \cdot 10^4$ (Concentración 1), $3.3 \cdot 10^3$ (Concentración 2) and $4.3 \cdot 10^2$ (Concentración 3) unidades de formación de colonias (UFC) por 100 ml. Por su parte, el protocolo P1 consistió en el análisis de la solución en la que los sustratos fueron sumergidos por filtración por membrana, el protocolo P2 se focalizó en la superficie plana de los sustratos, realizando un frotis de ésta y, por último, el protocolo P3 consistió en el estudio de las bacterias adheridas al interior de los poros mediante filtración por membrana.

La Figura 47 muestra los resultados de proliferación de *E. coli* sobre los diferentes sustratos de titanio tras el Protocolo P1.

Capítulo 3



Denso

100-200 µm

250-355 µm

Figura 47. Macrográficas de la proliferación de E. coli sobre los diferentes sustratos de titanio: Denso, 100-200 µm y 250-355 µm (Protocolo P1, Concentración 1).

Tras realizar el Protocolo P1 con Concentración 1, la Figura 47 muestra densidades de *E. coli* similares en los sustratos denso y poroso de 100-200 µm (88 y 91 UFC, respectivamente), siendo superior para la muestra porosa de 250-355 µm (127 UFC).

La Figura 48 presenta los resultados obtenidos tras el análisis de las tres concentraciones de solución estudiadas por filtración por membrana (Protocolo P1), donde fueron sumergidos los sustratos. Los resultados obtenidos tras el conteo de unidades de formación de colonias fueron comparados con los correspondientes a la solución de referencia (sin sustrato).

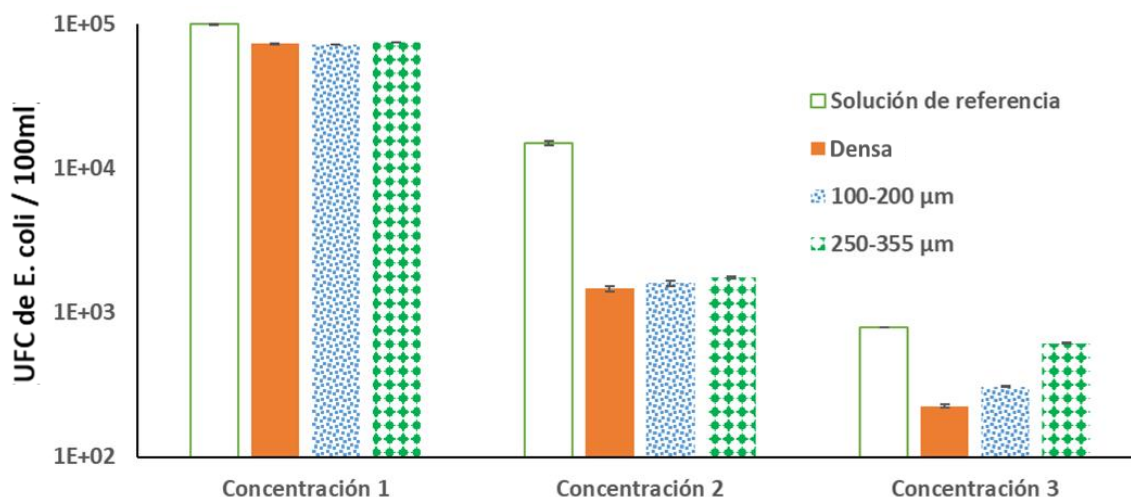


Figura 48. Unidades de formación de colonias de E. coli tras la filtración por membrana (Protocolo P1).

En general, para todas las concentraciones estudiadas, la solución de referencia presenta niveles mayores que para las soluciones en las que se sumergieron los sustratos, siendo de $1.0 \cdot 10^5$ UFC/100 ml para la concentración 1, y de $1.5 \cdot 10^4$ UFC/100 ml y $7.9 \cdot 10^2$ UFC/100 ml para las concentraciones 2 y 3, respectivamente (Figura 48). Los valores de los sustratos denso y porosos fueron similares para la concentración 1, siendo de $7.3 \cdot 10^4$ UFC/100 ml para el denso y de $7.2 \cdot 10^3$ y $7.5 \cdot 10^3$ UFC/100 ml para las muestras porosas de 100-200 y 250-355 µm, respectivamente. La concentración 2, presenta niveles considerablemente más bajos con respecto a la solución de referencia ($1.5 \cdot 10^4$ UFC/100 ml), siendo de $1.5 \cdot 10^3$ UFC/100 ml para el denso, de $1.6 \cdot 10^3$ UFC/100 ml para la muestra porosa de 100-200 µm y de $1.8 \cdot 10^3$ UFC/100 ml para la porosa de 250-355 µm. Por último, la concentración 3 revela diferencias más acusadas en cuanto a los sustratos se refiere, aumentando el número de UFC/100 ml en función del tamaño de poro. Así, mientras que el sustrato denso obtuvo como resultado $2.3 \cdot 10^2$ UFC/100 ml, la muestra porosa de 100-200 µm alcanzó el valor de $3.1 \cdot 10^2$ UFC/100 ml y el de 250-355 µm, de $6.1 \cdot 10^2$ UFC/100 ml.

En cuanto a la proliferación de *E. coli* sobre la superficie plana de las muestras densa y porosas tras la realización de un frotis (Protocolo P2), no hubo resultados. Sin embargo, la proliferación que tuvo lugar en el interior de los poros de los sustratos porosos por filtración por membrana (Protocolo P3) se

Capítulo 3

representa en la Figura 49. Estos valores se obtuvieron tras el conteo de unidades de formación de colonias, y se representan tanto en valor absoluto como normalizado (a partir de los valores de la Tabla 18 para las áreas superficiales de cada probeta).

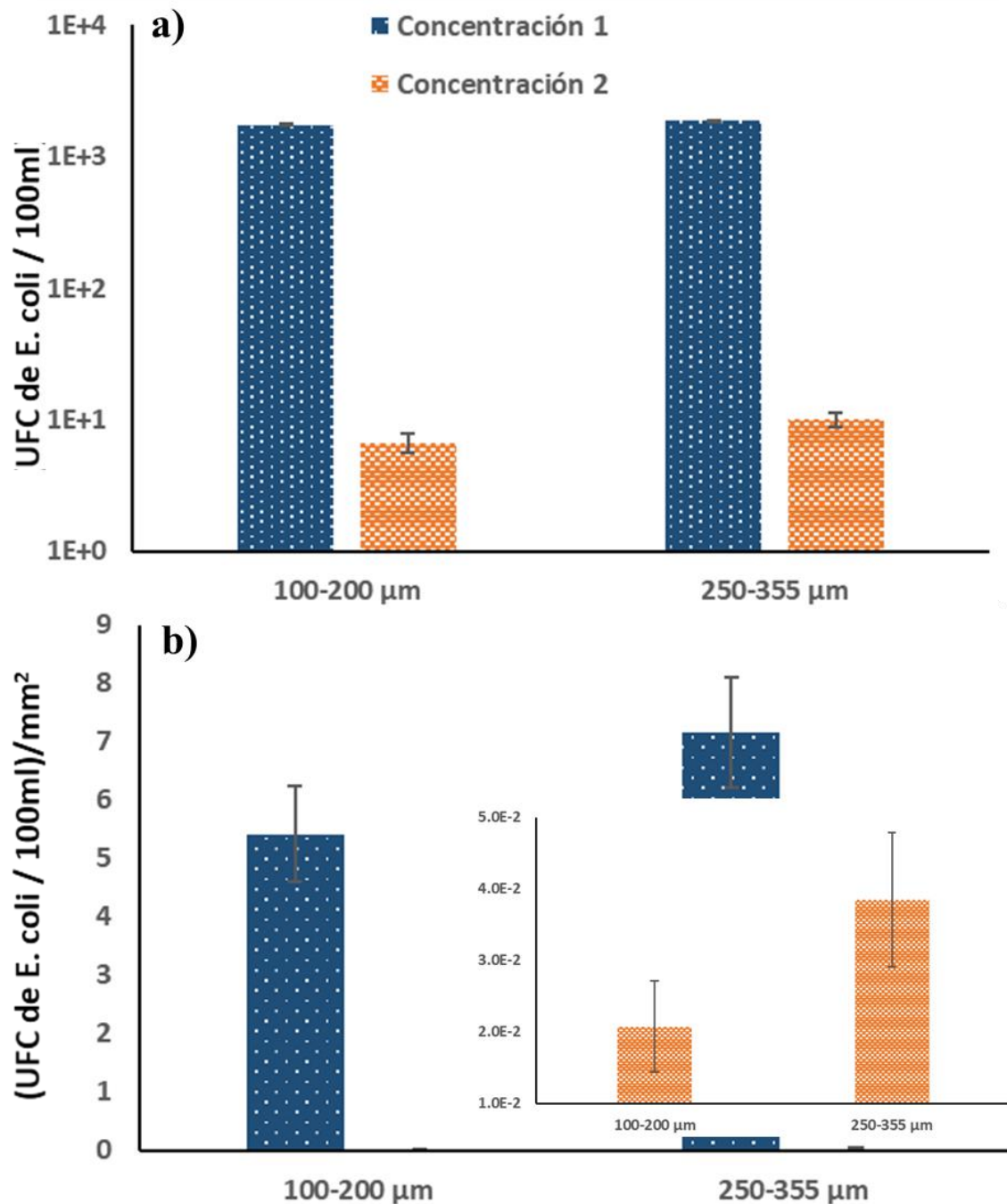


Figura 49. Unidades de formación de colonias de *E. coli* en el interior de los poros de los sustratos porosos por filtración por membrana (Protocolo P3): a) valores absolutos; b) valores normalizados (se ha superpuesto una gráfica en otra dada la fuerte diferencia entre los valores de UFC, de dos órdenes, entre concentración 1 y la 2).

Resultados

Los resultados de la Figura 49 muestran sólo los valores de las Concentraciones 1 y 2 tras la realización del protocolo P3, ya que la concentración 3 presentó valores despreciables en comparación del resto. Los valores absolutos mostraron, en el sustrato poroso de 100-200 μm , resultados de $1.7 \cdot 10^3$ UFC/100 ml para la Concentración 1 y de 6.7 UFC/100 ml para la Concentración 2, mientras que para el rango de tamaño de poro mayor los valores fueron de $1.9 \cdot 10^3$ UFC/100 ml y de $1.0 \cdot 10^1$ UFC/100 ml, respectivamente. Sin embargo, los valores normalizados por unidad de superficie para la Concentración 1, son de 5.4 UFC/100 ml/mm² para el sustrato de menor rango de tamaño de espaciador y de 7.2 para el de 250-355 μm . Para la Concentración 2, por su parte, resultan ser de $2.1 \cdot 10^{-2}$ y de $3.8 \cdot 10^{-2}$ UFC/100 ml/mm², respectivamente.

El estudio de la cepa gramnegativa *P. aeruginosa* (ATCC 27583), por el método 2, se llevó a cabo para una concentración inicial de 10^4 UFC/ml (dilución 0). La Figura 50 muestra las macrográficas de los resultados de proliferación de *P. aeruginosa* sobre los diferentes sustratos de titanio, para la solución en la que fueron sumergidos (dilución 0) y las de 1:10 (dilución -1) y 1:100 (dilución -2).

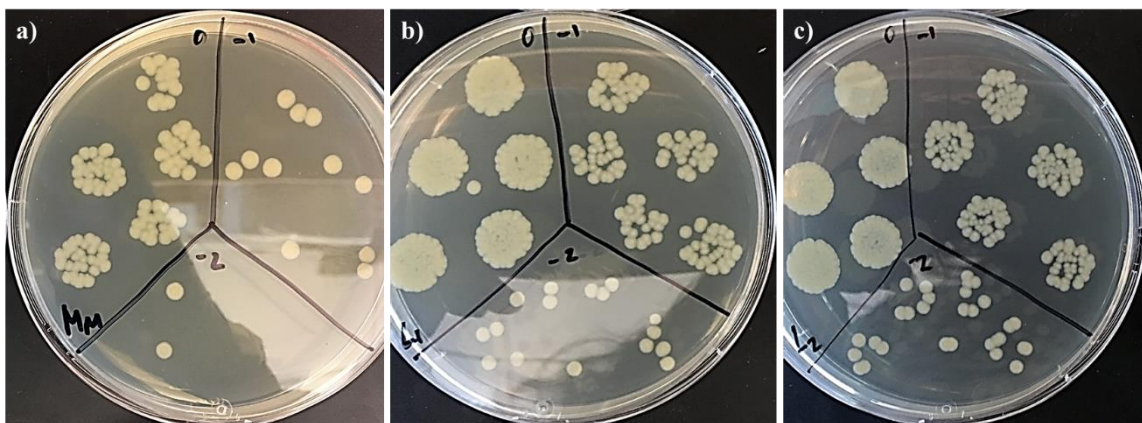


Figura 50. Macrográficas de la proliferación de P. aeruginosa (método 2), para las tres diluciones estudiadas (0, -1 y -2), sobre los diferentes sustratos de titanio: a) denso, b) 100-200 μm y c) 250-355 μm .

La Figura 50 revela, como era de esperar, que el aumento de la dilución disminuye las UFC para todos los sustratos estudiados.

La proliferación de *P. aeruginosa* en las muestras para la 1:10 (dilución -1) se grafica en la Figura 51, tanto en valor absoluto como en valor normalizado por la

Capítulo 3

superficie de la muestra (a partir de los datos de la Tabla 18). Estos valores se obtuvieron tras el conteo de unidades de formación de colonias. Tan sólo se presenta dicha dilución por razones de conteo de las UFC, ya que para el caso de la dilución 0 no fue posible realizar el conteo, mientras que para la dilución -2 no se obtuvieron estadísticamente resultados suficientes de proliferación.

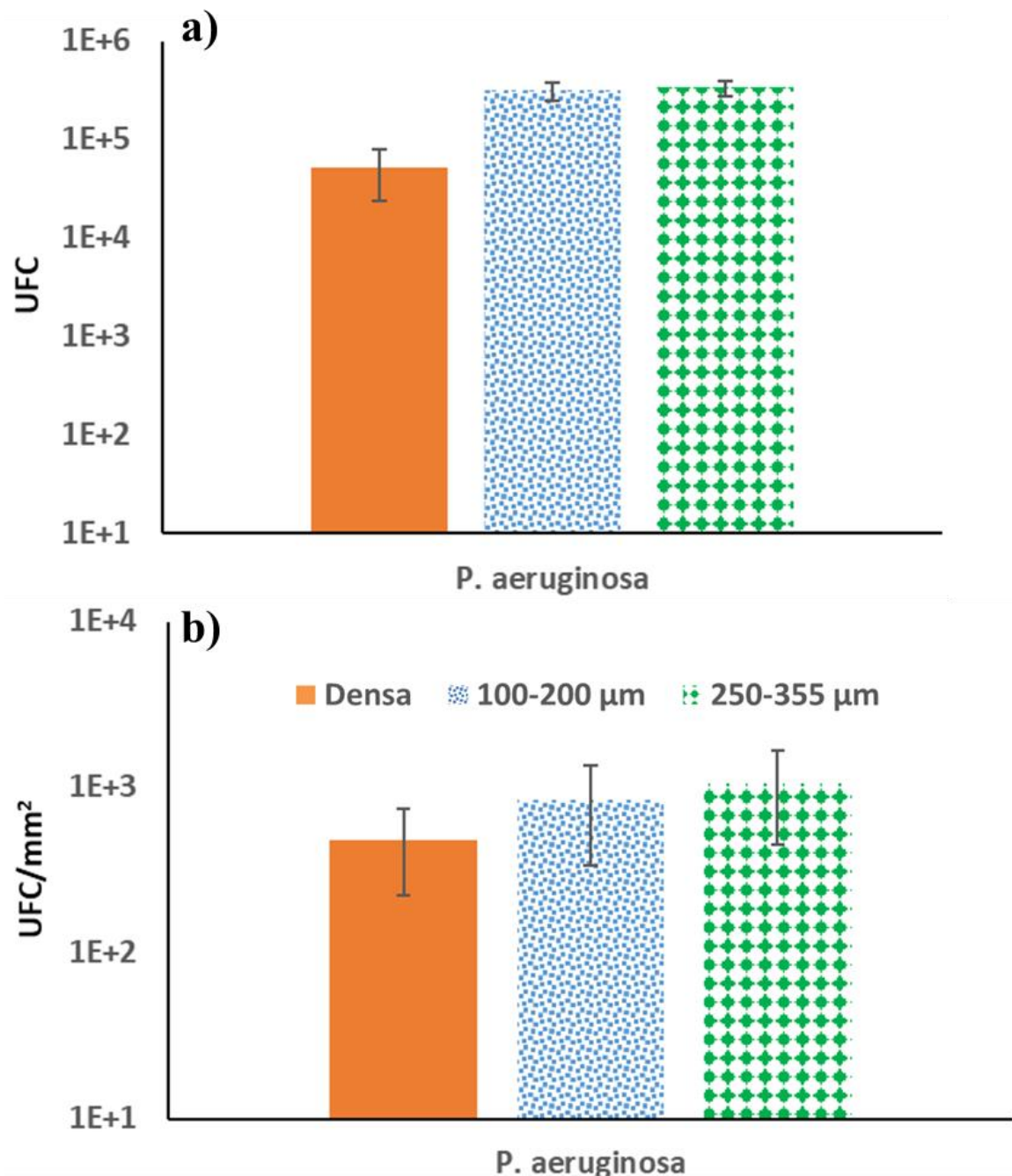


Figura 51. Unidades de formación de colonias de *P. aeruginosa* a dilución -1 tras el cultivo sobre los sustratos de titanio denso y porosos en valor a) absoluto y b) normalizado por la superficie total de la muestra.

Resultados

La Figura 51 a presenta un valor de $5.2 \cdot 10^4$ UFC para el sustrato denso, resultado menor que para sus análogas porosas ($3.2 \cdot 10^5$ UFC y $3.4 \cdot 10^5$ UFC para 100-200 y 250-355, respectivamente). En cuanto a los valores normalizados por la superficie del sustrato (Figura 51 b), éstos revelan una tendencia creciente con la presencia de porosidad y conforme aumenta el tamaño de poro, siendo de $4.8 \cdot 10^2$ UFC/mm², $8.4 \cdot 10^2$ UFC/mm² y $1.1 \cdot 10^3$ UFC/mm² para las muestras densa, porosa de 100-200 μm y porosa de 250-355 μm , respectivamente.

La cepa grampositiva empleada correspondió al tipo de bacteria *MRSA* (ATCC 43300), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. El método 2 empleó, al igual que para la *P. aeruginosa*, una concentración inicial de 10^4 UFC/ml (dilución 0). La Figura 52 muestra las macrografías de los resultados de proliferación de *MRSA* sobre los sustratos de titanio para la solución en la que fueron sumergidos; dilución 0, 1:10 (dilución -1) y 1:100 (dilución -2).

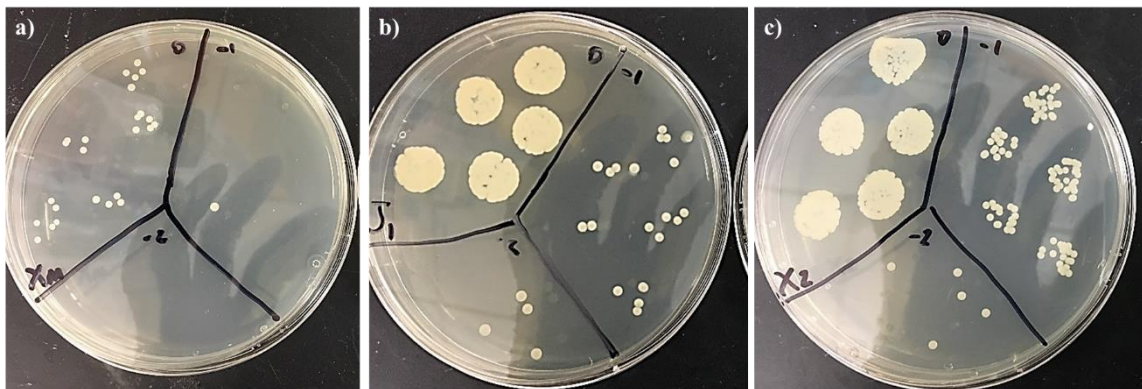


Figura 52. Macrografías de la proliferación de MRSA (método 2) para las tres diluciones estudiadas (0, -1 y -2) sobre los sustratos de titanio: a) denso, y porosos de b) 100-200 μm y c) 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.

En el caso de la cepa *MRSA*, las UFC son mucho menos numerosas para el sustrato denso que para los porosos (Figura 52). Adicionalmente, como cabe esperar, el aumento de la dilución implica una disminución en las colonias formadas en todas las muestras, mostrando, incluso, que no existe proliferación de bacterias para la dilución -2 en la muestra densa.

Por su parte, la Figura 53 muestra los resultados del ensayo de bacterias vivas/muertas para los sustratos de titanio denso y porosos. El componente SYTO 9 tiñe las bacterias vivas de verde, mientras que el yoduro de propidio

Capítulo 3

colorea de rojo a las bacterias muertas. Estas imágenes se tomaron mediante microscopía confocal.

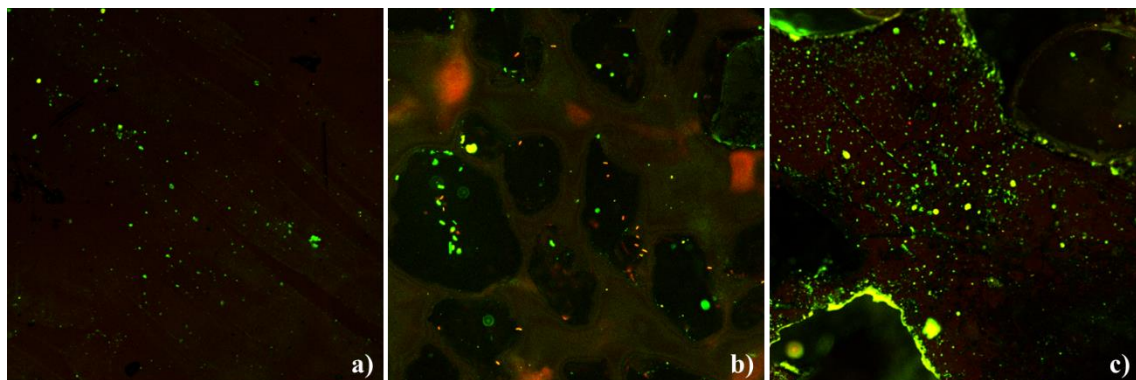


Figura 53. Ensayo de bacterias vivas/muertas para la cepa MRSA a concentración inicial de 10^4 UFC/ml (dilución 0) en los sustratos de titanio a) denso, y porosos de rango de tamaño de espaciador b) 100-200 μm y c) 250-355 μm .

Se observa una mayor densidad de bacterias vivas (teñidas en verde) para las muestras porosas en comparación a la densa, localizándose en el interior y en el borde de los poros, especialmente para la porosa de mayor rango de tamaño de espaciador. Por su parte, la muestra porosa de 100-200 μm revela un mayor número de bacterias muertas (teñidas en rojo) en el interior de los poros.

La proliferación de *MRSA* en las muestras para la dilución 1:10 (dilución -1) se grafica en la Figura 54, tanto en valor absoluto como en valor normalizado por la superficie de la muestra, empleando los datos de la Tabla 18. Estos valores se obtuvieron tras el conteo de unidades de formación de colonias. Debido a las mismas razones expuestas para la *P. aeruginosa*, a la hora de la realización del conteo de las UFC, sólo se estudió la dilución -1.

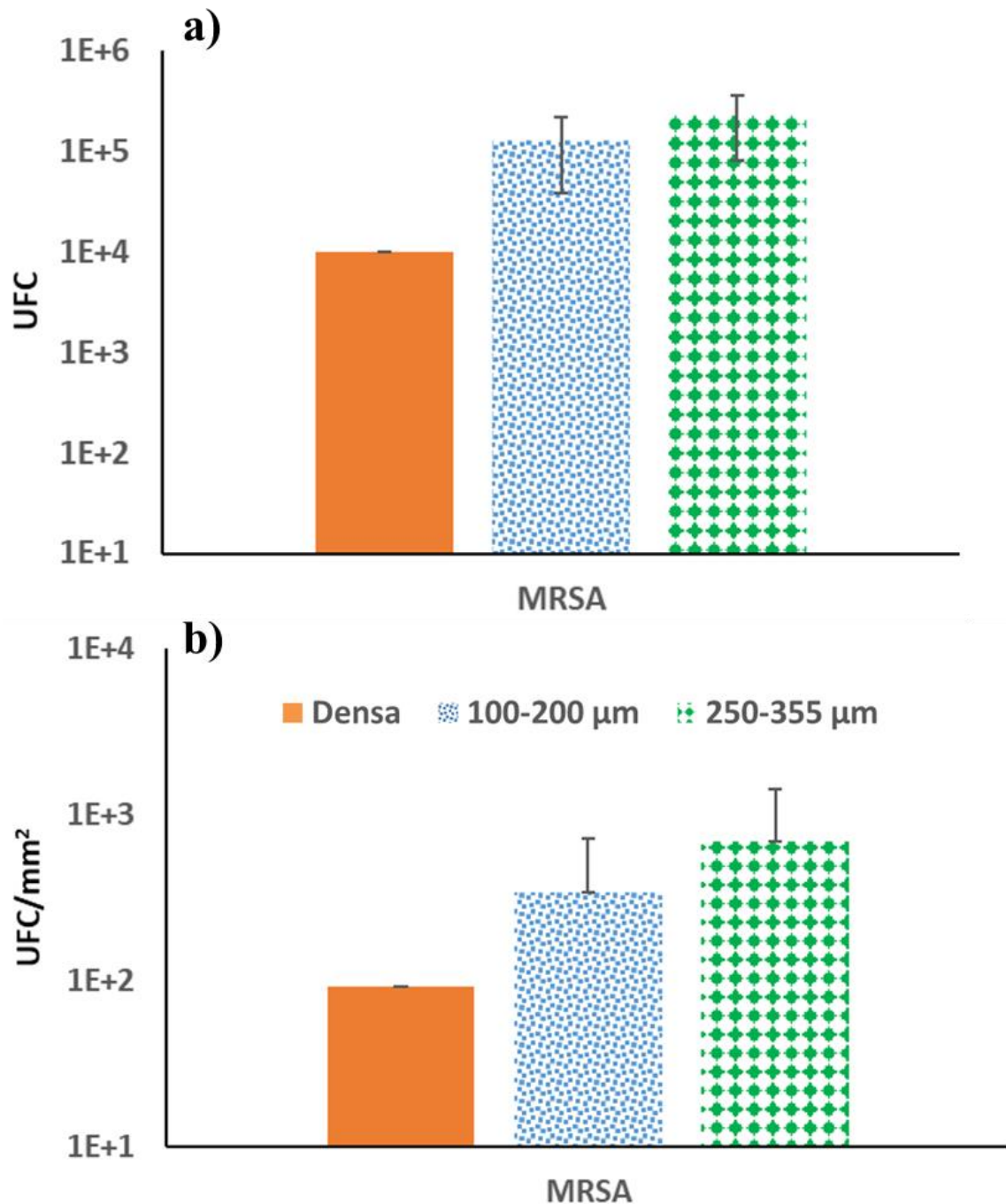


Figura 54. Unidades de formación de colonias de MRSA a dilución -1 tras el cultivo sobre los sustratos de titanio denso y porosos en valor a) absoluto y b) normalizado por la superficie total de la muestra.

La Figura 54 a presenta para el sustrato denso un valor de $1.0 \cdot 10^4$ UFC, mientras que para las muestras porosas es de $1.3 \cdot 10^5$ UFC y $2.2 \cdot 10^5$ UFC para 100-200 y 250-355, respectivamente. Los valores normalizados por la superficie del sustrato de la Figura 54 b, por su parte, muestran un crecimiento en la proliferación bacteriana con la presencia de porosidad y el tamaño de poro,

Capítulo 3

siendo de $9.2 \cdot 10^1$ UFC/mm² para las muestras densa, y de $3.4 \cdot 10^2$ UFC/mm² y $7.0 \cdot 10^3$ UFC/mm² para las porosas de 100-200 μm y de 250-355 μm , respectivamente.

3.2. Mejora de la capacidad de osteointegración: tratamientos de modificación superficial

En este apartado, se exponen los resultados correspondientes a tres líneas distintas de modificación superficial de los sustratos, con el fin de mejorar y potenciar la osteointegración e infiltración del hueso hacia el implante y el comportamiento antibacteriano.

Por su parte, la primera propuesta de modificación se focaliza en la generación de patrones de rugosidad en la superficie de la muestra, variando así su topografía. En este sentido, los sustratos de titanio fueron sometidos a un ataque ácido realizado de dos formas distintas: inmersión y goteo.

La segunda línea propuesta consiste en la transformación de la superficie del titanio de bioinerte a bioactiva. Para ello, se propuso la deposición de recubrimientos bioactivos cerámicos empleando dos técnicas distintas. El primer método se basó en la deposición de *HA* por la técnica de sol-gel, mientras que el segundo consistió en la deposición del BG 45S5 mediante sedimentación por goteo.

La tercera vía consiste en la deposición de un recubrimiento antibacteriano, con el fin de evitar la adhesión de bacterias y prevenir las posibles infecciones que deriven en la pérdida de funcionalidad del implante.

3.2.1 Modificación de la rugosidad y la textura superficial de los sustratos de titanio porosos: ataque químico por inmersión

La primera línea presentada para la mejora de la osteointegración consiste en la modificación de la topografía, generando una textura y una rugosidad adicional mediante un ataque químico llevado a cabo por dos rutas: inmersión y goteo.

La solución de ataque se compuso de 22 ml/l ácido fluorhídrico (HF, 45%), agua destilada y unas gotas de un inhibidor orgánico. Se estudiaron distintos tiempos de exposición al ácido, con el fin de estudiar la evolución de la topografía de la superficie de los sustratos con el ataque. Dichos tiempos fueron 125 s y 625 s, determinados a partir de experiencias previas [251]. De igual modo, se llevó a cabo el estudio de ataque por inmersión. La Figura 55 presenta, de forma ordenada, la totalidad de caracterización llevada a cabo, una vez la topografía de los sustratos fue modificada por ataque químico.

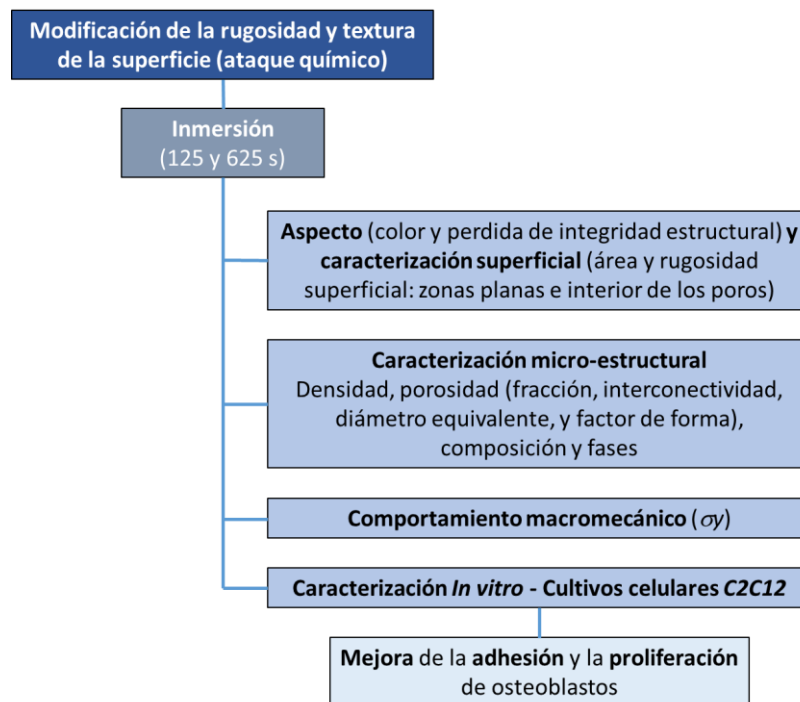


Figura 55. Extracto del esquema de la Figura 27. Técnicas y caracterización estudiadas para la mejora de la osteointegración por la vía de modificación de la rugosidad y la textura de la superficie mediante ataque químico.

Caracterización microestructural de las superficies de los sustratos y las paredes de los poros: influencia de la técnica de ataque químico

El ataque químico por inmersión de las muestras se realizó en la solución ácida a 50 °C, durante los tiempos anteriormente indicados. El ataque se detiene sumergiendo las muestras en agua destilada, y posteriormente se procede a la limpieza exhaustiva de los sustratos.

Capítulo 3

Los resultados de P_T y P_i , total e interconectada, de las muestras atacadas a 125 y 625 s por el método de Arquímedes se recogen en la Tabla 26.

Tabla 26. Porosidad total e interconectada por el método de Arquímedes de los sustratos denso y porosos de titanio de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.

		P_T (%)	P_i (%)
Densa	125 s	7.5 ± 2.7	7.4 ± 2.0
	625 s	6.3 ± 1.4	6.0 ± 1.3
100-200 μm	125 s	48.2 ± 1.9	42.6 ± 2.4
	625 s	51.5 ± 0.7	46.2 ± 0.8
250-355 μm	125 s	49.4 ± 0.5	47.1 ± 0.6
	625 s	50.8 ± 1.0	46.7 ± 1.1

Las muestras atacadas por inmersión a 125 s revelan valores de P_T de 7.5 % para la densa, y de 48.2 y 49.4 % para las porosas de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente. En cuanto a la P_i , el sustrato denso presenta un 7.4 %, mientras el sustrato poroso de menor rango de tamaño de espaciador presenta un 42.6 %, siendo de 47.1 % para el poroso de 250-355 μm . Por su parte, la P_T de las muestras atacadas a 625 s es de 6.3 % para la densa, así como para las porosas de 100-200 y 250-355 μm alcanza valores de 51.5 y 50.8 %. En cuanto a la P_i tras el ataque a 625 s, se obtienen resultados de 6.0 % para el sustrato denso, de 46.2 % para el poroso de menor rango de tamaño de espaciador y de 46.7 % para el poroso de 250-355 μm .

La caracterización por OM y IA de las muestras atacadas por inmersión no se pudo llevar a cabo, debido a las limitaciones del equipo a la hora realizar el análisis de las imágenes de la superficie. Esta resultó ser muy heterogénea y abrupta, dificultando así el estudio microestructural y conllevando grandes desviaciones en la medida.

El ataque químico por inmersión afecta también a la porosidad generada por el espaciador, en cuanto al tamaño de los poros (D_{eq}) y la porosidad total (P_T). La técnica de micro-CT permitió corroborar las variaciones de estos parámetros de forma cuantitativa, como se muestra en la Figura 56 y la Tabla 27.

Los valores numéricos por micro-CT de porosidad y D_{eq} medio de los sustratos atacados por inmersión a 125 s están recogidos en la Tabla 27.

Tabla 27. Parámetros obtenidos por micro-CT para los sustratos porosos de titanio, atacados químicamente por inmersión a 125 s y de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm .

	Micro-CT atacadas inmersión	
	P_T (%)	D_{eq} medio (μm)
100-200 μm	49.5 \pm 11.4	184.9 \pm 7.1
250-355 μm	42.7 \pm 11.4	311.9 \pm 7.1

Los resultados de micro-CT revelan una P_T de 49.5 y 42.7 % para los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm atacados a 125 s. En cuanto al D_{eq} medio, los valores se encuentran dentro del rango esperado, siendo 184.9 μm para la muestra porosa de 100-200 μm y de 311.9 μm para la porosa de 250-355 μm .

La Figura 56 presenta la distribución de la fracción volumétrica de poros en función del D_{eq} de los sustratos porosos.

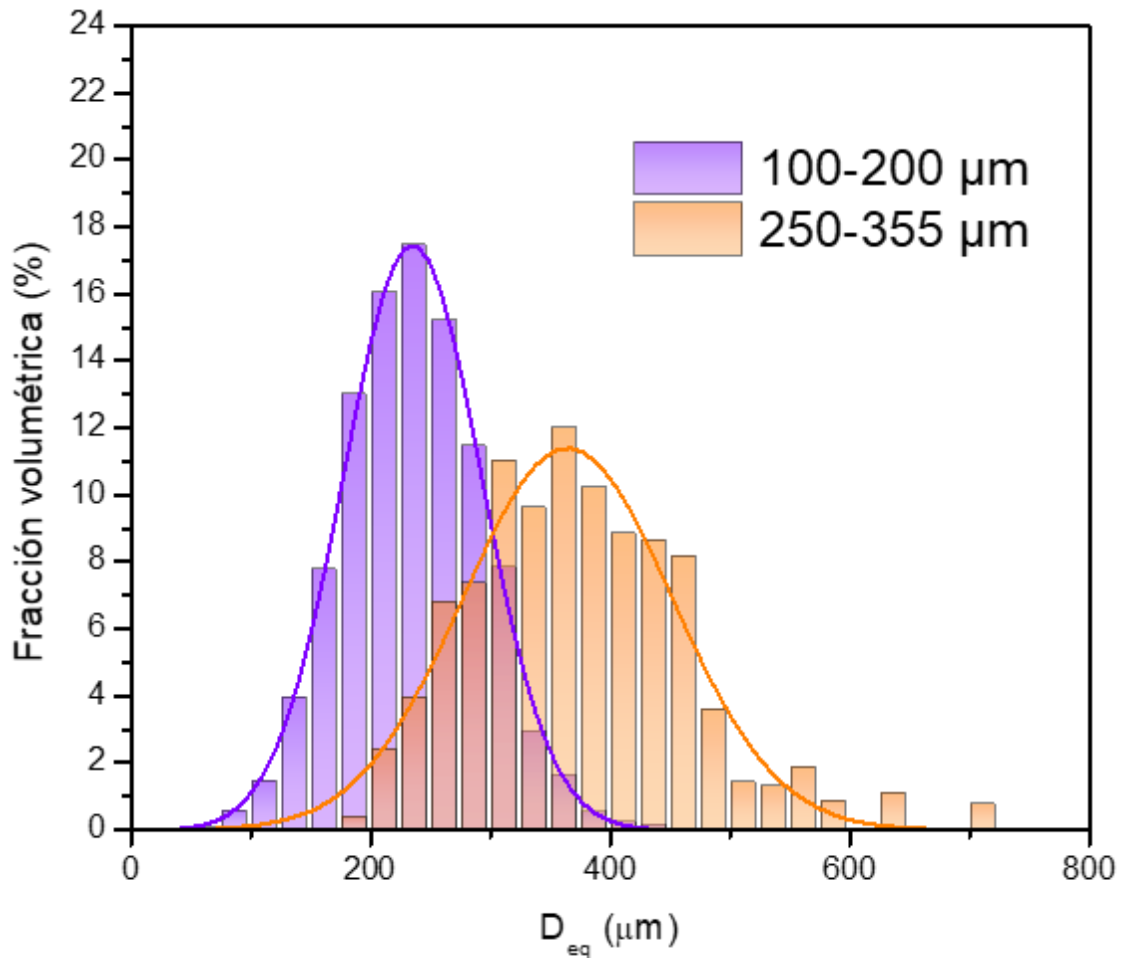


Figura 56. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm atacados químicamente por inmersión a 125 s.

Se aprecia que, la distribución para el menor rango de tamaño de partícula de espaciador es más estrecha y esbelta, mientras que la de 250-355 es más achatada. En ese sentido, se obtuvieron valores de ancho a media altura (*FWHM*) de 135.3 y 206.0 μm para los sustratos de 100-200 y 250-355 μm respectivamente, siendo la desviación típica de 57.5 y 87.5 μm .

Caracterización de la superficie de los sustratos y las paredes de los poros: influencia del ataque químico

La Figura 57 presenta las imágenes SEM obtenidas para la muestra densa virgen y tras los tiempos de ataque de 125 y 625 s.

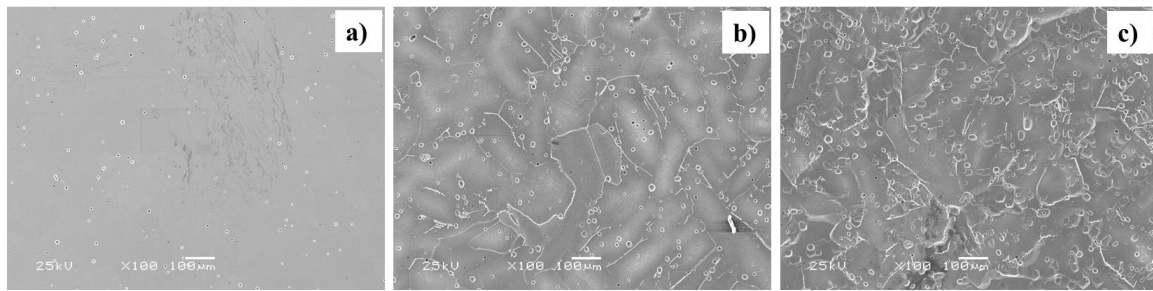


Figura 57. Imágenes SEM del sustrato de titanio denso atacado por inmersión: a) 0 s, b) 125 s y c) 625 s.

Por su parte, las micrografías SEM de las muestras porosas de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , sin ataque (0 s) y tras el ataque químico por inmersión a 125 s y 625 s, son representadas en la Figura 58.

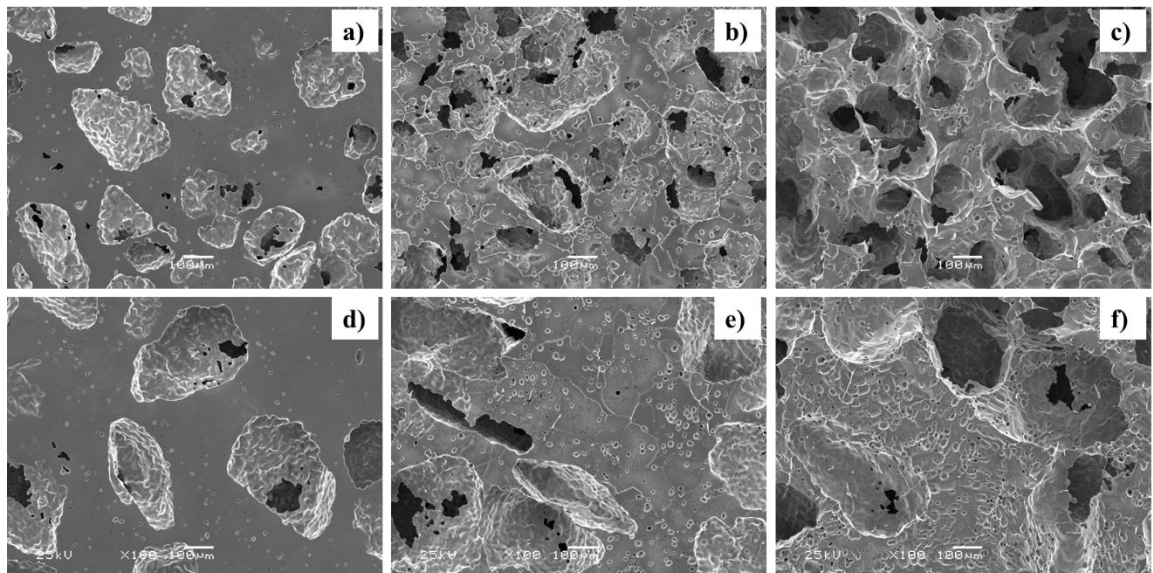


Figura 58. Imágenes SEM de los sustratos de titanio atacados por inmersión de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para a) 0 s, b) 125 s y c) 625 s y de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para d) 0 s, e) 125 s y f) 625 s.

El ataque sobre la muestra densa revela los límites de grano, más acusados a mayor tiempo de exposición al ácido (Figura 57). Adicionalmente, tiene lugar la aparición en la superficie de ciertas formas geométricas, similares a picaduras. Como cabe esperar, la densidad de éstas aumenta conforme lo hace el tiempo de ataque. Ambos rasgos se aprecian también en la parte plana de las muestras porosas de uno y otro rango de tamaño de partícula de espaciador para el ataque

Capítulo 3

a 125 s (Figura 58 b y e). Adicionalmente, cuando el ataque tiene lugar a 625 s, las formas geométricas se aprecian de igual manera en el interior de los poros, obteniéndose una topografía de picaduras más homogénea. Asimismo, los poros aumentan su tamaño con el tiempo de ataque, llegando incluso a coalescer para el caso de la muestra de 100-200 μm (Figura 58 c).

La Figura 59 recoge las micrografías SEM del interior de los poros de los sustratos porosos de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque por inmersión a 125 y 625 s.

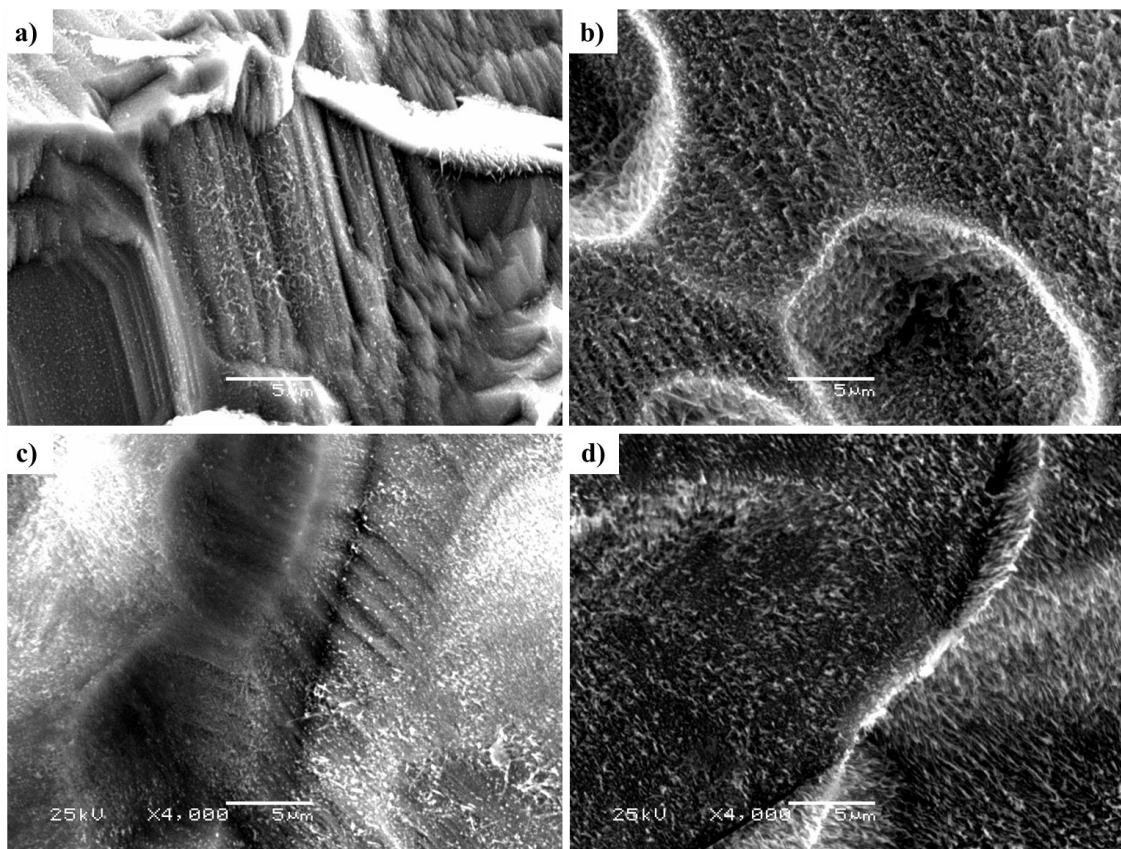


Figura 59. Imágenes SEM del interior de los poros de los sustratos de titanio atacados por inmersión de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para a) 125 s y b) 625 s y de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador para c) 125 s y d) 625 s.

Visualmente, se aprecian mayores estratificaciones en la topografía para los sustratos porosos atacados por inmersión a 125 s, de forma que los estratos se desdibujan y suavizan para el mayor tiempo de ataque. Sin embargo, a menor

escala se observa una superficie rugosa y más homogénea para el ataque a 625 s.

En este contexto, al igual que para los sustratos vírgenes, se procedió al estudio por micro-CT de la superficie de las muestras atacadas por inmersión a 125 s. Este análisis no se ha completado con el tiempo de ataque por inmersión a 625 s. No obstante, se ha llevado a cabo de forma que sea posible realizar algunas comparaciones interesantes en este estudio. En el caso de las muestras atacadas, no se ha realizado la estimación de área plana y área porosa a partir de los datos de micro-CT, ya que no se ha realizado el estudio de proliferación de bacterias sobre ellas.

La Rug_{vol} (%) de las paredes de los poros, para los sustratos porosos de ambos rangos de tamaño de espaciador se muestra en la Figura 60. La distribución para el tamaño 100-200 μm resultó ser más amplia y mayor en comparación con la del mayor tamaño de partícula, tal y como se muestra en los histogramas. Esto implica mayores valores de % de Rug_{vol} para el sustrato poroso de 100-200 μm . El sustrato de menor rango de tamaño de espaciador obtuvo frecuencias de hasta un valor de 1346 para Rug_{vol} de 10.2 %, mientras que la muestra de 250-355 μm obtiene la mayor frecuencia (682) para el 3 % de Rug_{vol} .

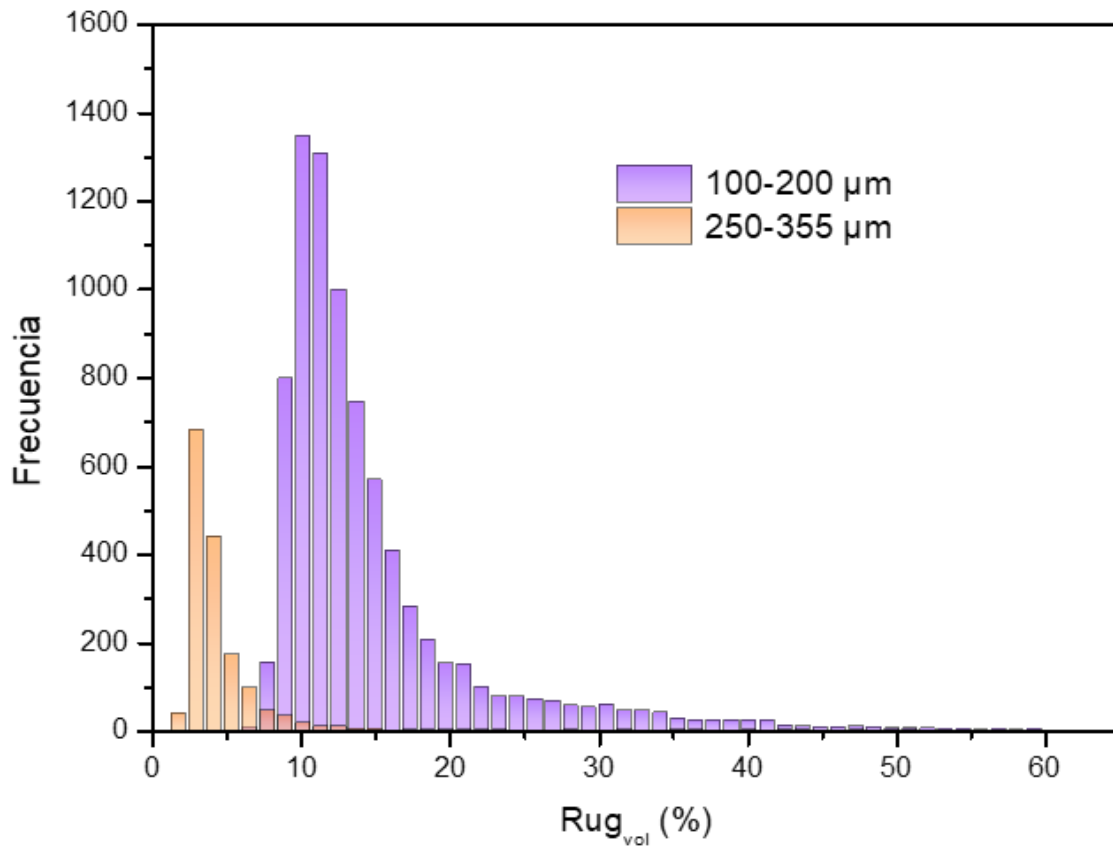


Figura 60. Distribución de la rugosidad volumétrica (%) de los sustratos porosos de titanio atacados químicamente por inmersión a 125 s con tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm.

La Figura 61 compara, mediante microscopía confocal láser, la topografía de los sustratos densos y porosos de ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente a los distintos tiempos (125 y 625 s).

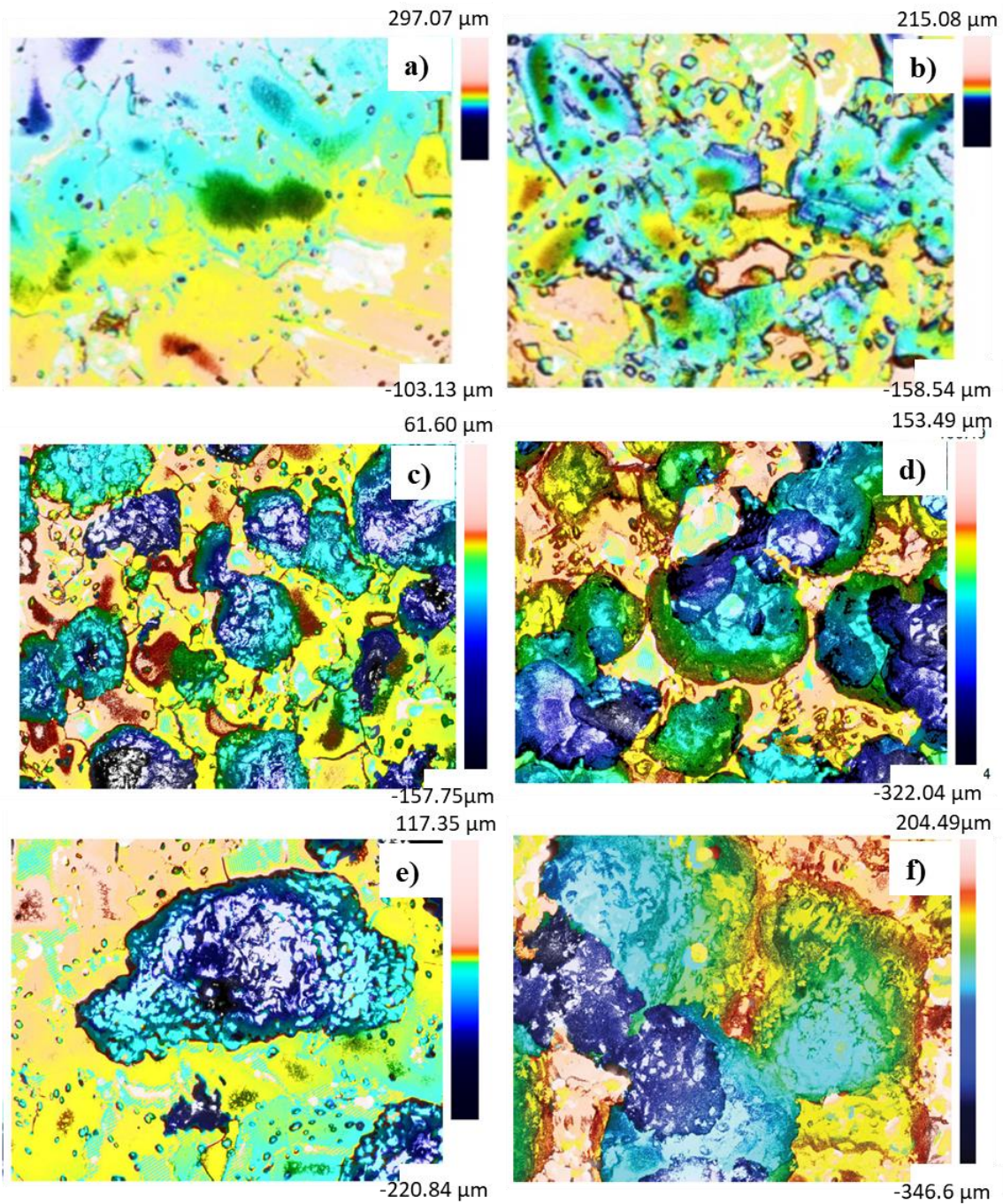


Figura 61. Imágenes de microscopía confocal 2½ D de los sustratos de titanio atacados por inmersión: denso a a) 125 s y b) 625 s, poroso de 100-200 μm a c) 125 s y d) 625 s y poroso de 250-355 μm a e) 125 s y f) 625 s.

La Figura 61 revela, mediante la escala de colores, la topografía de los sustratos tras el ataque por inmersión a ambos tiempos. Los rangos de altura de la superficie, recogidos por el equipo para cada tipo de sustrato, resultan ser de mayor amplitud, en cuanto a cota superior e inferior, para el tiempo de 625 s en comparación al de 125 s. Asimismo, en el caso de las muestras porosas, el

Capítulo 3

ataque más agresivo desdibuja los bordes de los poros, consiguiendo una topografía más abrupta al mismo tiempo. Cabe destacar la presencia de las formas geométricas en las imágenes, tal y como se observan en las micrografías SEM (Figura 57 y Figura 58).

Las imágenes 3D obtenidas por microscopía confocal láser para la muestra densa se representan en la Figura 62.

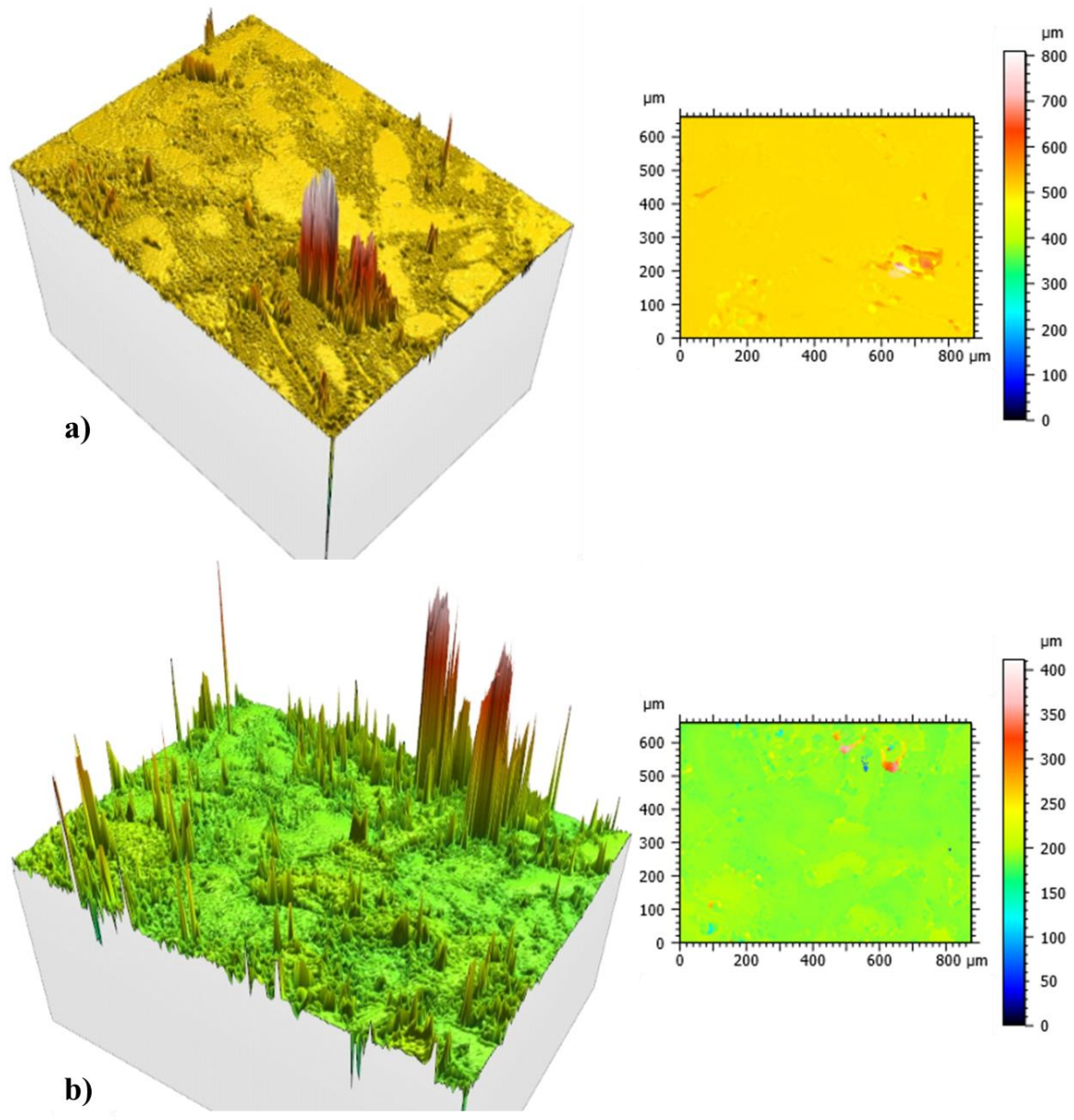


Figura 62. Imágenes 3D de microscopía confocal del sustrato de titanio denso atacado por inmersión; a) 125 s y b) 625 s.

Por su parte, se observa la topografía 3D de ambos sustratos porosos para los tiempos establecidos en la Figura 63.

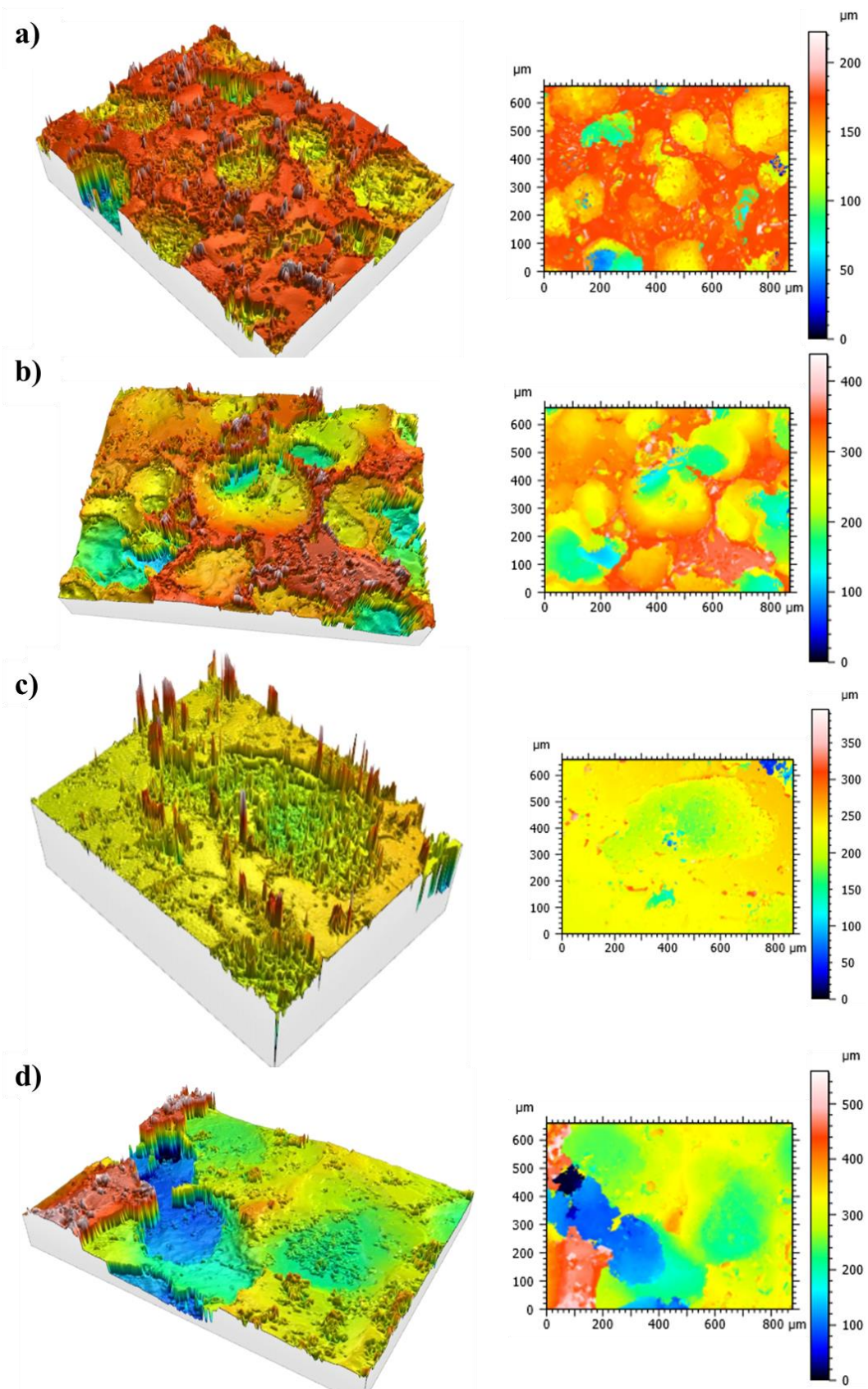


Figura 63. Imágenes 3D de microscopía confocal del ataque por inmersión de los sustratos porosos de titanio de 100-200 μm : a) 125 s y b) 625 s; sustratos porosos de 250-355 μm : d) 125 s y e) 625 s.

Capítulo 3

La Figura 62 y Figura 63 presentan en 3D una topografía más ruda para el ataque a 625 s, correspondiendo una variedad de colores más amplia que para el tiempo de 125 s. En cuanto a los sustratos porosos, éstos son más discontinuos y definidos a menor tiempo de exposición al ácido, mientras que los límites de los poros se suavizan con el ataque más agresivo. A partir de estas imágenes, se determinan los parámetros de rugosidad 3D normalizada según la Norma ISO 25178 [246] (Tabla 28), distinguiendo la zona plana de la zona porosa (interior de los poros), tal y como se llevó a cabo para los sustratos vírgenes.

Tabla 28. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z), obtenidos por microscopía confocal láser, de la superficie de la matriz de Ti (plana) y del interior de los poros (porosa) en función del tipo de sustrato y del tiempo de ataque.

		125 s			625 s		
		S_a (μm)	S_q (μm)	S_z (μm)	S_a (μm)	S_q (μm)	S_z (μm)
Densa	plana	4.4	15.2	808.4	5.0	12.9	411.2
100-200 μm	plana	8.5	17.0	150.7	5.2	14.8	217.0
	porosa	18.9	26.4	222.1	47.1	60.6	438.0
250-355 μm	plana	6.0	12.3	232.0	10.4	17.2	295.1
	porosa	18.3	28.1	395.1	71.7	99.0	558.3

Por un lado, los resultados de la Tabla 28 muestran valores para la muestra densa (parte plana), atacada a 125 s, de 4.4, 15.2 y 808 μm para S_a , S_q y S_z , siendo para el ataque a 625 s de 5.0, 12.9 y 411.2 μm , respectivamente. La parte plana de los sustratos porosos atacados a 125 s, sin embargo, presentan valores mayores para S_a y S_q (8.5 y 17.0 μm para el poroso de 100-200 μm , y 6.0 y 12.3 μm para el de 250-355 μm), mientras que resultan ser menores para S_z (150.7 y 395.1 μm para el poroso de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente). De igual forma, a 625 s se obtienen resultados de S_a , S_q y S_z para el poroso de menor rango de tamaño de espaciador de 5.2, 14.8 y 217.0 μm , respectivamente; siendo de 10.4, 17.2 y 295.1 μm para el análogo de mayor rango de tamaño de espaciador.

Por otro lado, la parte porosa presenta valores similares para los parámetros de rugosidad de S_a y S_q para ambos tipos de sustratos porosos atacados a 125 s, siendo de 18.9 y 26.4 μm para la muestra de 100-200 y de 18.3 y 28.1 μm para

la de 250-355 μm . No obstante, el parámetro S_z difiere entre ambos sustratos, siendo 222.1 μm para el poroso de menor rango de tamaño de espaciador y de 395.1 μm para el de mayor rango. En cuanto a los sustratos porosos atacados a 625 s, las rugosidades de la parte porosa son mayores para la muestra de 250-355 μm , con resultados de S_a , S_q y S_z de 71.7, 99.0 y 558.3 μm , respectivamente, mientras que, de igual forma, la muestra de menor rango de tamaño de espaciador presenta valores de 47.1, 60.6 y 438 μm .

Comportamiento macro-mecánico de los sustratos atacados por inmersión

En el estudio del comportamiento, tanto mecánico como tribológico, de los sustratos no fue posible el empleo de técnicas como la de ultrasonidos, microdureza, rayado y desgaste. La razón es las limitaciones que presentan estas técnicas en la aplicación a los sustratos atacados, por motivos de la cierta pérdida de integridad estructural que conlleva la exposición al ácido.

La presencia de los poros en un material reduce el módulo de Young y, por tanto, disminuye el efecto del apantallamiento de tensiones como se puso de manifiesto anteriormente. De este modo, otras propiedades mecánicas pueden verse afectadas, comprometiendo el equilibrio biomecánico de los implantes. Los sustratos atacados químicamente se ha demostrado que muestran un incremento de la porosidad, pudiendo influir de forma más acusada en dicho equilibrio. Este hecho manifiesta la necesidad de estudiar el comportamiento mecánico de los sustratos atacados.

La Figura 64 muestra las curvas tensión (σ , MPa) – deformación (ε , %) de los sustratos porosos de titanio de ambos rangos de tamaño de espaciador (100-200 y 250-355 μm), atacados por inmersión a 125 y 625 s. Para el caso de los sustratos densos atacados por inmersión, no ha sido posible representar las gráficas correspondientes, debido a que la máquina Instron no permite aplicar cargas mayores de las que nominalmente puede.

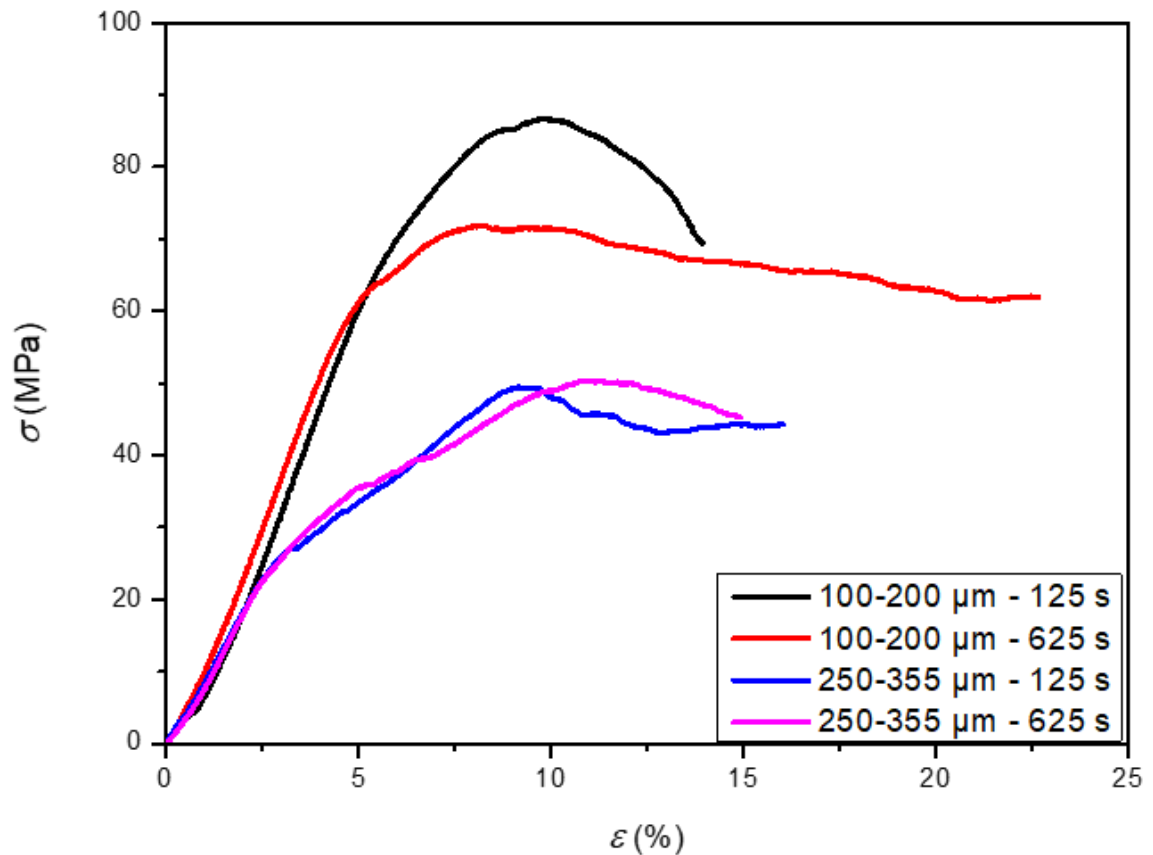


Figura 64. Curvas tensión (σ) - deformación (ϵ) obtenidas por el ensayo de compresión para los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , atacados por inmersión a 125 y 625 s. Ensayo realizado bajo la norma ASTM E9-09 [244].

Se presenta en la Tabla 29, centrada en el límite de fluencia del ensayo de compresión uniaxial de los sustratos atacados químicamente por inmersión, que se puede ver afectado por el ataque. No se ha calculado el módulo de Young, porque tras el análisis de las muestras vírgenes, ya se ha confirmado que los sustratos porosos tienen un módulo de Young similar al del hueso, solventando así el problema de apantallamiento de tensiones.

Tabla 29. Propiedades mecánicas de las muestras porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , atacadas químicamente por inmersión a 125 y 625 s. Límite de fluencia (σ_y), calculado por la norma convencional ASTM E9-9.

		Ensayo de compresión uniaxial ASTM E9-9
		σ_y (MPa)
100-200 μm	125s	60.0
	625s	62.0
250-355 μm	125s	23.0
	625s	22.0

El ensayo de compresión, en cuanto al límite de fluencia (σ_y), revela valores de 60 MPa para las muestras porosas de 100-200 μm , tras ser sumergidas en la solución ácida a 125 s, y de 62 MPa después de la inmersión a 625 s. Asimismo, las porosas de 250-355 μm , muestran resultados de 23 y 22 MPa, respectivamente. Por tanto, el aumento del tiempo de ataque influye notablemente en el límite elástico, llegando a reducirse a una tercera parte para el mayor tiempo de ataque.

Evaluación del comportamiento In vitro: Mejora del comportamiento celular de los sustratos atacados químicamente por inmersión

La generación de un patrón de rugosidad adicional al existente en las muestras vírgenes puede, en mayor o menor medida, afectar a la adhesión y proliferación celular sobre los sustratos atacados químicamente por inmersión. Por esta razón, se realizaron estudios de citotoxicidad sobre estas muestras, con el fin de evaluar la influencia de la rugosidad generada por este ataque químico en el comportamiento *in vitro*.

La Figura 65 presenta la adhesión celular, mediante preioblastos C2C12-GFP, que tiene lugar tras 24 h de cultivo para los sustratos denso y porosos atacados a 125 s y 625 s por inmersión.

Capítulo 3

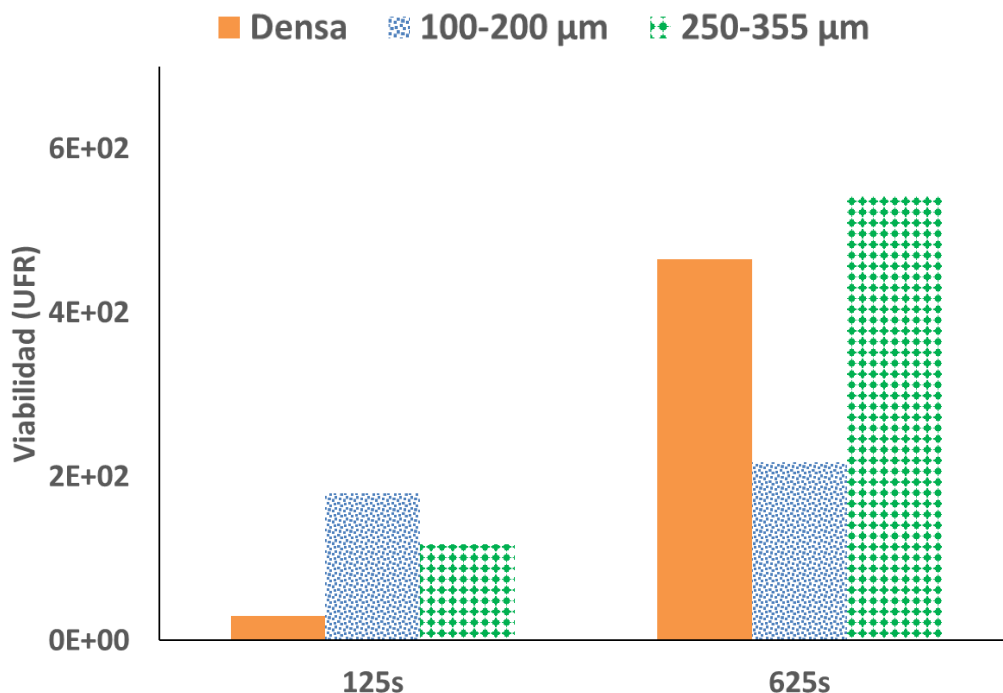


Figura 65. Adhesión celular a los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s, respectivamente, tras 24 h de cultivo.

La Figura 65 presenta, para el ataque de inmersión a 125 s, $1.8 \cdot 10^2$ y $1.2 \cdot 10^2$ UFR para los sustratos porosos de 100-200 y 250-355, respectivamente. Sin embargo, el sustrato denso muestra un valor de sólo $3.0 \cdot 10^1$ UFR. Por su parte, los resultados son todos mayores tras el ataque a 625 s, alcanzando valores de $2.2 \cdot 10^2$ UFR para la muestra porosa de 100-200 μm, $5.4 \cdot 10^2$ UFR para 250-355 μm y de $4.7 \cdot 10^2$ UFR para la densa.

En cuanto a la proliferación celular, la actividad metabólica para los sustratos denso y porosos de ambos rangos de tamaño de espaciador, atacados a 125 y 625 s se grafican en la Figura 66.

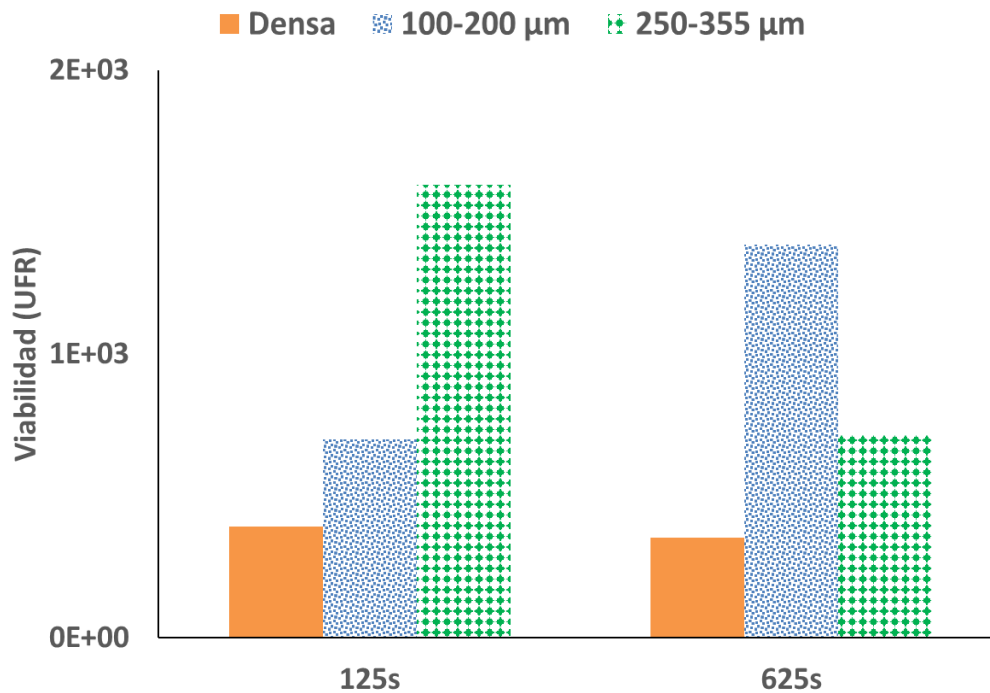


Figura 66. Proliferación celular a los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s, respectivamente, tras 4 días de cultivo.

La proliferación celular tras 4 días de cultivo (Figura 66) obtuvo como resultado niveles parecidos de $3.9 \cdot 10^2$ y $3.5 \cdot 10^2$ UFR para los sustratos de titanio denso atacados a 125 y 625 s, respectivamente. Asimismo, las muestras porosas de 100-200 μm alcanzaron tasas de $7.0 \cdot 10^2$ y $1.4 \cdot 10^3$ UFR a sendos tiempos de ataque, siendo de igual forma, de $1.6 \cdot 10^3$ y $7.2 \cdot 10^2$ UFR, respectivamente, para el sustrato poroso de mayor rango de tamaño de espaciador.

Por su parte, los resultados de proliferación celular obtenidos tras el cultivo durante 7 días revelaron valores mayores a los anteriores (Figura 67), no sólo en cuanto a orden de magnitud, sino también a tendencias en algunos casos.

Capítulo 3

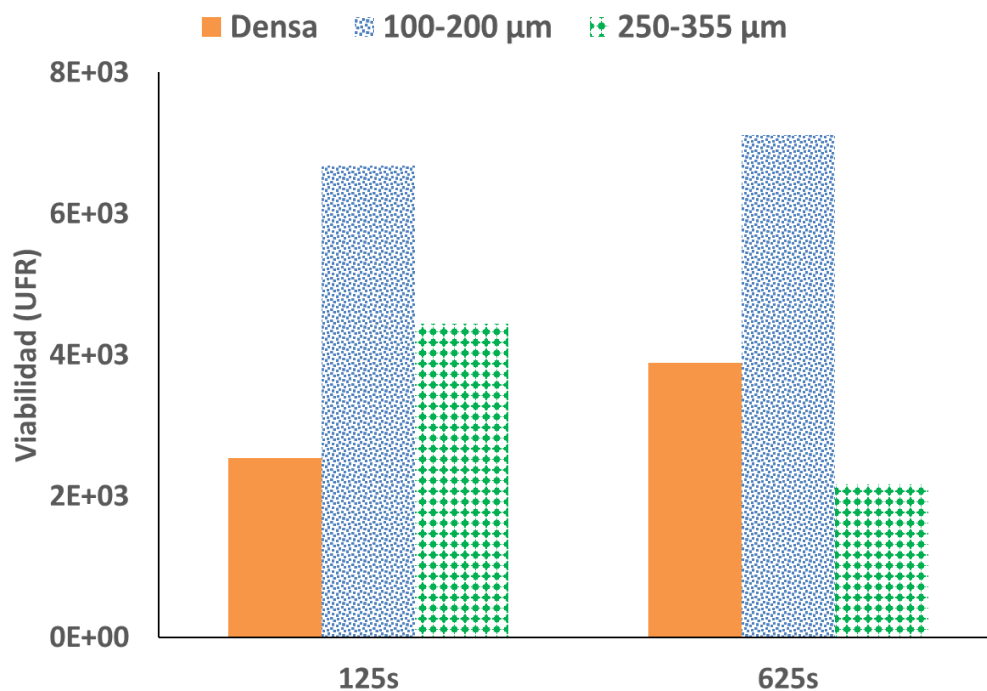


Figura 67. Proliferación celular a los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s respectivamente, tras 7 días de cultivo.

La Figura 67 presenta, tras la inmersión a 125 s, valores de proliferación celular tras 7 días de cultivo de $2.5 \cdot 10^3$, $6.7 \cdot 10^3$ y $4.4 \cdot 10^3$ UFR para los sustratos denso y porosos de menor y mayor rango de tamaño de espaciador, respectivamente. De forma correlativa, para el tiempo de ataque más largo, muestra medidas mayores de $3.9 \cdot 10^3$, $7.1 \cdot 10^3$ para los sustratos denso y poroso de 100-200 μm, mientras sólo $2.2 \cdot 10^3$ UFR para el de 250-355 μm.

Finalmente, la proliferación celular, medida mediante la actividad metabólica, tras 10 días de cultivo de los sustratos de titanio atacados químicamente se recoge en la Figura 68.

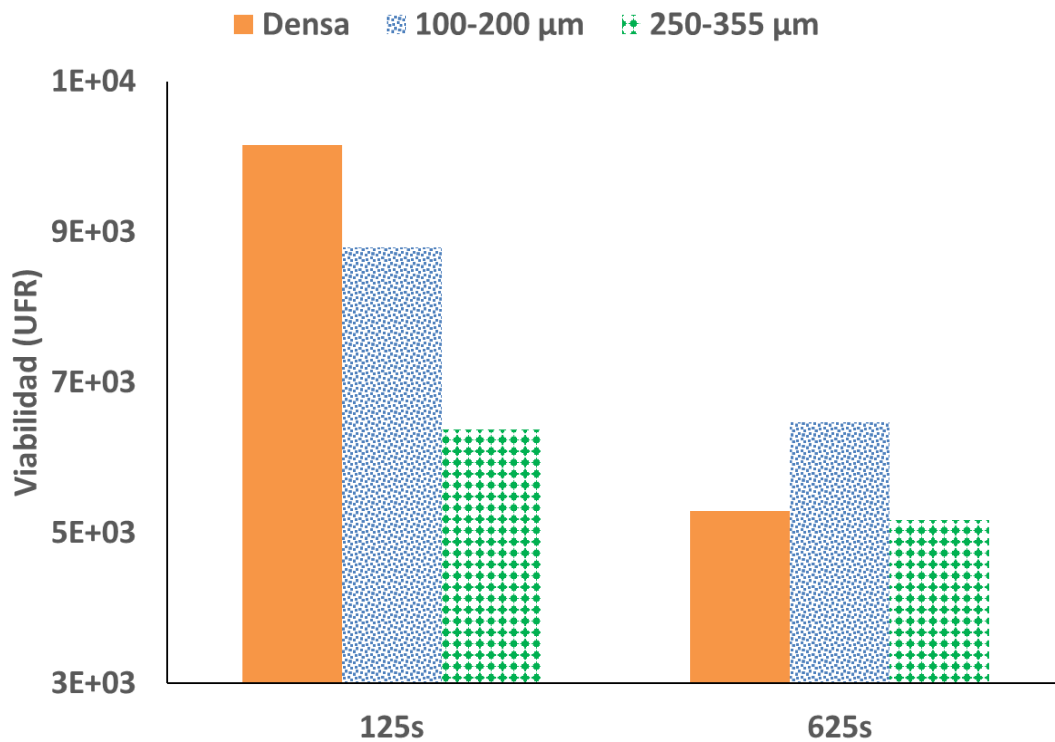


Figura 68. Proliferación celular tras 10 días de cultivo en los sustratos de titanio denso y porosos de 100-200 y 250-355 µm de tamaño de partícula de espaciador, atacados químicamente por inmersión a 125 y 625 s, respectivamente.

Las tasas alcanzadas tras 10 días de cultivo resultan ser las más altas, como cabe esperar. La Figura 68 revela valores de $1.0 \cdot 10^4$ para el sustrato denso, de $8.8 \cdot 10^3$ UFR para la muestra porosa de 100-200 µm y de $6.4 \cdot 10^3$ UFR para la de 250-355 µm, tras el ataque a 125 s. Por su parte, una vez inmersos los sustratos a 625 s, muestra medidas menores de $5.3 \cdot 10^3$, $6.5 \cdot 10^3$ y $5.2 \cdot 10^3$ UFR, respectivamente.

El estudio por microscopía invertida de fluorescencia de los sustratos denso y porosos atacados a 125 y 625 s, al igual que para el caso de las probetas vírgenes, permitió obtener imágenes tanto de la adhesión (Figura 69) como de la proliferación (Figura 70) sobre las muestras.

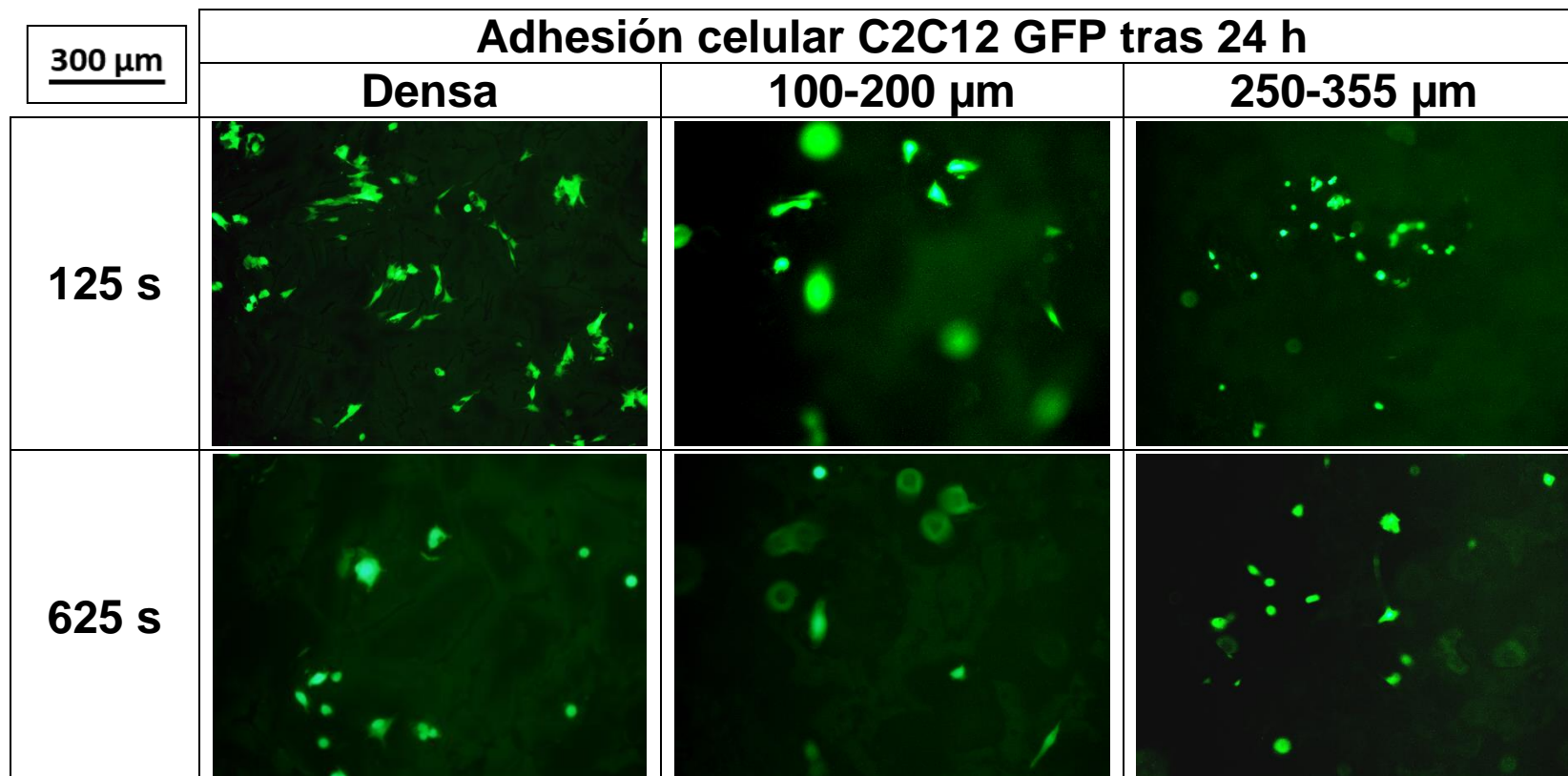


Figura 69. Imágenes de adhesión celular tras 24 h obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia de los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.

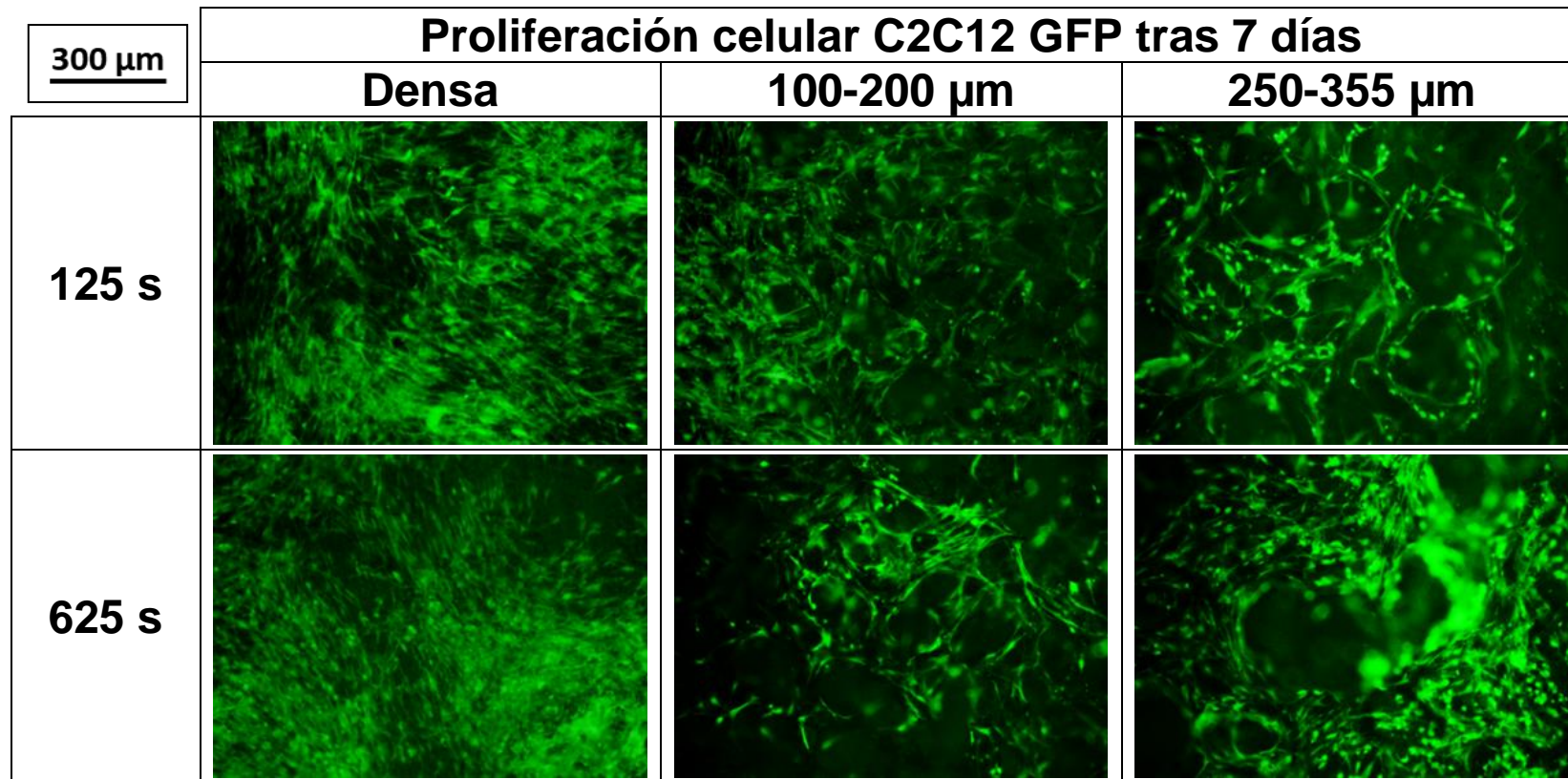


Figura 70. Imágenes de proliferación celular tras 7 días obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia para los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.

Capítulo 3

La Figura 69 muestra una mayor adhesión celular tras 24 h de cultivo del sustrato denso, atacado por inmersión a 125 y 625 s, y con mayor nitidez y densidad para el menor tiempo de ataque. Por el contrario, en el caso de las muestras porosas, las imágenes se muestran menos definidas y revelan una adhesión deficiente. Tras 7 días de cultivo (Figura 70), la microscopía de fluorescencia invertida muestra una gran proliferación para todos los tipos de muestra, destacando el caso de los sustratos porosos, donde aumenta la densidad celular tanto en el interior como en el borde de los poros. En cuanto a tiempos de ataque, se aprecian niveles de proliferación mayores para el tiempo de 625 s.

3.2.2 Recubrimientos bioactivos

La función principal de este tipo de recubrimientos es transformar la superficie del material, en este caso el titanio, de bioinerte a bioactiva, como se refirió previamente. En esta línea de mejora de la osteointegración, se proponen dos vías de recubrimientos bioactivos en cuanto a tipo y a técnica de deposición utilizada.

La primera de ellas corresponde a la deposición directa de un recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel. La HA es un fosfato cálcico presente en el hueso, de forma que se promueve que el hueso se adhiera más fácilmente al recubrimiento, y, por tanto, al implante. La segunda vía consiste en la deposición de vidrio bioactivo (BG) mediante goteo, una técnica novedosa, eficiente y económica que garantiza el recubrimiento y la infiltración de las partículas de vidrio en los poros del material. El BG tiene como característica principal que, en presencia de fluido fisiológico, precipita en forma de HA, es decir, promueve la formación indirecta de HA, intercambiando iones con el medio fisiológico, lo que facilita que el hueso se adhiera más fácilmente al implante.

La deposición de ambos tipos de recubrimiento fue llevada a cabo, así como la caracterización correspondiente para cada uno de ellos, tal y como se expone en la Figura 71.

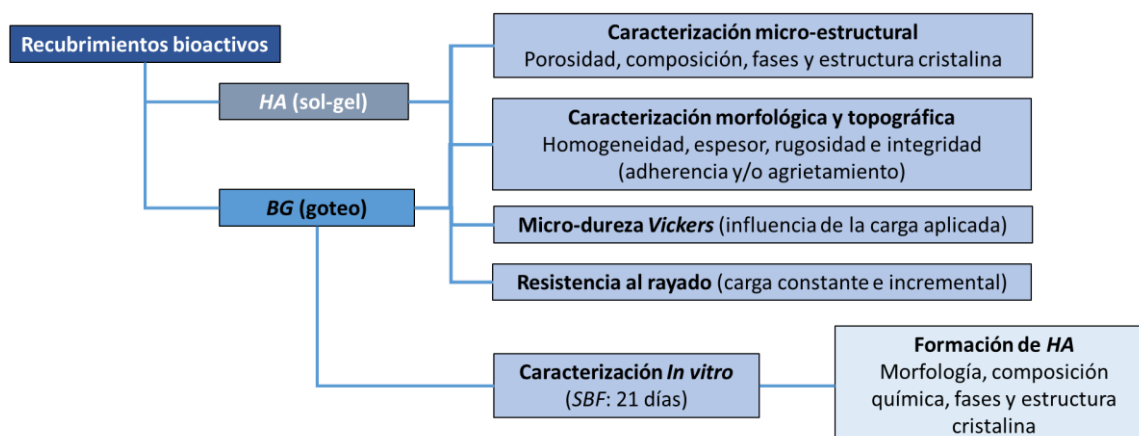


Figura 71. Extracto del esquema de la Figura 27. Etapas seguidas para la mejora de la osteointegración por la vía de recubrimientos bioactivos.

Deposición de hidroxiapatita: Técnica de sol-gel

La caracterización del recubrimiento, tanto micro-estructural, morfológica y topográfica, como del comportamiento mecánico, consistió en la evaluación de la homogeneidad, adhesión, infiltración e integridad del recubrimiento. Los resultados mostrados corresponden a las muestras porosas, debido a que no fue posible realizar el recubrimiento sobre la muestra densa por la falta de adherencia al sustrato.

Caracterización de la superficie de los sustratos recubiertos con HA: Estudio de la composición, homogeneidad, rugosidad y grado de infiltración del recubrimiento

La caracterización microestructural se focalizó, principalmente, en la identificación de la composición y de las fases del recubrimiento, por lo que se usaron técnicas como EDX, FTIR y la XRD. El objetivo principal fue corroborar que el recubrimiento presentó la existencia de la HA.

Los espectros de EDX de los recubrimientos de HA sobre los sustratos porosos de titanio se muestran en la Figura 72, donde se indica en cada pico el elemento principal que lo conforma. Cabe destacar los elementos de Ca y P, ya que la HA es un fosfato de calcio para ambas muestras porosas de titanio con tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm .

Capítulo 3

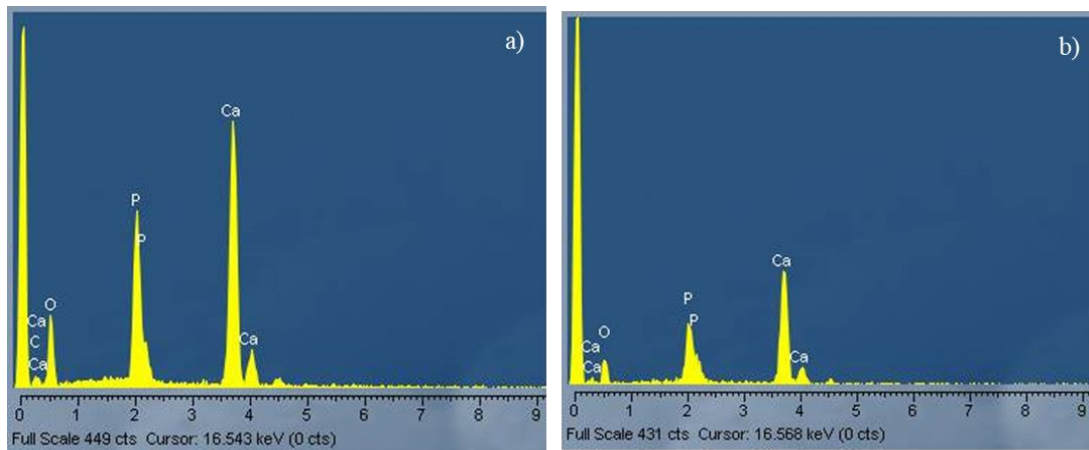


Figura 72. Espectros de EDX de la superficie del recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm .

El espectro de FTIR queda recogido en la Figura 73 para los sustratos recubiertos por HA de rango de tamaño partícula de espaciador de 100-200 y 250-355 μm respectivamente. En ellos se aprecian la formación de carbonatos y de fosfatos, propios de la HA.

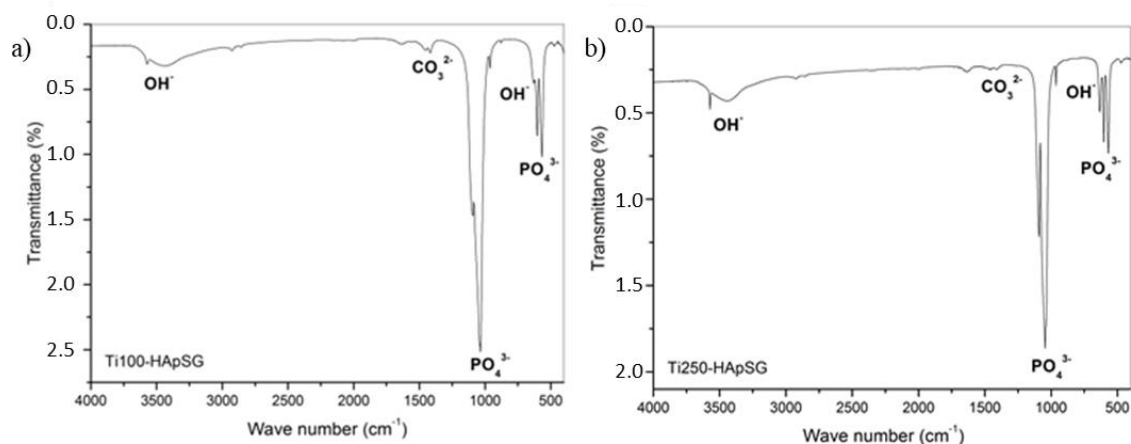


Figura 73. Espectro FTIR de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.

La Figura 74 muestra por su parte los difractogramas de ambas muestras porosas de titanio con tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm recubiertas con HA. En ambos se observan las fases indexadas, destacando los componentes propios de HA y de carbonato cálcico (CaCO_3). Cabe destacar que, todas las fases son similares para ambos sustratos porosos.

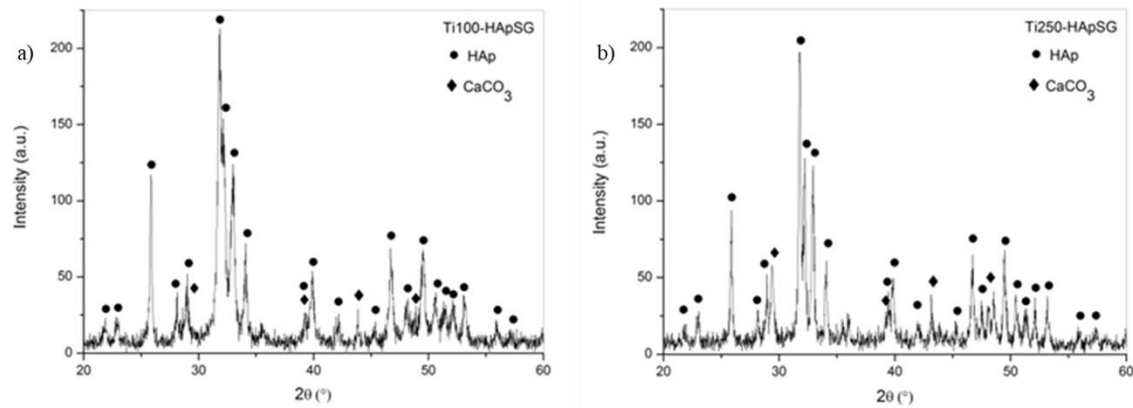


Figura 74. Diagrama XRD de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.

Una vez se ha corroborado que la composición y las fases del recubrimiento son de HA, fue necesario evaluar la morfología de ésta, así como la adhesión, infiltración y homogeneidad del recubrimiento una vez fue depositado sobre los sustratos de titanio.

Las micrografías SEM del recubrimiento de la muestra porosa de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , son representadas en la Figura 75 a y c. Se observan las imágenes correspondientes a la superficie de la capa de HA. La topografía por microscopía confocal láser en 3D de ambos sustratos después de la deposición del recubrimiento de HA es también representada en la Figura 75 b y d.

Capítulo 3

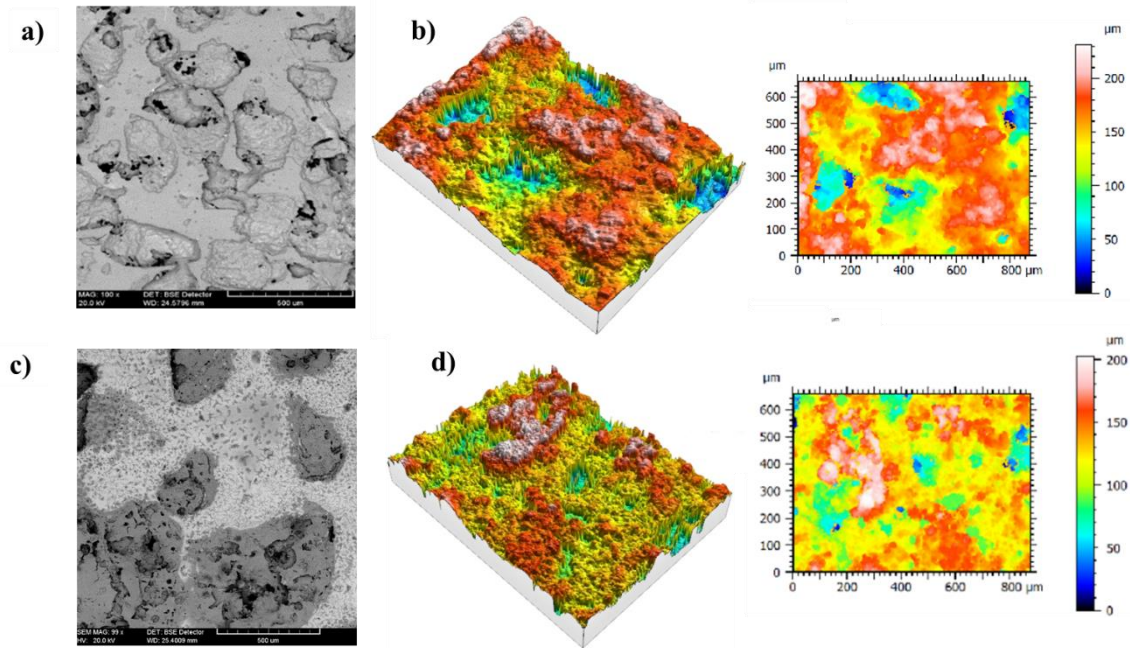


Figura 75. Micrografías SEM de la superficie e Imágenes 3D de microscopía confocal láser de la topografía del recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm (a y b) y 250-355 μm (c y d), respectivamente.

La Tabla 30 muestra los parámetros de rugosidad en 3D de la topografía del recubrimiento, obtenidos mediante microscopía confocal, para los sustratos porosos de ambos tamaños de partícula de espaciador (100-200 μm y 250-355 μm). Cabe destacar que, debido a la heterogeneidad del recubrimiento, no fue posible diferenciar entre zona plana y zona porosa.

Tabla 30. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z) obtenidos por microscopía confocal láser de las superficies recubiertas por HA de los sustratos porosos de Ti en función del tamaño de espaciador.

	S_a (μm)	S_q (μm)	S_z (μm)
100-200 μm	31.9	40.8	231.5
250-355 μm	23.2	30.2	202.9

Los parámetros de rugosidad obtenidos tras recubrir los sustratos con HA alcanzan valores de S_a de 31.9 y 23.2 μm para las muestras porosas 100-200 y 250-355 μm , respectivamente. Por su parte, los resultados para S_q y S_z son de 40.8 y 231.5 μm para la muestra porosa de menor rango de tamaño de

espaciador una vez se ha recubierto con HA, siendo, de forma correspondiente, de 30.2 y 202.9 μm para el sustrato poroso de 250-355 μm .

Comportamiento micro-mecánico de los sustratos recubiertos con HA: microdureza

Con el fin de evaluar la integridad estructural del recubrimiento de HA una vez ha sido depositado, se realizó el estudio del comportamiento micro-mecánico de los sistemas recubrimiento-sustrato mediante ensayos de microdureza Vickers, así como el comportamiento tribológico.

Los valores de micro-indentación Vickers para las muestras porosas de titanio (tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm) son recogidos en la Tabla 31.

Tabla 31. Valores de microdureza Vickers para cargas HV0.3 y HV1 sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.

	<i>HV0.3</i>	<i>HV1</i>
<i>100-200 μm</i>	279 \pm 77	360 \pm 72
<i>250-355 μm</i>	427 \pm 92	576 \pm 63

La muestra porosa recubierta de menor rango de tamaño de espaciador revela valores de microdureza Vickers de 279 y 360 para HV0.3 y HV1, respectivamente. Por su parte, la muestra porosa de 250-355 μm con recubrimiento de HA, muestra resultados de 427 para HV0.3 y de 576 para HV1. Cabe destacar la gran dispersión que presentan los valores de microdureza Vickers para ambos tipos de sustrato.

Comportamiento tribomecánico de los sustratos recubiertos con HA: resistencia al rayado

Como se glosó anteriormente, debido a los esfuerzos a los cuales un implante está sometido una vez se encuentra dentro del cuerpo humano, es necesario el estudio del comportamiento tribológico de los sustratos recubiertos, con el fin de evaluar la integridad e influencia del recubrimiento sobre el sistema. En este contexto, se realizaron ensayos de rayado sobre las muestras recubiertas con

Capítulo 3

HA. El ensayo de desgaste, por su parte, no se llevó a cabo por razones de una adhesión deficiente del recubrimiento de HA al sustrato, conllevando el riesgo de levantamiento de éste.

El estudio del ensayo de rayado implicó el análisis de las cargas críticas del recubrimiento, para ambos sustratos porosos. La Figura 76 muestra el ensayo de rayado a carga incremental (de 0 a 25 N) de las muestras porosas de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm . El ensayo se realizó a carga incremental con el objetivo de evaluar el límite en la integridad del recubrimiento. Un requisito inicial para una buena integridad es que la apariencia de éste sea homogénea.

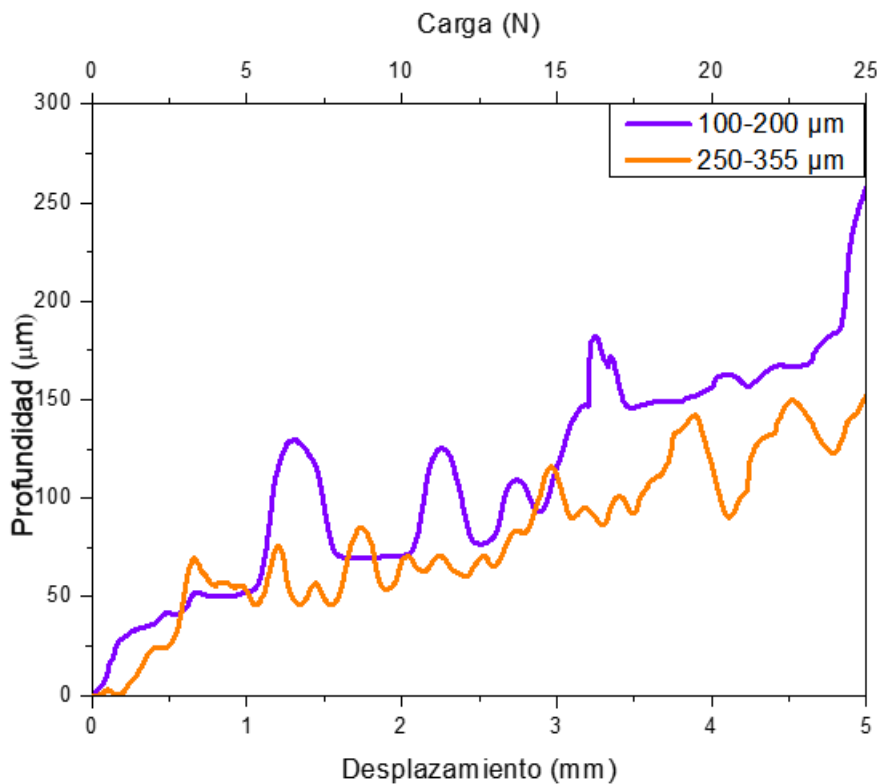


Figura 76. Penetración real del ensayo de rayado a carga incremental de 0 a 25 N de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.

Se observa que la penetración del indentador aumenta conforme lo hace la carga, alcanzando valores de penetración máxima de 341.9 μm para el sustrato poroso de menor rango de tamaño de espaciador y de 174.0 μm para el sustrato poroso de 250-355 μm . Adicionalmente, éste último presenta menos amplitud en sus oscilaciones, siendo estas, a su vez, más numerosas.

De igual forma, se realizó el ensayo de rayado a carga constante para las muestras porosas de titanio de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm recubiertas con HA. El estudio a carga constante implica el análisis de límite, así como de forma, del levantamiento del recubrimiento. Cabe destacar que este ensayo se realizó sobre las muestras recubiertas con HA, a 3 N y con un recorrido de 2.5 mm, a diferencia de los sustratos vírgenes (5 N y 4 mm). La razón fue evitar el efecto de borde del recubrimiento (menor recorrido sin efecto de bordes). La Figura 77 muestra el perfil topográfico del recubrimiento en la etapa de pre-palpación, así como el perfil del surco una vez realizado el ensayo de rayado, a 3 N y con un recorrido de 2.5 mm, para ambos tipos de sustratos porosos recubiertos.

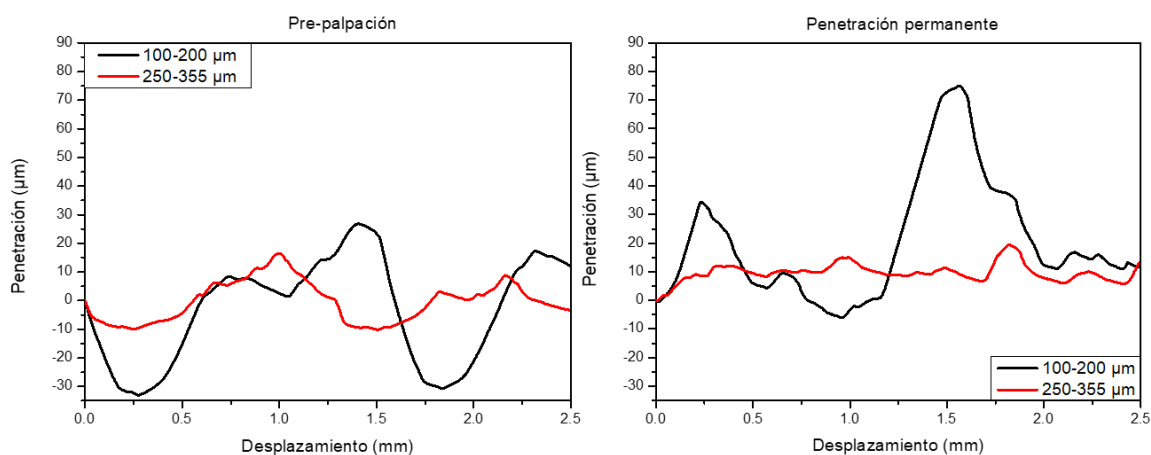


Figura 77. Ensayo de rayado con 3 N y 2.5 mm de recorrido. Perfil topográfico de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).

Las gráficas muestran, para ambos sustratos, que la penetración es mayor tras la etapa de postpalpación. Mientras que el sustrato poroso recubierto de 250-355 μm no presenta grandes oscilaciones ni diferencias entre ambas etapas del ensayo, la muestra porosa de menor rango de tamaño de espaciador revela un comportamiento contrario, con una gran profundidad de penetración tras el rayado. Para este sustrato, la amplitud de las oscilaciones resulta ser grande en ambas etapas del ensayo, invirtiéndose la curva, prácticamente de forma simétrica, entre una etapa y otra. Este hecho sugiere que el recubrimiento de HA resulta ser muy heterogéneo.

Capítulo 3

Por su parte, los parámetros de rugosidad 2D tras el ensayo de rayado, obtenidos a partir de las gráficas de la Figura 77, se recogen en la Tabla 32.

Tabla 32. Parámetros de rugosidad de la topografía de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).

		R_a (μm)	R_q (μm)	R_z (μm)
100-200 μm	Pre-palpación	15.6	18.4	59.8
	Penetración permanente	21.0	28.9	81.0
250-355 μm	Pre-palpación	5.9	7.0	26.6
	Penetración permanente	9.8	10.3	19.4

La etapa de pre-palpación revela rugosidades de 15.6 μm para R_a , 18.4 μm para R_q y 59.8 μm para R_z en la muestra porosa de 100-200 μm recubierta con HA. En el mismo caso, el recubrimiento de HA sobre la muestra porosa de mayor rango de tamaño de partícula de espaciador presenta valores de 5.9, 7.0 y 26.6 μm , respectivamente. Sin embargo, la etapa de post-palpación (penetración permanente) para el sustrato poroso recubierto de 100-200 μm , obtiene valores de 21.0 μm para R_a , 28.9 μm para R_q y 81.0 μm para R_z , siendo de 9.8, 10.3 y 19.4 μm , respectivamente, para la muestra porosa recubierta de 250-355 μm .

Tras el ensayo de rayado, los sistemas recubrimiento de HA – sustrato poroso experimentan una recuperación elástica en el surco generado, al igual que ocurría con los sustratos vírgenes. La recuperación elástica de las muestras recubiertas para ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador se grafica en la Figura 78.

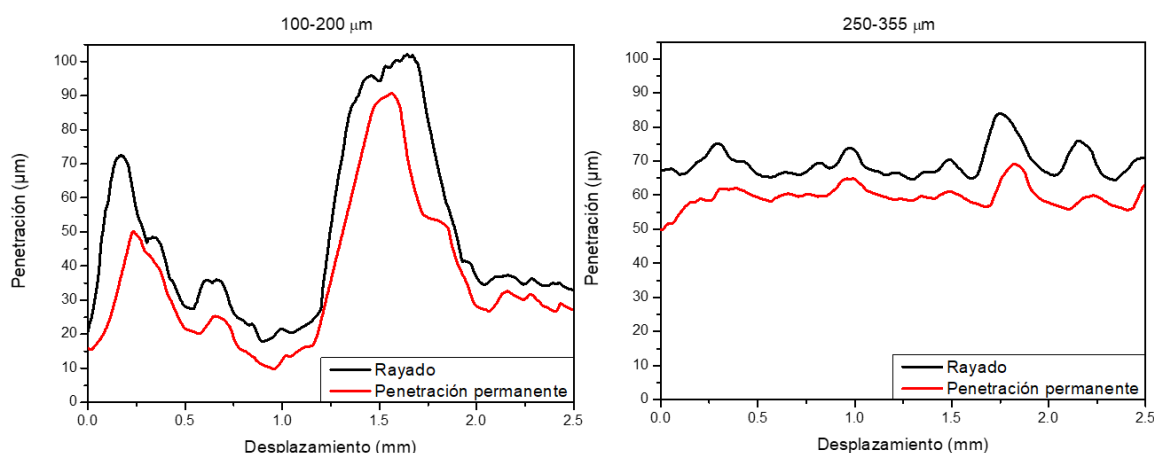


Figura 78. Recuperación elástica de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm y 250-355 µm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel durante y tras el rayado (penetración permanente).

Se observa que la recuperación elástica es similar para ambos sustratos porosos recubiertos con HA, presentando oscilaciones mucho mayores para la muestra de menor rango de tamaño de espaciador, lo que revela una topografía más heterogénea.

Los parámetros principales del análisis de la recuperación elástica experimentada por los sustratos recubiertos con HA tras el ensayo de rayado, obtenidos a partir de las gráficas de la Figura 78, se recogen en la Tabla 33.

Tabla 33. V_m , RE, Máx y Mín, y Δ máx y Δ mín de los valores máximo y mínimo de penetración para los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm y 250-355 µm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel durante y tras el rayado (penetración permanente).

		V_m (µm)	RE (µm)	Máx (µm)	Mín (µm)	Δ máx (µm)	Δ mín (µm)
100-200 µm	Rayado	47.9	11.9	102.2	17.9	92.5	72.8
	Penetración permanente	36.0		90.7	9.7		
250-355 µm	Rayado	69.5	9.9	83.9	64.6	34.2	4.6
	Penetración permanente	59.6		69.2	49.8		

Los valores medios de penetración (V_m) para el sustrato poroso de 100-200 µm una vez se ha recubierto con HA, son de 47.9 µm para el rayado y 36.0 µm para la penetración permanente, frente a 69.5 y 59.6 µm para el sustrato poroso

Capítulo 3

recubierto de mayor rango de tamaño de espaciador, respectivamente. Dichos resultados originan una recuperación elástica (*RE*) mayor para el sustrato poroso recubierto de 100-200 μm (11.9 μm) que para el correspondiente a 250-355 μm (9.9 μm). En cuanto a la penetración, tanto mínima (*Mín*) como máxima (*Máx*), en la etapa de rayado para la muestra porosa de 100-200 μm con recubrimiento, se obtienen valores de 17.9 y 102.2 μm , respectivamente, siendo en la etapa de penetración permanente de 9.7 y 90.7 μm . De igual forma, el sustrato poroso de 250-355 μm tras ser recubierto, presenta valores de penetración máxima (*Máx*) y mínima (*Mín*) en la etapa de rayado de 64.6 y 83.9 μm , y de 49.8 y 69.2 μm para la etapa de penetración permanente. Estos resultados, generan una diferencia mínima (Δ *mín*) de 72.8 μm para la porosa recubierta de menor rango de tamaño de espaciador y de 4.6 μm para la porosa recubierta de 250-355 μm , así como diferencias máximas (Δ *máx*) de 92.5 y 34.2 μm , respectivamente.

Deposición de Bioglass: técnica de sedimentación por goteo

Como se explicó anteriormente el BG empleado fue el 45S5, de composición en peso: 45 % SiO_2 , 24.5 % CaO , 24.5 % Na_2O y 6 % P_2O_5 . Al igual que para el recubrimiento de HA, la caracterización del recubrimiento de BG consistió en la evaluación de la homogeneidad, adhesión, capacidad de infiltración e integridad estructural del recubrimiento, así como en la optimización de éste.

Caracterización de la superficie de los sustratos recubiertos con BG: morfología y topografía superficial del recubrimiento

La deposición del recubrimiento tuvo lugar en distintas etapas. Se evaluaron, tres tipos de recubrimiento, formados por 1 capa (primera deposición), 2 capas (segunda deposición) y 3 capas (tercera deposición). Las macrografías de los sustratos con las distintas deposiciones, una vez fueron depositados los recubrimientos y antes de ser sometidos al tratamiento térmico, se recogen en la Figura 79. Asimismo, dicha figura muestra también los sustratos recubiertos con las tres capas, tras ser sometidos al tratamiento térmico (sinterizado) de estas para consolidar el recubrimiento.

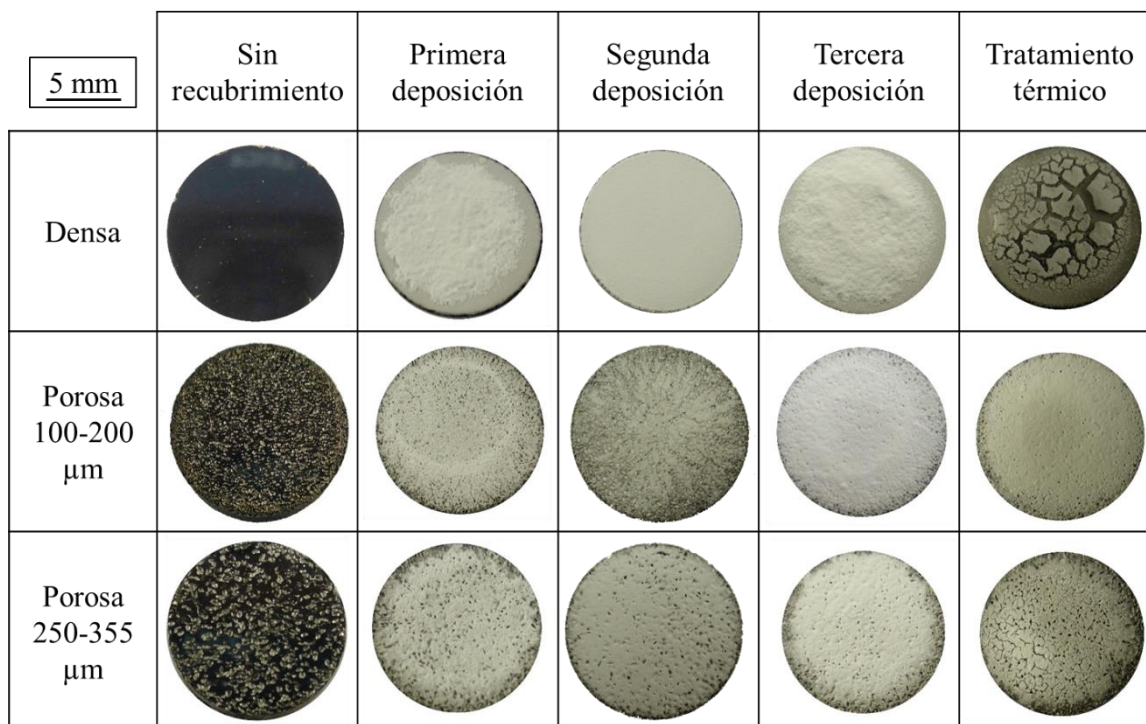


Figura 79. Apariencia macroscópica de los sustratos de titanio recubiertos antes (1, 2 y 3 capas) y después (3 capas) del tratamiento térmico (diámetro de las muestras de 12 mm).

Antes del tratamiento térmico, en general, se observa cómo al aumentar el número de capas, la homogeneidad del recubrimiento es mayor en toda la superficie del sustrato. Tras el tratamiento térmico, el recubrimiento de BG de la muestra densa pierde toda la homogeneidad, agrietándose fuertemente, mientras que permanecen homogéneos los recubrimientos de las muestras porosas, si bien el de la 100-200 μm tiene una mayor apariencia de homogeneidad frente al de 250-355 μm .

La caracterización microestructural se realizó mediante el análisis de la composición y de las fases del sistema recubrimiento de BG – sustrato de titanio, empleando EDX y XRD.

Las imágenes SEM en un corte transversal del recubrimiento de BG – sustrato de titanio poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm (Figura 80) pusieron de manifiesto la infiltración de las partículas de vidrio en el interior del sustrato de titanio. Por su parte, el análisis por EDX reveló la existencia de los elementos principales del BG (Si, Ca y levemente Na) en el interior de los poros.

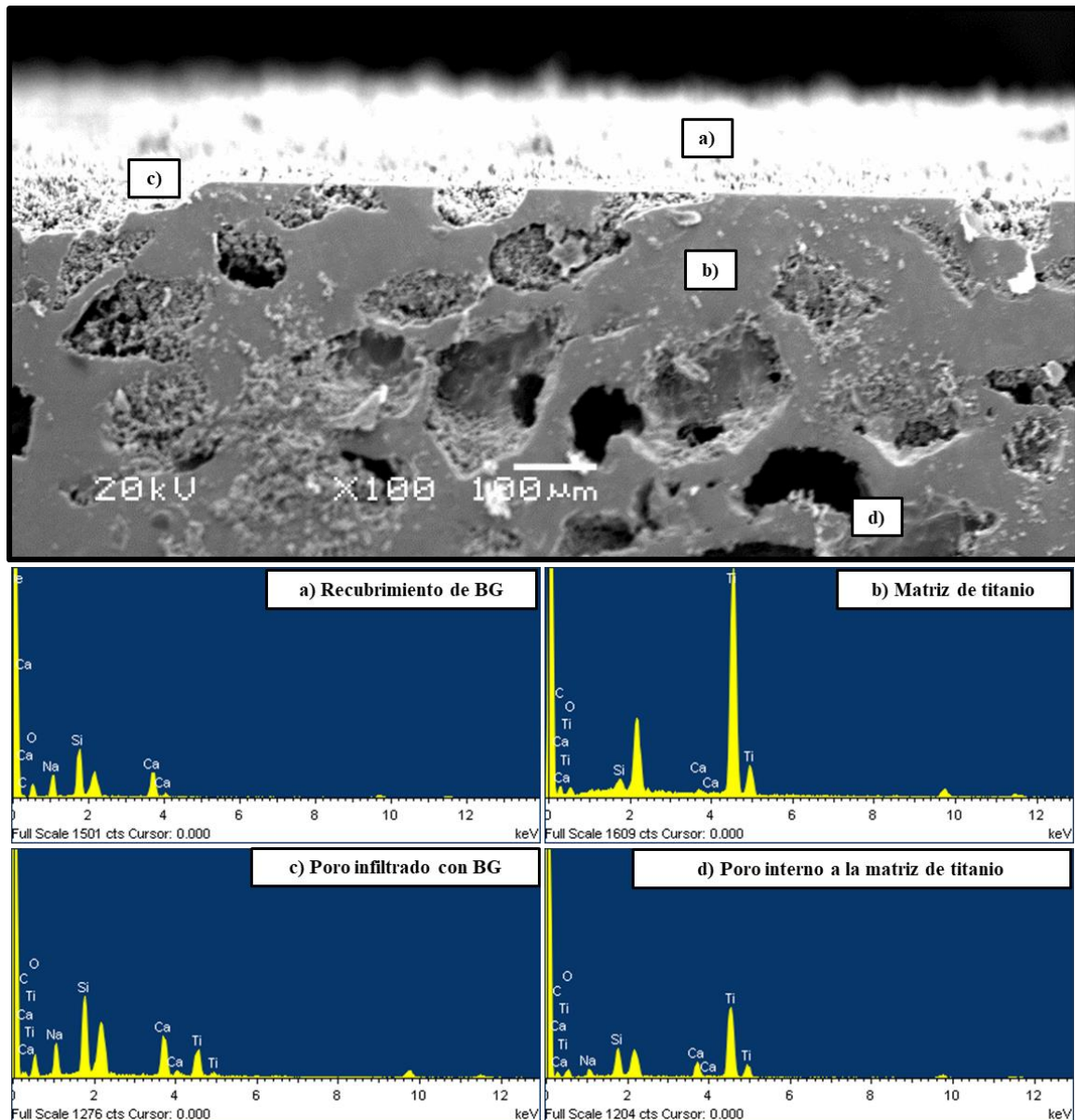


Figura 80. Micrografía SEM de un corte transversal del sustrato poroso de 100-200 µm de rango de tamaño de partícula de espaciador, recubierto con 3 capas de BG, tras el proceso de sinterizado (arriba). Espectros de EDX de las distintas zonas del sistema sustrato-recubrimiento (abajo).

La Figura 81 a muestra el difractograma del polvo de BG en estado de recepción, así como el correspondiente difractograma (Figura 81 b) del recubrimiento de BG tras ser sometidas al tratamiento térmico de consolidación. Antes del tratamiento térmico se observa un difractograma típico de un material amorfo, correspondiente al estado del BG depositado en el recubrimiento. Por el contrario, después del tratamiento térmico, se observa la formación de fases

crystalinas, cuyos picos se ha identificado que son correspondientes a óxidos de silicio, fosfato sódico, y silicato sódico de calcio.

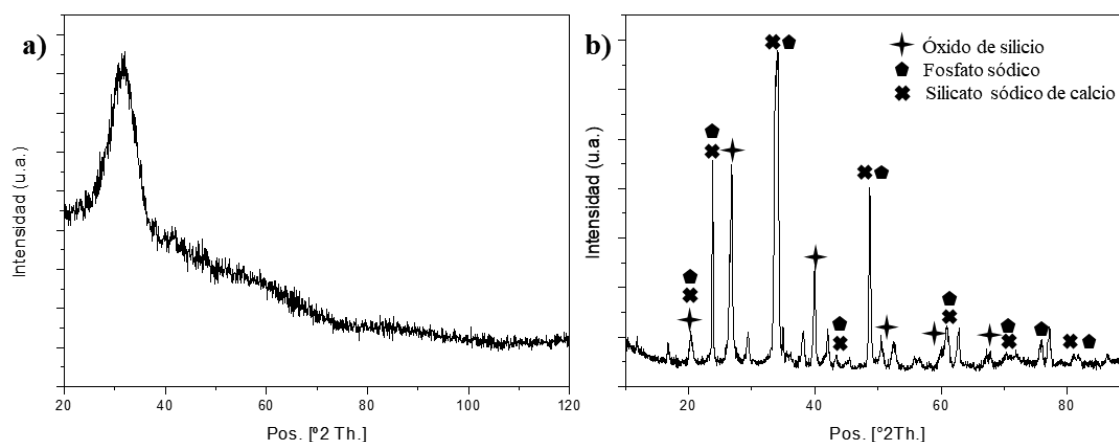


Figura 81. Espectro XRD de a) las partículas de BG en estado de recepción (antes de ser sinterizado) y b) del BG tras el proceso de sinterizado. Transición de un estado amorfo a un estado cristalino.

Una vez se ha analizado la composición del recubrimiento sobre los sustratos de titanio, así como sus fases tras el tratamiento térmico del proceso de sinterizado, se llevó a cabo el estudio de la morfología del recubrimiento, así como su homogeneidad, integridad y espesor de este.

La Figura 82 muestra imágenes de un sustrato poroso de titanio de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , una vez el BG ha sido depositado. Las micrografías de la Figura 55 a y b se han realizado sobre una superficie plana, mientras las de Figura 82 c y d corresponden a un poro recubierto de BG. Asimismo, se presentan imágenes SEM del sustrato poroso de 250-355 μm tras la deposición del recubrimiento de BG en la Figura 83, de la zona plana (a y b) y de un poro recubierto (c y d).

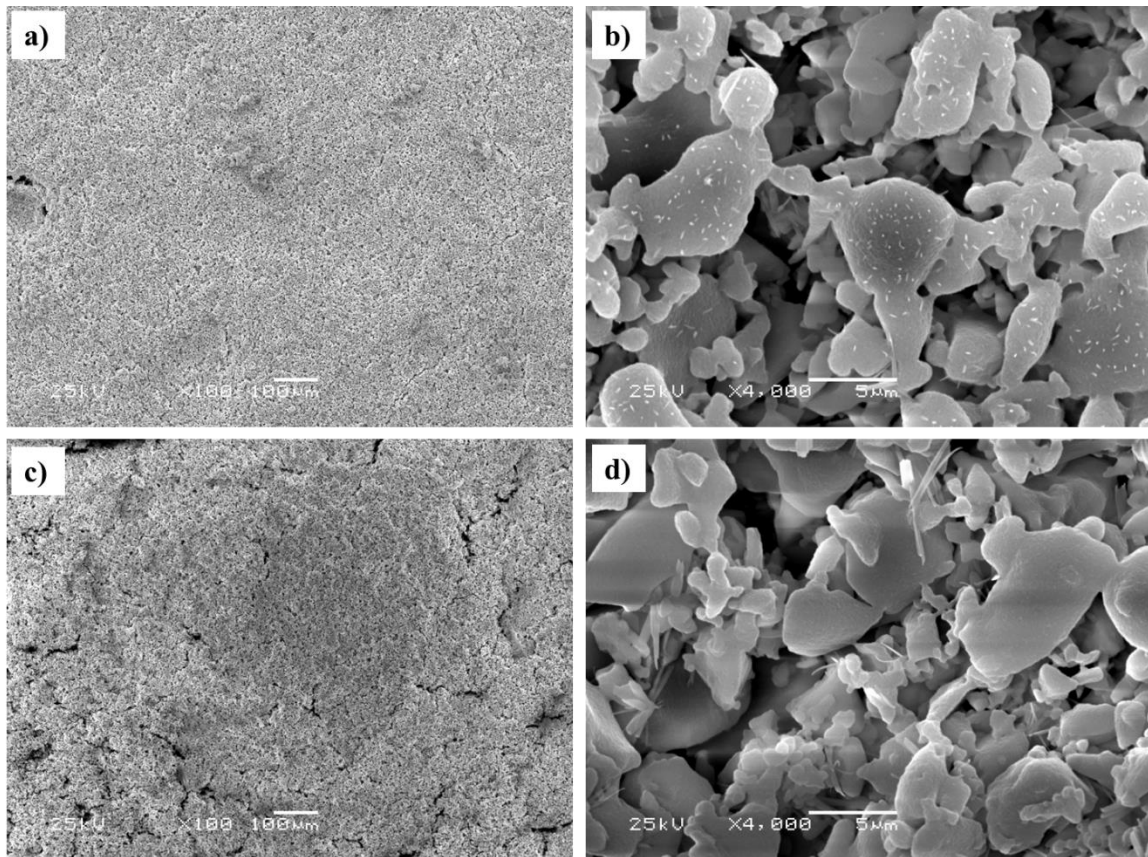


Figura 82. Micrografías SEM del sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el recubrimiento de BG de 3 capas, a menor y mayor aumento, respectivamente de: a), b) zona plana del sustrato y c), d) presencia de poros.

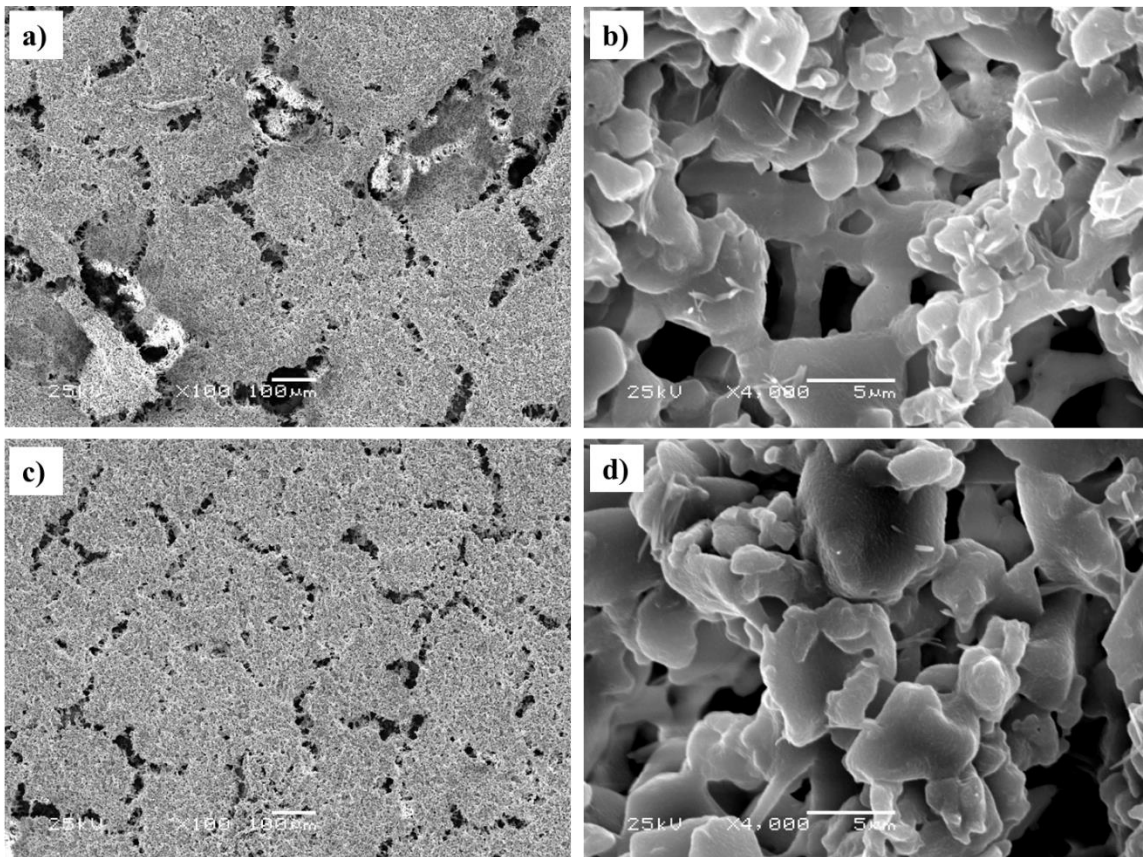


Figura 83. Micrografías SEM del sustrato poroso de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el recubrimiento de BG de 3 capas, a menor y mayor aumento, respectivamente de: a), b) zona plana del sustrato y c), d) presencia de poros.

Las micrografías SEM del sustrato poroso de 100-200 μm recubierto con BG, revela un recubrimiento más homogéneo que para el sustrato de 250-355 μm , revelando este último la presencia de grietas tanto en la zona plana como en la porosa. Destaca la apreciable infiltración del BG en el poro de la muestra porosa de menor rango de tamaño de espaciador, donde se observa también la aparición de pequeñas grietas en el recubrimiento (Figura 82 c).

Por otro lado, el recubrimiento de BG sobre la muestra densa no obtuvo buena adhesión, como muestra la Figura 84. Se aprecian zonas con buena y mala adherencia en la misma superficie, generando un recubrimiento discontinuo y con poca integridad estructural. En el área de adhesión deficiente, se observan pequeñas partículas aisladas sobre el sustrato, evidenciando el fallido proceso de deposición y sinterizado del vidrio.

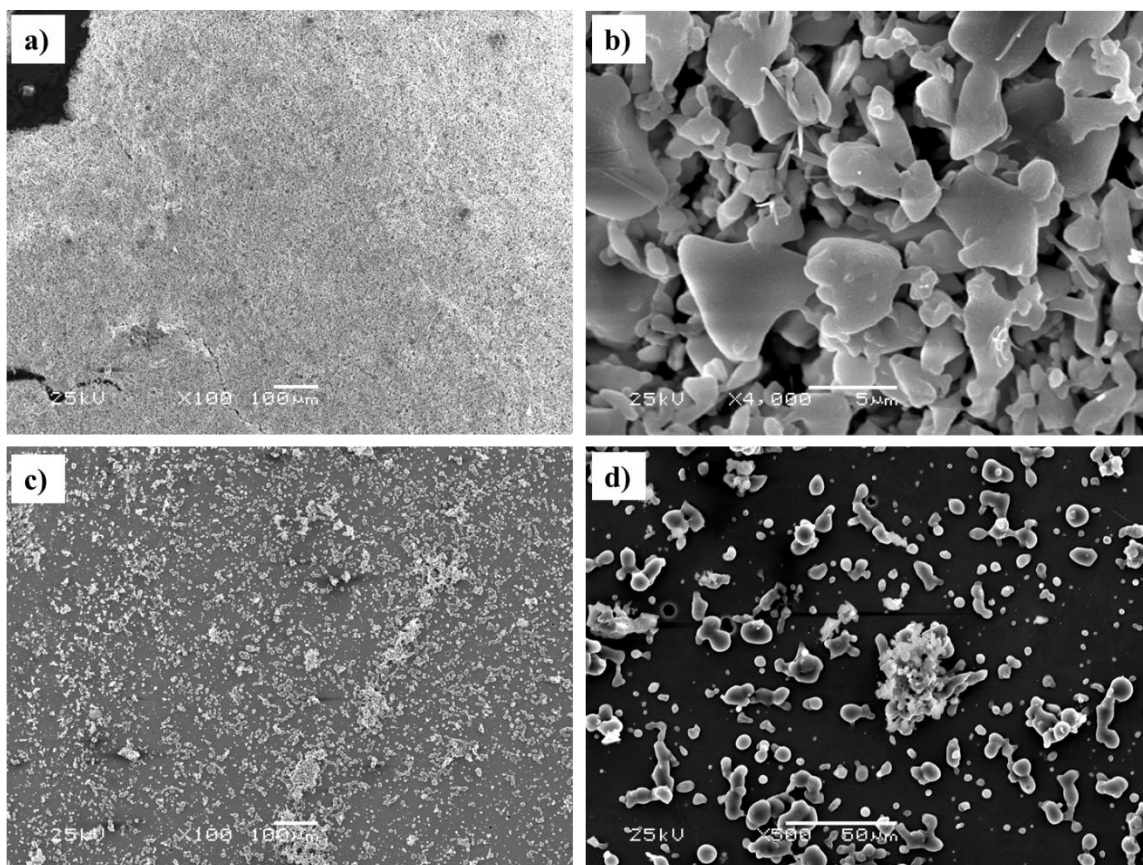


Figura 84. Micrografías SEM del sustrato denso tras el recubrimiento de BG de 3 capas, a menor y mayor aumento: a) y b) zona del sustrato con buena adhesión; c) y d) zona del sustrato con adhesión deficiente.

Comparando los recubrimientos del sustrato denso con los porosos, en general, se aprecia una diferencia significativa en cuanto a la adherencia del recubrimiento de BG. En este contexto, se hace necesario el estudio del espesor de la capa de recubrimiento, así como del grado de infiltración, de ambos tipos de sustrato.

La Figura 85 muestra micrografías SEM de la sección transversal del sustrato denso y del sustrato poroso de rango de tamaño de espaciador de 100-200 μm , ambos recubiertos con 3 capas de BG. El espesor del recubrimiento del sustrato denso resultó ser de $75.7 \pm 35.1 \mu\text{m}$, mientras que para el poroso fue de $167.9 \pm 20.1 \mu\text{m}$. En el denso, se corrobora el menor espesor y la peor homogeneidad de este tras la deposición, como consecuencia de la peor adherencia que se acaba de ilustrar. Este hecho se correlaciona con la presencia del desconche de este (ver imagen insertada de la Figura 85). Cabe destacar que, en el caso de la muestra de 250-355 μm , el espesor obtenido fue ligeramente inferior al de la

muestra de 100-200 μm , aunque no de forma significativa. Por su parte, la micrografía de la muestra porosa recubierta evidencia la infiltración del recubrimiento en el interior de los poros, de forma que potencialmente se puede mejorar la osteointegración del hueso con el sustrato.

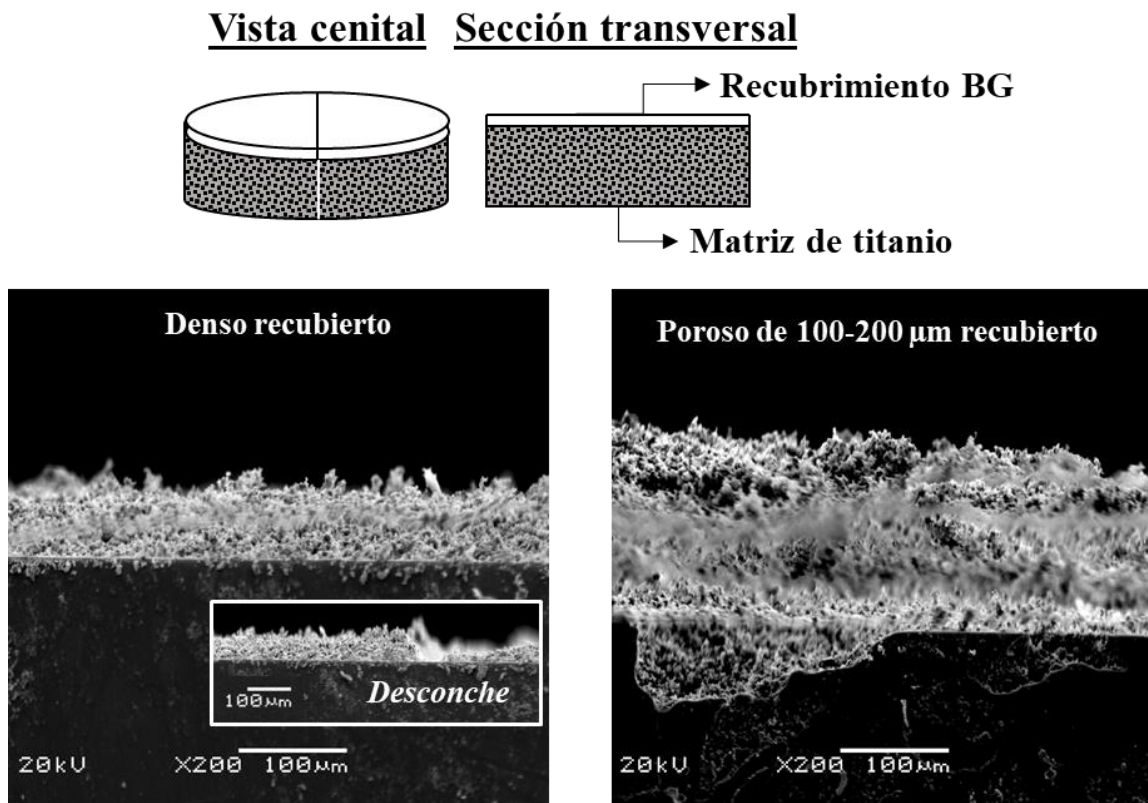


Figura 85. Esquema de la vista cenital y de la sección transversal de un sustrato poroso de titanio recubierto con BG (parte superior de la figura). Micrografías SEM de la sección transversal de los sustratos denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, respectivamente, tras el recubrimiento de BG de 3 capas (parte inferior de la figura). Imagen insertada: detalle del fenómeno de desconche en el sustrato denso de titanio recubierto.

Se ha comprobado que la deposición del recubrimiento lleva implícita la infiltración de éste en los sustratos porosos, adhiriéndose a sus paredes y modificando así la topografía de los sustratos. La caracterización de la superficie del recubrimiento de BG sobre el sustrato de titanio, no sólo se limita a la adhesión, sino que es necesario completarla con la caracterización de la rugosidad.

Capítulo 3

La Figura 86 muestra la topografía tanto de la parte plana como del interior de uno de los poros infiltrados tras la deposición del recubrimiento. Los sustratos corresponden a titanio poroso con tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm . En cuanto a la probeta densa, no fue posible tomar imágenes mediante microscopía confocal debido a que el recubrimiento no se adhirió en ciertas zonas, dejando visible la superficie pulida y reflectante del titanio.

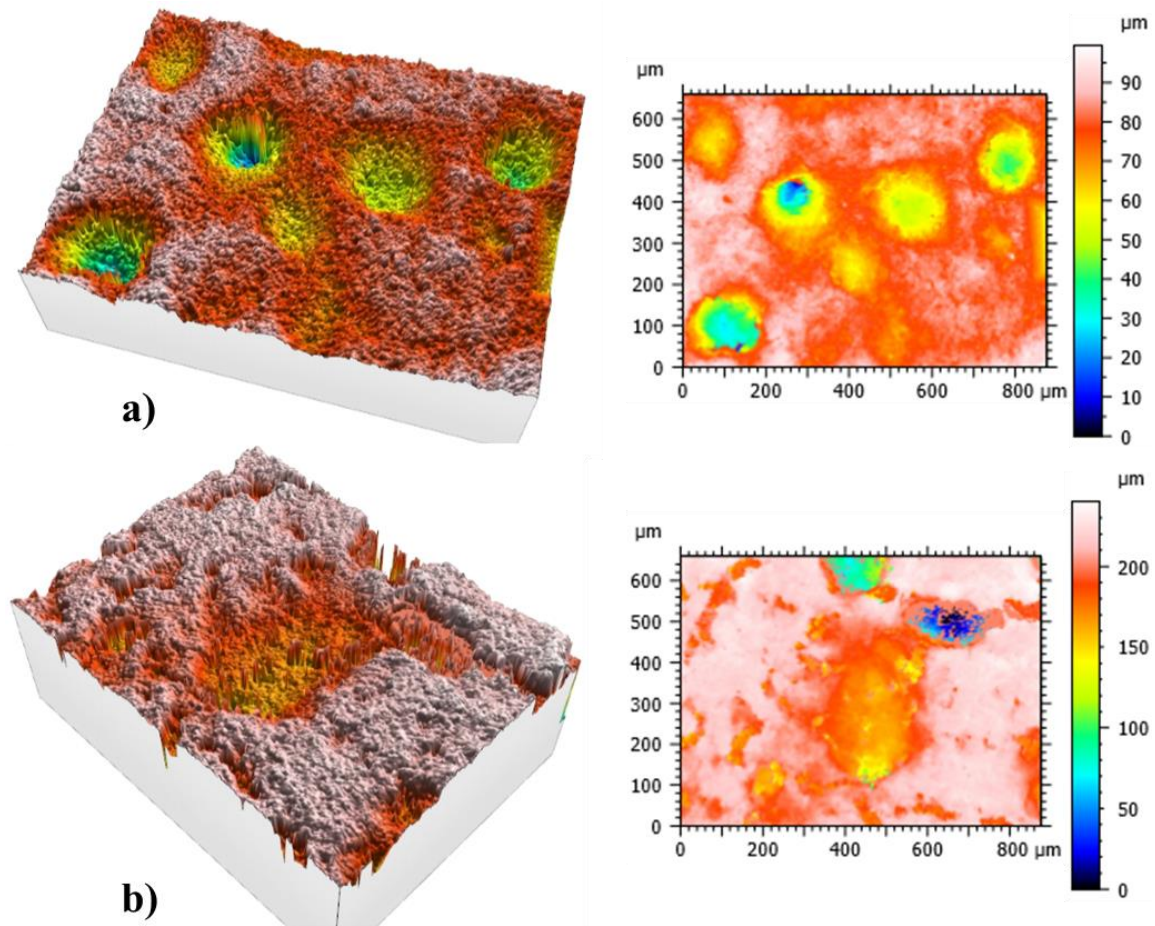


Figura 86. Imágenes 3D de microscopía confocal láser de la topografía del recubrimiento con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador a) 100-200 μm y b) 250-355 μm , respectivamente.

Las imágenes de confocal 3D dibujan parte de los poros de la superficie de los sustratos porosos, de forma que las partículas de BG no han llegado a recubrirlos por completo. En cuanto a las escalas de colores (Figura 86), se observa una mayor diferencia de alturas en la topografía del sustrato poroso de mayor rango de tamaño de espaciador tras la deposición del recubrimiento. Por su parte, la Tabla 34 recopila los valores de los principales parámetros de rugosidad,

obtenidos a partir de las imágenes de microscopía confocal de la Figura 86, para los sustratos porosos recubiertos con 3 capas de BG.

Tabla 34. Parámetros de rugosidad (S_a , S_q , S_z) obtenidos por microscopía confocal láser de las superficies recubiertas por 3 capas de BG de los sustratos porosos de Ti en función del tamaño de espaciador y de la zona del sustrato.

		S_a (μm)	S_q (μm)	S_z (μm)
100-200 μm	Zona plana	3.2	4.2	43.4
	Zona porosa	8.1	11.5	99.3
250-355 μm	Zona plana	6.1	7.6	54.8
	Zona porosa	18.2	28.8	239.9

En la parte plana, S_a es de 3.2 μm para el sustrato poroso de 100-200 μm recubierto con BG, siendo de 6.1 μm para la muestra porosa recubierta de mayor rango de tamaño de partícula de espaciador. De igual forma, S_q resulta ser de 4.2 y de 7.6 μm , respectivamente. S_z , por su parte, revela valores de 43.4 y de 54.8 μm , para ambos sustratos porosos recubiertos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.

En cuanto a la parte porosa, el valor de S_a es de 8.1 y 18.2 μm , para los sustratos porosos recubiertos con BG de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente. S_q , sin embargo, presenta valores de 11.5 μm para el sustrato poroso recubierto de 100-200 μm , y de 28.8 μm para la muestra porosa de 250-355 μm tras depositar el recubrimiento de BG. Finalmente, S_z alcanza niveles de 99.3 y 239.9 μm , para los sustratos porosos recubiertos con BG de 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente. En ambos sustratos recubiertos se observa como la zona porosa es más rugosa que la plana, probablemente debido a una infiltración no perfecta del vidrio en el interior de los poros. En cuanto a ambas muestras, las zonas planas no presentan unas diferencias muy significativas, mientras que las zonas porosas revelan rugosidades distintas, siendo mayores para la porosa de mayor rango de tamaño de espaciador.

Capítulo 3

Comportamiento micro y tribo-mecánico de los sustratos recubiertos con BG: Influencia del espesor, capacidad de infiltración y adherencia del recubrimiento (microdureza y resistencia al rayado)

La integridad estructural del recubrimiento de BG, así como la influencia del número de capas, fueron evaluados mediante ensayos de micro-indentación instrumentada Vickers, tanto para los sustratos denso y poroso de menor rango de tamaño de espaciador, sin recubrimiento como para los recubiertos con 1 y 3 capas (Figura 87). El objetivo principal fue el estudio de la presencia de poros y del grosor del recubrimiento. En la gráfica también se muestran los resultados de micro-indentación instrumentada con carga máxima de 1 N para un compacto denso de BG tras ser sometido al proceso de sinterizado del recubrimiento.

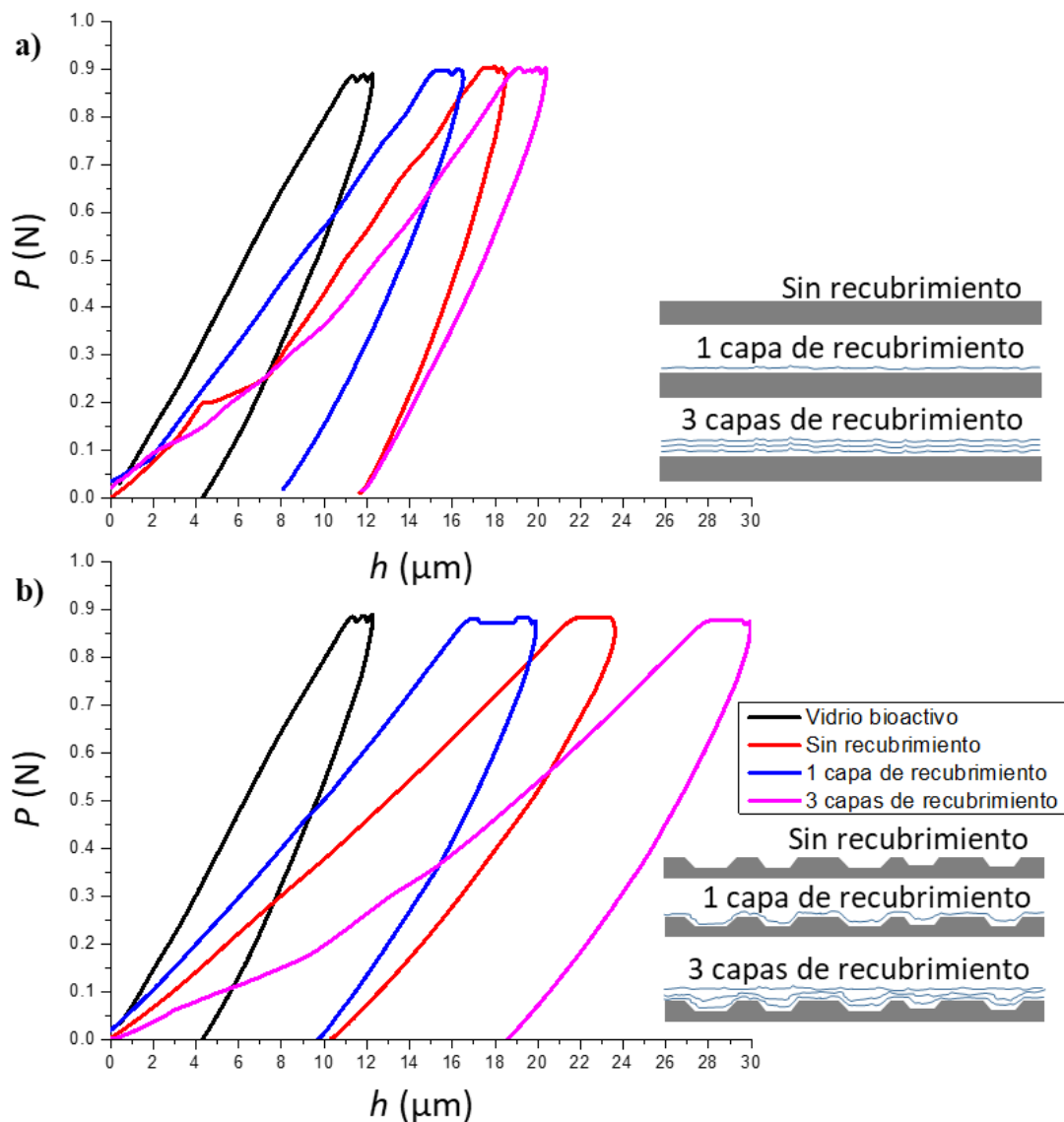


Figura 87. Carga aplicada frente a profundidad de penetración (curva P-h) sobre: a) sustrato denso de titanio y b) sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, sin y con recubrimiento de 1 y 3 capas, así como del compacto de BG una vez ha sido sinterizado.

Las gráficas revelan que, a igualdad de carga, la penetración máxima es mayor para los sustratos (denso y poroso de 100-200 μm) recubiertos con 3 capas, mientras que el menor valor de penetración máxima corresponde a los recubiertos con 1 capa, dejando así en una posición intermedia a las muestras sin recubrir. Como cabe esperar, el compacto de partículas de BG presenta la mayor dureza de todos los sistemas analizados (menor valor de penetración).

Capítulo 3

Del análisis correspondiente de las curvas anteriores (Figura 87) se obtienen los resultados recogidos en la Tabla 35.

Tabla 35. Parámetros principales de las curvas P-h del ensayo de micro-indentación instrumentada de los sustratos denso y poroso de tamaño de espaciador 100-200 μm , sin y con recubrimiento de BG: A (carga máxima del ensayo), B (penetración máxima), C (penetración permanente), B-A (fluencia o creep a carga constante), (B-C)/B (Recuperación elástica).

			A (μm)	B (μm)	C (μm)	(B-A) (μm)	(B-C)/B (%)
BG			11.3	12.2	4.3	0.9	65.0
Denso	Número de capas	Sin	17.5	18.3	11.7	0.9	36.3
		1	15.0	16.2	8.1	1.2	50.3
		3	19.1	20.4	11.8	1.2	42.2
100-200 μm		Sin	21.7	23.1	10.3	1.4	55.5
	1	16.8	19.9	9.7	3.1	51.2	
	3	27.4	30.0	18.6	2.5	38.0	

El ensayo de micro-indentación instrumentada, muestra para los compactos densos de BG valores de penetración de 11.3 μm (a carga máxima, A), 12.2 μm (máxima, B), y 4.3 μm (permanente, C). Dichos valores conllevan una fluencia (B-A) de 0.9 μm y una recuperación elástica ((B-C)/B) del 65 %. Por su parte, las muestras sin recubrimiento densa y porosa de menor rango de tamaño de partícula de espaciador presentan resultados para A de 17.5 y 21.7 μm , para B de 18.3 y 23.1 μm y para C de 11.7 y 10.3 μm . Asimismo, la fluencia y la recuperación elástica para los mismos resultan ser de 0.9 μm y de 36.3 % para el sustrato denso, así como de 1.4 μm y 55.5 % para el poroso de 100-200 μm . En cuanto a los sustratos recubiertos con 1 capa de BG, las profundidades de penetración obtenidas son, para el denso y el poroso de 100-200 μm , respectivamente, de 15.0 y 16.8 μm para A, de 16.2 y 19.9 μm para B, y de 8.1 y 9.7 μm para C. De esta forma, la fluencia para ambos sustratos es de 1.2 y 3.1 μm , siendo la recuperación elástica de 50.3 y de 51.2 %. Por último, tras la deposición de 3 capas de BG sobre las muestras densa y porosa de menor rango de tamaño de espaciador, los valores resultan ser de 19.1 y 27.4 μm para A, de 20.4 y 30.0 μm para B y de 11.8 y 18.6 μm para C, obteniéndose niveles de 1.2 y 2.5 μm para la fluencia y de 42.2 y 38.0 % para la recuperación elástica.

La Figura 88, por su parte, muestra, para su comparación, los resultados del ensayo de micro-indentación instrumentada Vickers, con carga máxima de 1 N, de una muestra (monolítica) de BG, y de los sustratos denso y porosos, con recubrimiento de tres capas de BG. El objetivo principal es evaluar la influencia del tamaño de poro del recubrimiento en este ensayo.

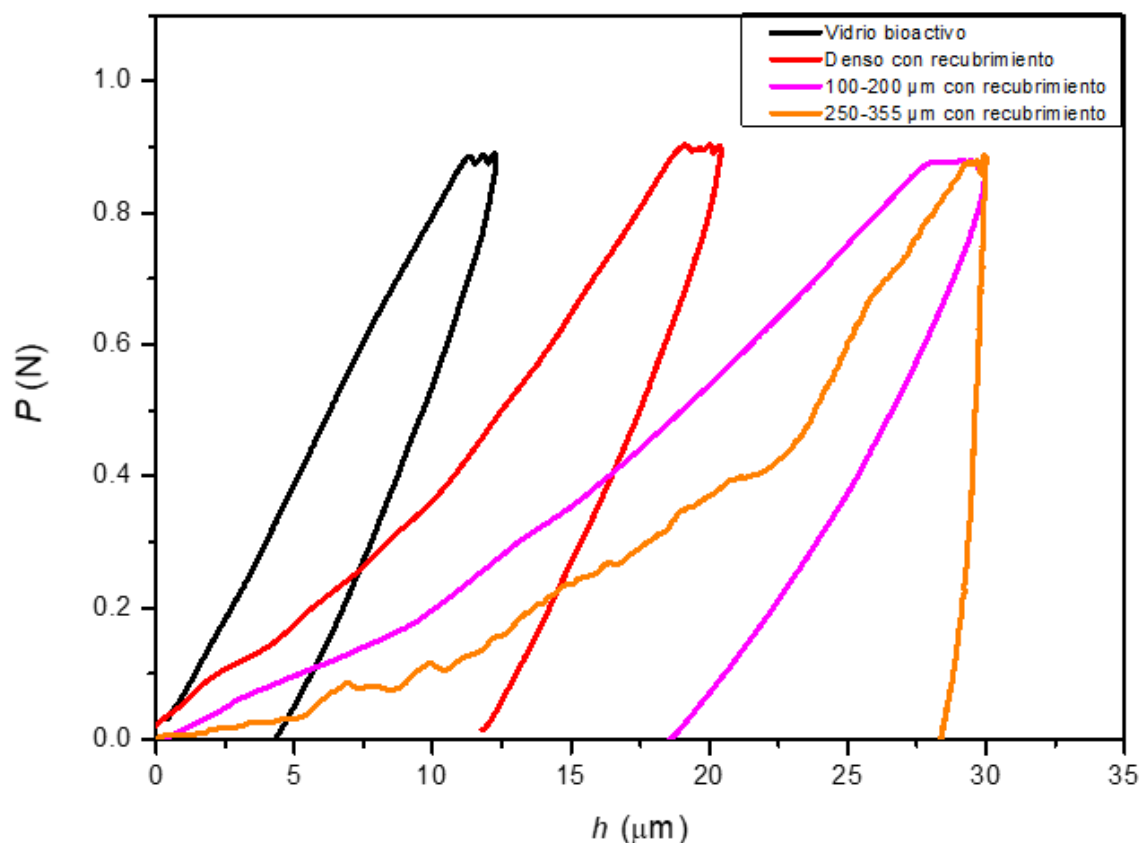


Figura 88. Carga aplicada frente a profundidad de penetración de una muestra de BG denso y de varios sistemas de sustrato de titanio–recubrimiento con 3 capas de BG. Influencia del tipo de sustrato en las gráficas P-h.

La Figura 88 muestra una curva más abrupta para el sustrato poroso de 250-355 μm recubierto, así como una recuperación elástica menor y una penetración máxima similar al poroso de menor rango de tamaño de espaciador. En este contexto, el vidrio limita el comportamiento micro-mecánico de este sistema, mientras que para la muestra densa y porosa de 100-200 μm, es la matriz de titanio. De la misma forma, los resultados obtenidos tras el análisis de las curvas (Figura 88) se recopilan en la Tabla 36.

Capítulo 3

Tabla 36. Parámetros principales de las curvas P-h del ensayo de micro-indentación instrumentada, con carga máxima de 1 N, de una muestra de BG denso y diferentes sistemas recubrimiento de BG-sustrato de titanio (denso y porosos de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm), sin y con recubrimiento de BG: A (carga máxima del ensayo), B (penetración máxima), C (penetración permanente), B-A (fluencia o creep a carga constante), (B-C)/B (Recuperación elástica).

	A (μm)	B (μm)	C (μm)	B-A (μm)	(B-C)/B (%)
BG	11.3	12.2	4.3	0.9	65.0
Denso recubierto	19.1	20.4	11.8	1.2	42.2
Poroso 100-200 μm recubierto	27.4	30.0	18.6	2.5	38.0
Poroso 250-355 μm recubierto	29.2	29.8	28.3	0.6	4.8

Los resultados tras el ensayo de micro-indentación instrumentada presentan valores de 11.3 μm (A), 12.2 μm (B) y 4.3 μm (C) para el compacto denso de BG. Asimismo, los valores alcanzados para el sustrato denso con recubrimiento de 3 capas de BG, son de 19.1 μm (A), 20.4 μm (B), y 11.8 μm (C), respectivamente. Por su parte, los niveles obtenidos para los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm , tras depositar 3 capas de BG sobre ellos, presentan valores de 27.4 y 29.2 μm (A), 30.0 y 29.8 μm (B), y 18.6 y 28.3 μm (C), respectivamente.

En cuanto a los resultados de fluencia y recuperación elástica, se alcanzan medidas de 0.9 μm y 65.0 % para el compacto denso de BG, y de 1.2 μm y 42.2 % para el sustrato denso con recubrimiento. En cuanto a los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm una vez se ha depositado el recubrimiento, los resultados son de 2.5 y 0.6 μm para la fluencia, así como de 38.0 y 4.8 % para la recuperación elástica, respectivamente.

El comportamiento tribológico de los sustratos recubiertos permitió el estudio de la integridad del recubrimiento de BG sobre el sistema. Para ello, se realizaron ensayos de rayado, a carga constante de 3 N, sobre las muestras recubiertas con BG, evaluando así la combinación recubrimiento-sustrato de titanio. Las condiciones de este ensayo fueron elegidas por las mismas razones explicadas en el apartado anterior. Al igual que para los sistemas recubiertos con HA, no

fue posible la realización del ensayo de desgaste, debido al riesgo de desprendimiento del recubrimiento por una adhesión deficiente.

La Figura 89 muestra el perfil topográfico del recubrimiento en la etapa de pre-palpación, así como el perfil del surco una vez realizado el ensayo de rayado para los sustratos denso y poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, recubiertos con 3 capas de BG. Cabe destacar que, tras observar los resultados anteriores, sólo se ha analizado la muestra de 100-200 debido a su mejor comportamiento en el ensayo de microdureza instrumentada y debido a una mayor homogeneidad en el recubrimiento.

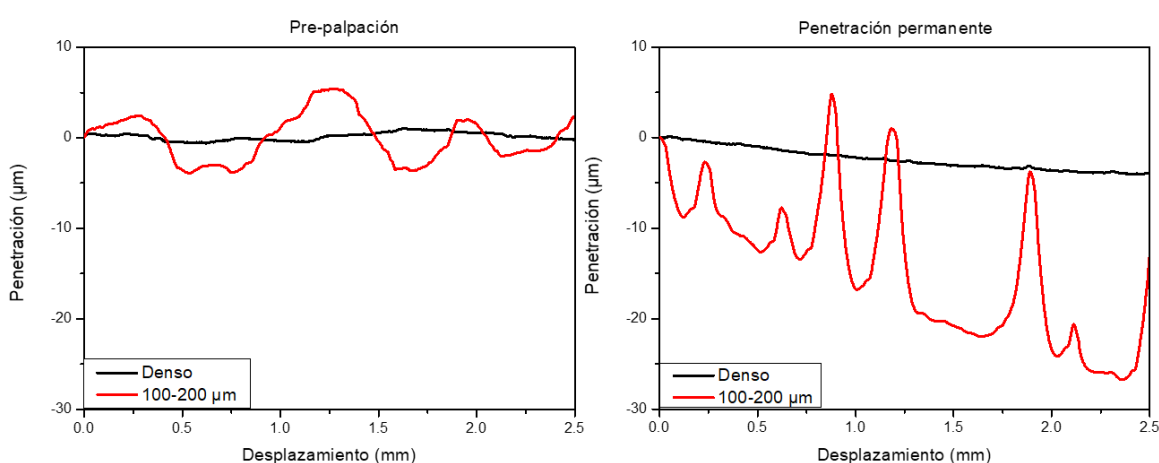


Figura 89. Perfil topográfico de los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).

La etapa de pre-palpación revela una topografía homogénea para el sustrato denso, mientras que para el poroso recubierto de 100-200 μm muestra ciertas irregularidades, pudiendo ser los poros recubiertos. En cuanto a la etapa de post-palpación, la penetración disminuye, aunque de manera distinta, en ambos casos. Para el denso, lo hace de forma leve, mostrando una gran diferencia de altura y amplias oscilaciones para el poroso. En ambos casos, se debe al arrastre del recubrimiento por el indentador. Los parámetros de rugosidad 2D obtenidos a partir de dichos perfiles topográficos (Figura 89) para ambos sustratos recubiertos con 3 capas de BG se recogen en la Tabla 37.

Capítulo 3

Tabla 37. Parámetros de rugosidad de la topografía de los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo en la etapa de pre-palpación y tras el rayado (penetración permanente).

		R_a (μm)	R_q (μm)	R_z (μm)
Denso	Pre-palpación	0.4	0.5	1.8
	Penetración permanente	2.7	3.0	4.5
100-200 μm	Pre-palpación	2.2	2.6	9.3
	Penetración permanente	14.8	16.6	31.5

El sustrato denso recubierto con 3 capas de BG muestra valores de 0.4 y 2.7 μm para R_a en la etapa de pre-palpación y en la de penetración permanente, respectivamente. De manera similar, se obtiene un R_q de 0.5 y 3.0 μm , y un R_z de 1.8 y 4.5 μm , respectivamente. Por el contrario, el sustrato poroso de 100-200 con el recubrimiento de 3 capas de BG presenta valores mayores que el denso. En este caso, se revela un R_a de 2.2 y de 14.8 μm en las etapas de pre-palpación y de penetración permanente, respectivamente, siendo de 2.6 y 16.6 μm para R_q en las correspondientes etapas y de 9.3 y 31.5 μm para R_z , respectivamente.

La recuperación elástica experimentada por los sistemas de recubrimiento con BG (3 capas)–sustrato de titanio (denso y poroso de tamaño de espaciador 100-200 μm) se grafican en la Figura 90.

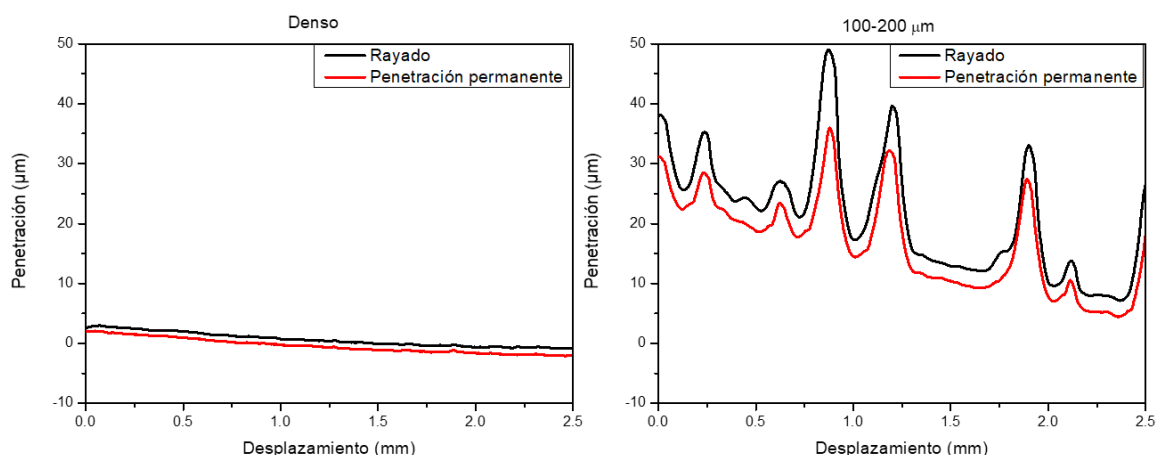


Figura 90. Recuperación elástica de los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo durante y tras el rayado (penetración permanente).

Las gráficas muestran una recuperación elástica mayor para el sustrato poroso de menor rango de tamaño de espaciador recubierto que para el denso, presentando grandes oscilaciones que podrían estar relacionadas con la presencia de poros. Por su parte, los valores obtenidos para la recuperación elástica de los sistemas recubrimiento de BG–sustrato de titanio tras el análisis del ensayo de rayado se recopilan en la Tabla 38.

Tabla 38. V_m , RE, Máx y Mín, y Δ máx y Δ mín de los valores máximo y mínimo de penetración para los sustratos denso y poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm recubiertos con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo durante y tras el rayado (penetración permanente).

		V_m (µm)	RE (µm)	Máx (µm)	Mín (µm)	Δ máx (µm)	Δ mín (µm)
Densa	Rayado	0.4	1.1	3.0	-1.4	5.4	3.5
	Penetración permanente	-0.7		2.1	-2.5		
100-200 µm	Rayado	21.1	4.6	49.0	7.1	44.6	28.9
	Penetración permanente	16.5		36.0	4.4		

Tras el ensayo de rayado de los sustratos recubiertos, denso y poroso de menor rango de tamaño de partícula de espaciador, se obtienen valores medios de penetración (V_m) de 0.4 y 21.1 µm para la etapa de rayado, respectivamente, así como de -0.7 y 16.5 µm para la etapa de post-palpación (penetración

Capítulo 3

permanente). En este contexto, se observa una recuperación elástica (*RE*) para el sustrato denso recubierto de 1.1 μm , mientras que para el poroso recubierto se obtiene un valor de 4.6 μm . Por su parte, la penetración mínima (*Mín*) en la etapa de rayado presenta niveles de -1.4 y 7.1 μm , para los sustratos denso y poroso tras ser recubiertos, respectivamente, mientras que la penetración máxima (*Máx*) revela medidas de 3.0 y 49.0 μm . Asimismo, la penetración permanente muestra valores de penetración mínima (*Mín*) de -2.5 y 4.4, siendo la penetración máxima (*Máx*) de 2.1 y 36.0 μm . Por tanto, la diferencia mínima ($\Delta \text{mín}$) para ambos tipos de sustrato (recubiertos denso y poroso), resulta ser de 3.5 y de 28.9 μm , respectivamente. De igual forma, la diferencia máxima ($\Delta \text{máx}$) obtenida es de 5.4 y 44.6 μm .

Evaluación del comportamiento In vitro: Bioactividad del recubrimiento de BG en SBF e influencia del número de capas de BG

Una vez los sustratos recubiertos con BG se han caracterizado morfológica y topográficamente, así como se ha evaluado su comportamiento micro-mecánico y tribológico, se requiere el estudio del comportamiento en el cuerpo humano. Una de las vías propuestas en la literatura, contemplada en la presente Tesis Doctoral, se basa en evaluar la bioactividad mediante la formación de apatita similar al hueso en la superficie de los sustratos. Este método *in vitro*, propuesto por T. Kokubo [165, 199], consiste en la inmersión del material en una solución que contiene una concentración de iones cercana a la del plasma sanguíneo humano. Dicha solución es conocida como SBF (*simulated body fluid*).

El vidrio bioactivo, al ser sumergido en esta solución durante un periodo de tiempo, disuelve iones de Ca, P y Si, teniendo estos un papel muy importante en la formación de la capa de hidroxiapatita, afectando de forma directa a las células osteogénicas y a la vascularización, pudiendo determinar así la velocidad de formación ósea [113].

Como se ha expuesto anteriormente, los sustratos recubiertos con BG son sumergidos en SBF durante 21 días a una temperatura de 37 °C, siendo el fluido renovado a los 14 días, ya que la concentración de cationes de la solución disminuye con la formación de HA. Transcurridos los 21 días, se lleva a cabo la caracterización de la HA depositada en los sustratos recubiertos con BG.

En la Figura 91 se presentan los espectros de EDX de las muestras densa y porosa de titanio con tamaño de espaciador 100-200 μm , después de haber sido sumergidas durante 21 días en SBF. La concentración de estos elementos se manifiesta en los espectros referentes a las muestras densa y porosa de 100-200 μm , ambas recubiertas con 3 capas, alcanzando unos niveles de Ca/P de 1.58 y 1.56, respectivamente. Para el cálculo de dicha relación se tomaron 3 medidas, con un error relativo entre el 1 y 3%. Tras observar los resultados anteriores, sólo se ha analizado la muestra de 100-200 debido a su mejor comportamiento en el ensayo de microdureza instrumentada y debido a una mayor homogeneidad en el recubrimiento.

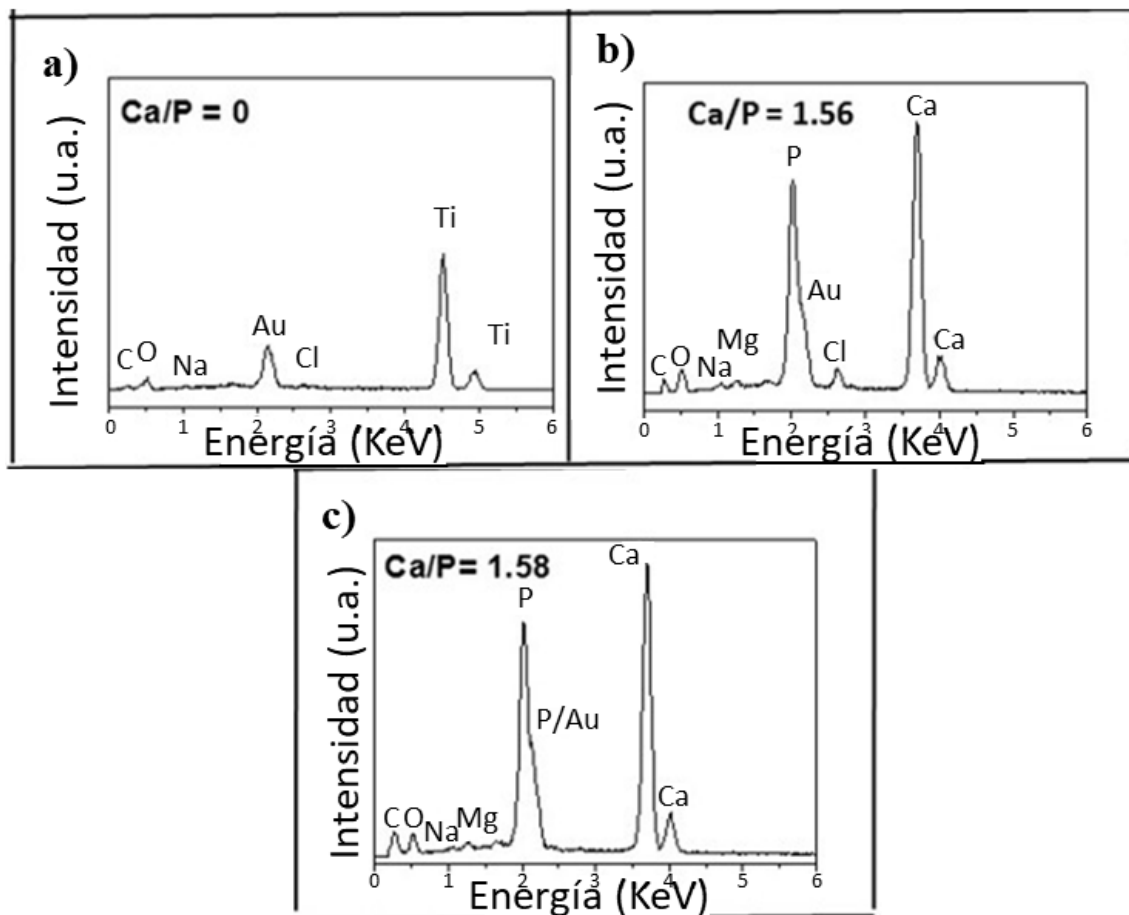


Figura 91. Espectros de EDX de la HA sobre el recubrimiento de BG y relación correspondiente Ca/P de los sustratos poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , recubiertos con a) 1 y b) 3 capas de BG, y c) denso recubierto con 3 capas de BG mediante la técnica de goteo respectivamente, tras ser sumergidos en SBF durante 21 días.

Capítulo 3

Los resultados de microanálisis por espectrometría de emisión atómica mediante plasma (ICP) evidencian la influencia de los poros, así como del número de capas en la formación de HA (Tabla 39).

Tabla 39. Concentraciones de los iones principales en la solución de referencia de SBF y en las soluciones correspondientes a las muestras de titanio densa de 3 capas y porosa de 100-200 μm con 1 capa y 3 capas de BG depositado mediante la técnica de goteo, tras su inmersión durante 21 días, analizadas por ICP.

Elemento (mg/ml)	Solución de SBF	21 días sumergidas en SBF		
		Sustrato denso 3 capas de BG	Sustrato poroso 100-200 μm	
			1 capa de BG	3 capas de BG
Ca	69.5	61.6	70.8	61.0
P	29.2	26.7	29.9	24.7
Si	0.2	2.7	2.0	6.1
Ti	≤ 0.003	≤ 0.003	≤ 0.003	≤ 0.003

La Tabla 39 presenta unos niveles de concentración de Ca de 61.6 y 61.0 mg/ml para los sustratos denso y poroso de 100-200 μm , ambos recubiertos con 3 capas de BG. Dichos valores son menores que la concentración inicial de la solución de SBF (69.5 mg/ml). Sin embargo, para el sustrato poroso recubierto con sólo 1 capa de BG, la concentración obtenida es ligeramente superior, de un valor de 70.8 mg/ml. Por su parte, las concentraciones de P para las muestras de 3 capas de BG son de 26.7 mg/ml (denso) y de 24.7 mg/ml (poroso de 100-200 μm), mientras que para la porosa de 1 capa de BG de recubrimiento es de 29.9 mg/ml. Asimismo, las concentraciones de Si rozan valores similares para el denso recubierto con 3 capas (2.7 mg/ml) y para el poroso recubierto con 1 capa (2.0 mg/ml). Por el contrario, esta concentración se presenta mucho más elevada para la muestra porosa de 3 capas de recubrimiento de BG (6.1 mg/ml). Finalmente, para todos los sustratos estudiados, las concentraciones de Ti en la solución resultan ser menores de 0.003 (niveles no apreciables).

La Figura 92 muestra los difractogramas de XRD de los sustratos de titanio denso, con 3 capa de BG, y poroso con tamaño de espaciador 100-200 μm , recubiertos con 1 y 3 capas, todos ellos tras ser sumergidos en SBF durante 21 días. En todas las muestras, se observa la presencia de anatasa y rutilo, óxidos

característicos del titanio. Sin embargo, la presencia de HA sólo se manifiesta para los sustratos denso y poroso recubiertos con 3 capas de BG.

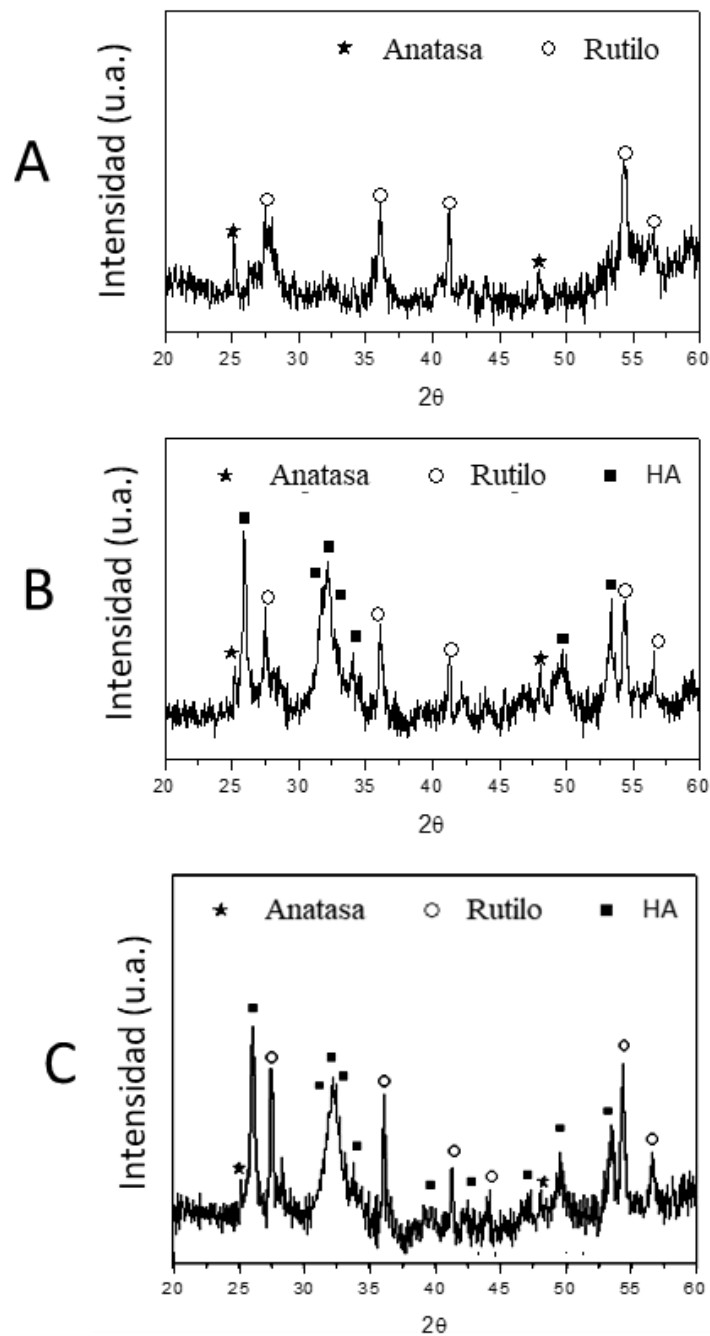


Figura 92. Difractogramas de: A. sustrato poroso de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador, recubierta con 1 capa de BG y tras la inmersión durante 21 días en SBF, B. sustrato poroso de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador, recubierto con 3 capas de BG y tras la inmersión durante 21 días en SBF; C sustrato denso, recubierto con 3 capas de BG y tras la inmersión durante 21 días en SBF.

Capítulo 3

La Figura 93 muestra las micrografías SEM de la HA formada sobre el recubrimiento tras 21 días de inmersión en SBF de las muestras densa y porosa de titanio con tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm , para 1 (izquierda) y 3 (derecha) capas de BG. Se observa la formación de HA precipitada sobre los sustratos recubiertos con 3 capas, de morfología característica y claramente diferenciable de las partículas de BG depositado (recubrimiento de 1 capa).

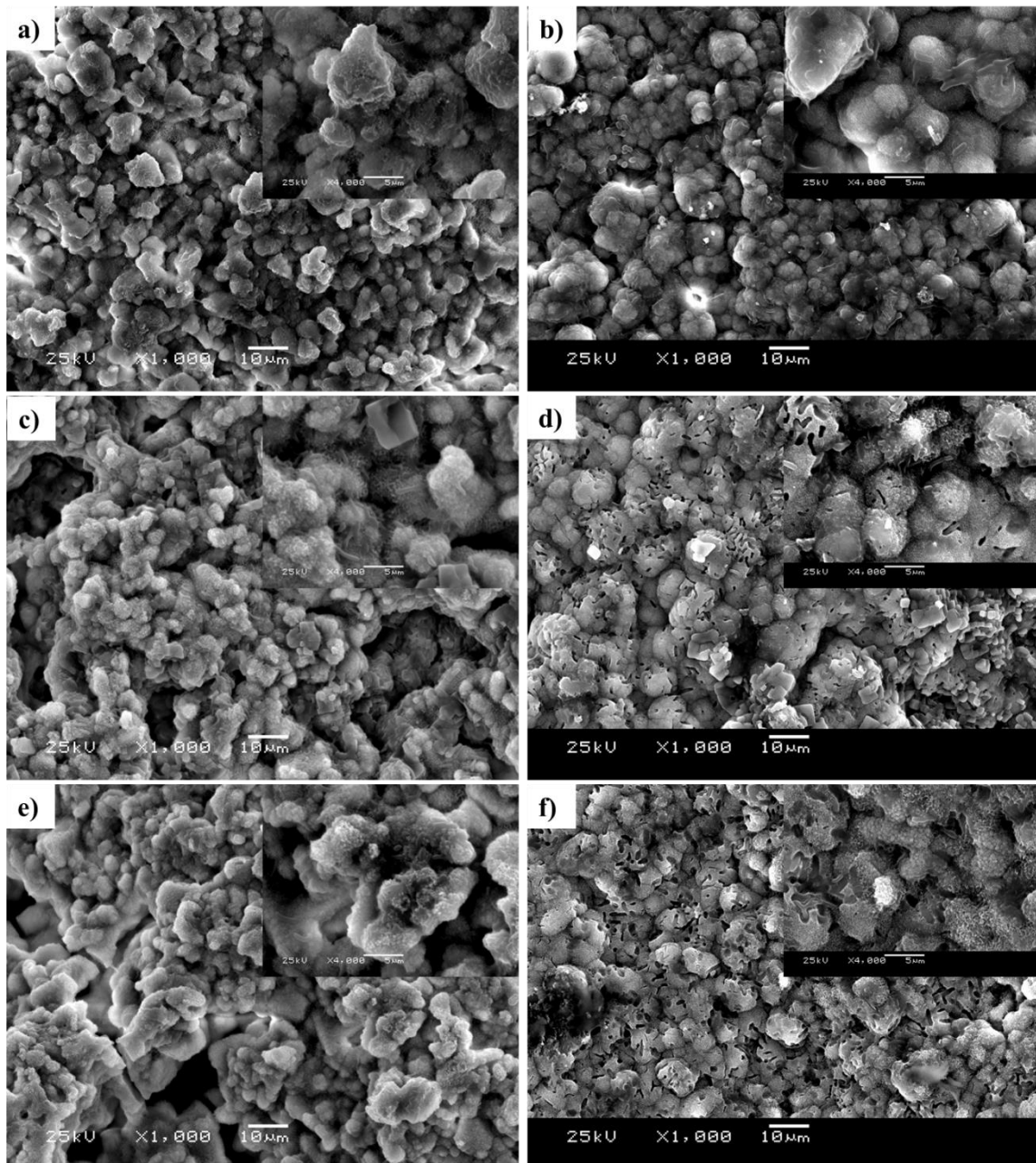


Figura 93. Micrografías de la HA formada tras 21 días en SBF sobre los sustratos recubiertos con 1 capa de BG: a) denso, c) 100-200 μm ; e) 250-355 μm . Con 3 capas de BG: b) denso, d) 100-200 μm y f) 250-355 μm .

3.2.3 Recubrimiento antibacteriano (SPEEK) de los sustratos porosos

La Figura 94 presenta la mejora de la osteointegración del titanio en cuanto a prevención de posibles infecciones, correspondiente a la deposición de un recubrimiento antibacteriano consistente en un polímero sulfonado (poli-éter-éter-cetona sulfonada, SPEEK). El recubrimiento fue depositado por inmersión de los sustratos (*dip-coating*) en la solución polimérica, siendo sumergido y extraído de la misma con una velocidad controlada. Posteriormente, se procedió al secado del polímero en una estufa durante 3-4 h a 200-250 °C. En el esquema se muestran la caracterización realizada al recubrimiento.

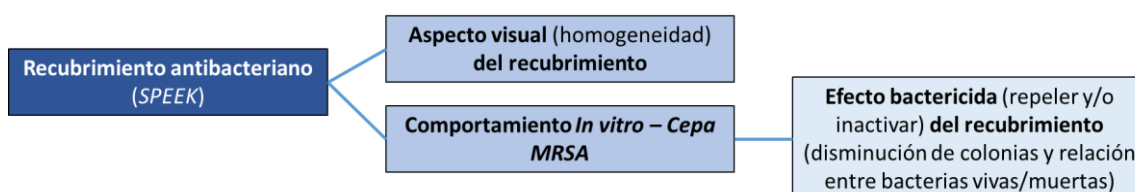


Figura 94. Extracto del esquema de la Figura 27. Etapas seguidas para la mejora de la osteointegración por la vía de recubrimientos antibacterianos.

Estudio de la proliferación de MRSA sobre los sustratos recubiertos: mejora del comportamiento bactericida

En primer lugar, se hace necesario el estudio de la topografía del recubrimiento una vez ha sido depositado, con el fin de evaluar la homogeneidad y la adhesión al sustrato de éste. En este sentido, la Figura 95 presenta las imágenes SEM de los sustratos de titanio denso y poroso de 100-200 µm de tamaño de partícula de espaciador una vez fueron recubiertos mediante SPEEK.

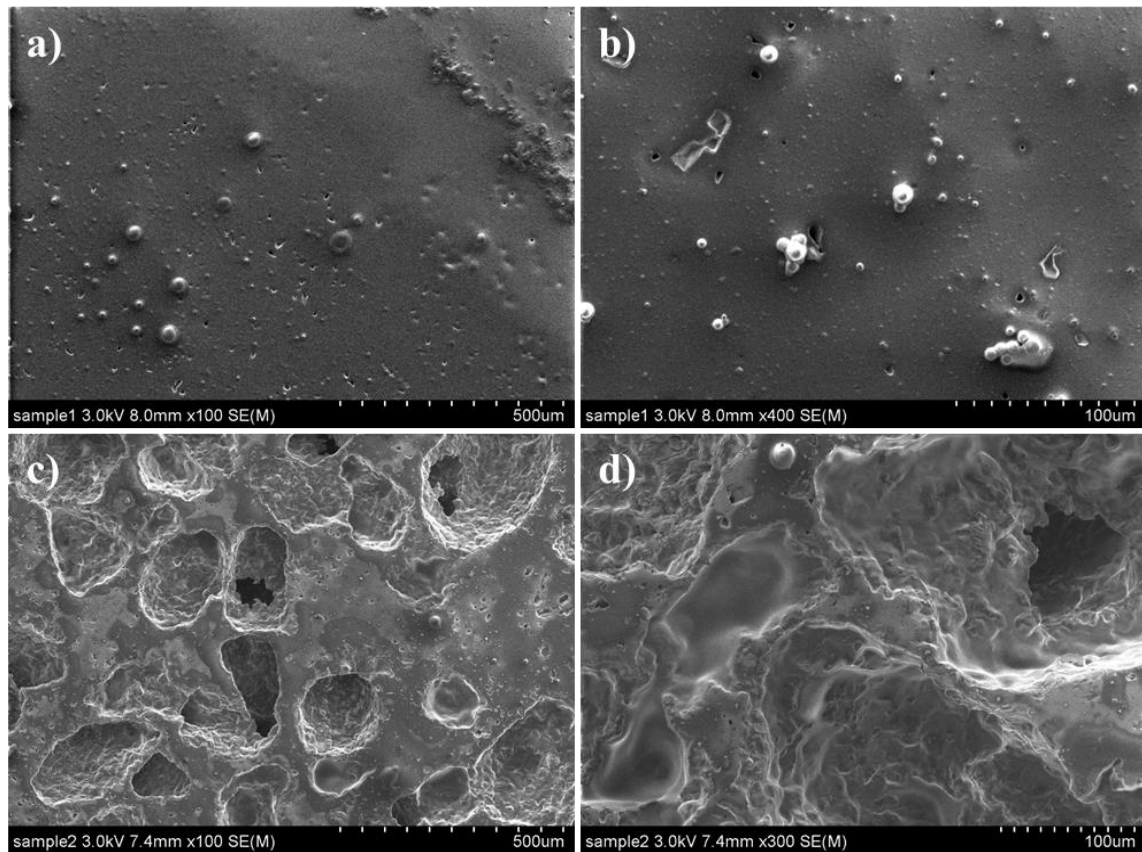


Figura 95. Micrografías SEM de la topografía de los sustratos de titanio: a) y b) denso y c) y d) con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm.

La Figura 95 muestra, para el sustrato denso sobre el que se ha depositado SPEEK, que el recubrimiento no se encuentra completamente adherido a la matriz de titanio, debido a la existencia de ciertas burbujas sobre la superficie. Por su parte, el sustrato poroso de 100-200 µm de rango de tamaño de partícula de espaciador, a pesar de revelar alguna burbuja, presenta un recubrimiento que se adhiere algo mejor a la superficie, introduciéndose en el interior de los poros y replicando la topografía.

Tras la evaluación mediante SEM del recubrimiento, se procedió al estudio de la capacidad antibacteriana. Al igual que para los sustratos vírgenes, se realizó un cultivo de la cepa MRSA sobre los sustratos recubiertos con el fin de analizar la habilidad bactericida del PEEK sulfonado como recubrimiento. El protocolo seguido fue el mismo que para las muestras sin recubrir, correspondiente al método 2. La Figura 96 muestra las macrografías de los resultados de proliferación de MRSA sobre los sustratos de titanio recubiertos por SPEEK.

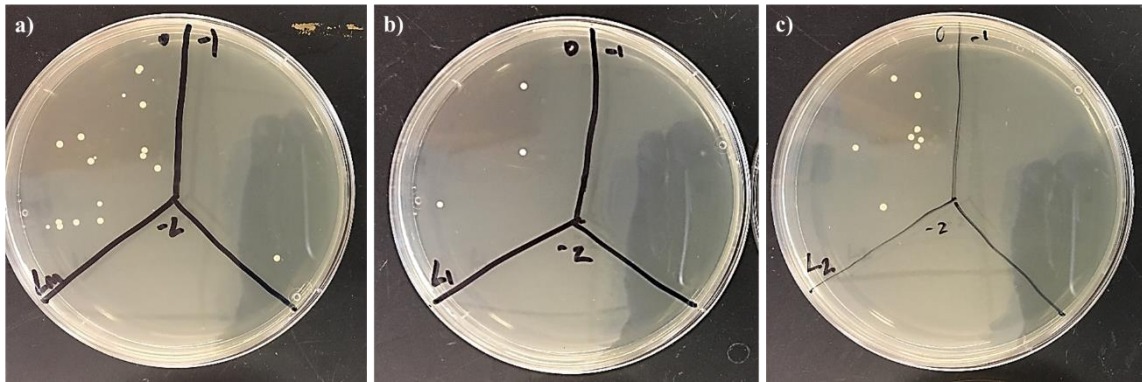


Figura 96. Macrografías de la proliferación de MRSA sobre los sustratos de titanio: a) denso y porosos de b) 100-200 μm y c) 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador recubiertos con SPEEK.

Las macrografías de la proliferación de MRSA sobre los sustratos de titanio (denso y porosos de ambos rangos de tamaño de espaciador) manifiestan la inhibición del crecimiento bacteriano sobre los mismos, destacando especialmente en las diluciones -1 y -2, donde no se aprecia existencia de colonias.

Capítulo 4: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Capítulo 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Caracterización y validación de los sustratos de Titanio poroso fabricados por pulvimetalurgia para solventar el apantallamiento de tensiones

La necesidad de empleo de sustratos de titanio poroso ha sido puesta de manifiesto para contrarrestar el apantallamiento de tensiones y facilitar la integración más rápida y eficiente entre hueso y el implante. Por ello, una caracterización completa de la porosidad ha sido necesaria y permitido establecer posibles relaciones con las modificaciones superficiales estudiadas y su efecto en la mejora del comportamiento biológico que se persigue en esta investigación.

La determinación de la porosidad y características de los poros se ha realizado mediante diversas técnicas, lo que deberá ser tenido en cuenta en las comparaciones que se realicen, y en su caso, determinar la fiabilidad según para que características.

La porosidad que resulta tras el procesado de consolidación de los sustratos porosos, bien mediante PM convencional o con la técnica de espaciadores, es consecuencia de la etapa de prensado mecánico en frío y de la subsiguiente sinterización. Estudios contemplados en la literatura [252] sobre materiales

Capítulo 4

obtenidos mediante PM convencional han demostrado no sólo la existencia de dicha porosidad tras el prensado, sino también la carencia de homogeneidad en la distribución de la porosidad tras el prensado mecánico de polvos en un molde o matriz. Igualmente, de estudios previos en el Grupo de investigación, se ha comprobado que tras la sinterización existe una variación de la porosidad a lo largo de la muestra [36]. El hecho que la densidad sea mayor en la parte superior de las probetas (zona sobre la que se ha aplicado la carga a través del punzón) se debe a la distribución no ideal de la presión de compactación teórica, siguiendo el principio de Pascal, durante el prensado mecánico en frío bajo una carga uniaxial, debido al rozamiento entre las partículas, así como al que origina la presión radial sobre las paredes de la matriz.

Adicionalmente, se observa que, entre las muestras porosas, a menor tamaño de partícula de espaciador, mayor densidad relativa en verde presentan los sustratos. Esto hace que para el mayor tamaño de espaciador (250-355 μm) se alcance un 82.4% de densidad relativa en verde para 800 MPa, mientras que para el sustrato poroso de 100-200 μm , el valor de densidad relativa en verde resultó ser de 83.4%, ligeramente superior al sustrato poroso de mayor tamaño de rango de partícula de espaciador. La densidad relativa del sustrato denso en verde alcanza valores superiores a las análogas porosas, aunque sin alcanzar nunca el 100 % de la densidad en verde (Figura 29). Este hecho manifiesta la existencia de una cierta porosidad tras el prensado que, en el caso más favorable de la PM convencional, incluso tras el sinterizado, va a quedar una cierta porosidad residual, que se considera inherente al proceso de fabricación PM convencional, como se ha puesto de manifiesto (Figura 30). Por tanto, en las micrografías de microscopía óptica de las muestras porosas fabricadas, se distinguen dos tipos de porosidad: (i) porosidad gruesa, debida a la existencia pasada de espaciadores, y (ii) porosidad más fina, inherente al propio proceso PM.

El método de Arquímedes permite diferenciar aún más, y cuantificar, los tipos de porosidad anteriormente descritos, por lo que su empleo en la caracterización de materiales porosos es de suma importancia, distinguiéndose, a su vez, tres tipos de

porosidad diferente: porosidad total (P_T), porosidad interconectada (P_i) y la porosidad cerrada o aislada (P_c), siendo P_T la suma de estas dos últimas. Mientras que P_c corresponde a poros inmersos y aislados en la propia matriz de titanio, la P_i se refiere a todos aquellos poros que quedan unidos entre sí y comunicados con la superficie de la muestra.

Adicionalmente, la Tabla 15 confirma la existencia de porosidad en la probeta densa (2.4 ± 0.2 % de P_T), mencionada anteriormente, como porosidad aislada e, incluso, interconectada. Esta porosidad total, como se glosó anteriormente, es inherente al proceso de fabricación PM convencional, ya que no es posible obtener el 100% de la densidad de la pieza tras las etapas de prensado y sinterizado de los polvos. La porosidad interconectada del sustrato denso puede ilustrarse como una fina capa en la superficie de la muestra que no es completamente densa, donde los poros están contacto con la misma debido a su cercanía. En cuanto a los resultados expuestos en la Tabla 15, se revela que la P_i (1.3 % para la muestra densa, y 43.7 % y 41.0 %, para los sustratos con espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente) es prácticamente igual al valor correspondiente de la P_T , siendo, por lo tanto, la P_c (1.1 % para el sustrato denso, y 2.2 % y 4.9% para los sustratos con espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente) una fracción pequeña de la misma. Una elevada porosidad interconectada, desde el punto de vista de la biofuncionalidad del material, facilita el paso de fluido fisiológico, así como en el caso de implantes, favorece el crecimiento del hueso hacia el interior del material (*bone in-growth*) [53,55].

El método de Arquímedes cuantifica el valor de porosidad de los sustratos obtenidos, en función de los tipos de porosidad mencionados. Sin embargo, no proporciona información acerca de las características morfológicas de los poros. El conocimiento de estas características resulta de interés en el estudio del comportamiento mecánico y biofuncional. Por ello, se hace necesario el uso de otras técnicas, como son el IA y micro-CT, ya que permiten el estudio de parámetros tales como D_{eq} y F_f para cada tipo de sustrato.

Capítulo 4

A partir de imágenes similares a la Figura 30, obtenida mediante OM para el estudio por IA, se puede obtener, igualmente, la P_T . Los valores obtenidos mostrados en la Tabla 16 (1.2, y 50.3 y 48.7%, para la muestra densa y las porosas con 100-200 y 250-355 de rango de tamaño de espaciador, respectivamente) resultan ser muy cercanos a los pretendidos en el diseño.

Esta técnica de caracterización se revela de mayor interés, debido a que añade a lo anterior evidencias de la existencia de las dos poblaciones distintas de poros ya referidas (fina y gruesa), y de su cuantificación, enriqueciendo a su vez los resultados de porosidad obtenidos por los métodos anteriormente empleados. En el caso de la muestra densa, dicho estudio se focaliza en la porosidad inherente al proceso de fabricación de los sustratos (PM convencional), mientras que para la muestra porosa de 100-200 μm , la distribución de tamaños de poro corresponde a la totalidad de poros del sustrato, es decir, incluye los inherentes al proceso de fabricación (PM convencional) y a los generados por la técnica de espaciadores.

Así, la porosidad después del sinterizado, en todos los sustratos (Tabla 16), está formada por una porosidad más fina generada por el proceso de fabricación PM, con un porcentaje en volumen del 1.2%, D_{eq} del orden de 6 μm , y morfología casi circular ($F_f \sim 1$). La distribución del tamaño equivalente de los poros, D_{eq} , es muy estrecha en torno al valor medio (Figura 31). Para el caso del sustrato poroso de rango de tamaño de poro de 250-355 μm , los resultados fueron similares al de la muestra porosa de menor rango (100-200 μm), mostrando la existencia de una porosidad inherente al proceso de fabricación (correspondientes a $D_{eq} < 50 \mu\text{m}$).

Cabe destacar que tanto visualmente como cuantitativamente, en ambos sustratos porosos, y en el denso, la morfología y el tamaño de dichos poros inherentes al proceso de fabricación son similares. Este hecho está relacionado con el proceso de fabricación de sustratos, es decir, con el PM convencional, e induce a pensar que la porosidad generada por el proceso de fabricación, dada la pequeña proporción y diámetro medio de estos poros, no será determinante en el estudio del comportamiento mecánico, así como del biológico, al comparar los tipos de sustratos analizados.

Al mismo tiempo, en las muestras porosas, los poros generados por el espaciador muestran un D_{eq} medio de 161.1 μm y 261.5 μm , comprendido en el rango de tamaños de partícula de espaciador estudiados, 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente (Tabla 16). Hay que mencionar que el cálculo del valor medio de D_{eq} se ha realizado separando ambas poblaciones de poros (generados por el proceso de fabricación y por el espaciador). Por lo tanto, los datos de las muestras porosas recogidos en esta tabla corresponden únicamente a la porosidad generada por el espaciador. Asimismo, la distribución de los valores de D_{eq} (Figura 31) tiene alrededor del 60% de las frecuencias de los tamaños de D_{eq} en el rango del espaciador (100-200 μm). Estos poros con tamaños similares al del espaciador de 100-200 μm provendrían de poros directamente originados por partículas individuales de espaciador, mientras los mayores que éstos se habrían originado por la yuxtaposición de poros, principalmente durante la etapa prensado.

Sin embargo, la morfología de los poros generados por el espaciador está más alejada de la forma circular ($F_f \sim 0.7$). Este resultado permite establecer que la porosidad con esta morfología disminuirá las propiedades mecánicas de los sustratos, no sólo por la proporción de porosidad, sino también por dicha morfología. Es bien conocido que mientras F_f es más próximo a 1, menor es el valor del concentrador de tensiones y mejor comportamiento mecánico y a fatiga presentará el material. Estos mismos resultados, con su consecuente análisis, se observaron para la muestra de mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm).

La técnica de caracterización de micro-CT proporciona, de igual forma, información de la P_T , del D_{eq} y de otros parámetros agregados de las muestras porosas (Tabla 17). El objetivo principal de esta técnica ha sido la caracterización de la porosidad generada por el espaciador, por lo que la muestra densa no fue objeto de estudio. Además, la limitación de detección de la técnica micro-CT empleada se encuentra en 7 μm , con un porcentaje de error considerable, justamente en el rango de tamaños de la porosidad final inherente al PM convencional.

Los valores de P_T (%), 49.8 y 40.8%, de las muestras con rango del tamaño de espaciador 100-200 y 255-350 μm , respectivamente, son similares a la P_T de diseño

Capítulo 4

(50%) para el rango de tamaño de 100-200 μm , si bien, los de muestra 255-350 μm se alejan de éste. Por su parte, el D_{eq} medio es de 172.6 y 240.3 μm para las muestras con rango de tamaño de espaciador de 100-200 y 255-350, respectivamente, que se aproxima a los valores correspondientes obtenidos por otras técnicas anteriores. Adicionalmente, la micro-CT nos proporciona un parámetro de rugosidad no normalizado, evaluado como superficie por unidad de volumen Rug_{sup} (mm^2/mm^3), que no puede ser empleado para compararlo con los parámetros normalizados de rugosidad, pero que sí servirán para hacer estimaciones de área efectiva de contacto en el estudio del comportamiento biológico.

La Figura 32 muestra la distribución de la fracción volumétrica de los poros con respecto a D_{eq} para ambos tipos de sustrato poroso. Estos resultados son algo diferentes a los obtenidos por las otras técnicas de caracterización estudiadas. A la vista de éstos, la distribución en ambos sustratos porosos se aproxima a la de una distribución normal o campana de Gauss. Se trata de dos curvas relativamente similares teniendo en cuenta su FWHM y desviación típica, mostrando su principal diferencia en el valor medio, alrededor de 170 μm y 250 μm , valores comprendidos en el rango de tamaños de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , respectivamente, como era de esperar.

Adicionalmente, en la Figura 32, también es posible apreciar, de modo cualitativo, que hay una mayor similitud en el tamaño de los poros para el rango de tamaños de partícula de espaciador de 100-200 μm .

Comparando los parámetros analizados por las diferentes técnicas de caracterización de la porosidad empleadas (Tabla 40), se observa una P_T cercana al diseño (50%) para las muestras porosas y un D_{eq} medio de poro dentro de los rangos esperados, con ligeras variaciones de unas técnicas de caracterización a otras. Entre ellos, los datos obtenidos por IA resultan ser mayores que para el resto de las técnicas. Esto podría deberse a que realmente esta técnica se realiza por superficie del sustrato y no volumétricamente.

Tabla 40. Comparación de porosidades y morfología de los poros tras el proceso de sinterizado a partir de las distintas técnicas de caracterización microestructural utilizadas

	Arquímedes		IA		Micro-CT	
	P_T (%)	P_i (%)	P_T (%)	D_{eq} (μm)	P_T (%)	D_{eq} (μm)
Densa	2.4 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	5.5 ± 0.2	-	-
100-200 μm	45.9 ± 0.6	43.7 ± 0.8	50.3 ± 1.3	161.1 ± 28.5	49.8 ± 11.4	172.6 ± 6.4
250-355 μm	45.9 ± 0.2	41.0 ± 0.1	48.7 ± 1.9	261.5 ± 9.0	40.8 ± 11.4	240.3 ± 6.4

En cuanto al resto de técnicas de caracterización, cabe destacar que realizan un análisis volumétrico en la obtención de resultados. Mientras que el método de Arquímedes estudia el volumen total de la muestra, la técnica de micro-CT tan sólo toma como volumen de control una pequeña rebanada de la probeta, extrapolando así el resultado a la totalidad de ésta. Por tanto, si bien esta técnica de caracterización permite obtener una gran variedad de información, resulta más preciso y próximo a la realidad el método de Arquímedes en cuanto a P_T se refiere.

En general, las porosidades de la muestra de mayor rango de tamaño de poro son ligeramente menores que para la muestra de rango de tamaño de 100-200 μm . La razón podría estribar en que, durante el sinterizado, los sustratos de tamaño 250-355 μm experimentan unas contracciones mayores en torno a los poros, como se ha explicado anteriormente. Este hecho se pone de manifiesto en los resultados del D_{eq} obtenido por IA y micro-CT (Tabla 40), más cercano en todas las técnicas empleadas al extremo inferior del rango de tamaño (261.5 y 240.3 μm para IA y micro-CT, respectivamente).

Para el caso del sustrato de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, todas las técnicas empleadas mostraron valores más cercanos a los de diseño (Tabla 40), mostrando un D_{eq} comprendido entre los tamaños establecidos por el espaciador tanto para IA como para micro-CT (161.1 y 172.6 μm respectivamente). En cuanto a la P_T , los valores fueron, en todo caso, más cercanos al 50 % v/v, destacando el método de Arquímedes como el resultado obtenido más alejado (45.9 %).

Capítulo 4

Finalmente, destaca la presencia de una población de poros de alrededor de 5 μm de D_{eq} , detectable por todas las técnicas empleadas en el estudio de la muestra densa. Esta porosidad, es inherente al proceso de sinterizado en la fabricación de las muestras, encontrándose, por tanto, presente también en los sustratos porosos. A raíz de dicha afirmación, se establece la existencia de dos poblaciones de poros en las muestras porosas: una primera población generada en el proceso de fabricación, de tamaño fino, la cual no presentará influencias en cuanto a comportamiento mecánico y biofuncional; y una segunda población de mayores dimensiones, de tamaño grueso generada por las partículas de espaciador.

Los sustratos empleados, y en particular la modificación de su superficie, para mejorar el comportamiento biofuncional constituyen el objetivo principal de esta investigación. Por ello, una adecuada caracterización de la superficie de los sustratos porosos en estado virgen resulta de gran interés.

El IA, a partir de imágenes de la superficie plana y pulida de los sustratos mediante micrografías por OM, ha permitido obtener algunas características superficiales, quedando fuera del alcance de esta técnica el interior de los poros.

Los resultados obtenidos mediante IA, presentados anteriormente como características volumétricas del material, realmente han sido obtenidos a partir de micrografías superficiales que después son extendidas a características volumétricas. Por ello, estos resultados son realmente características de la superficie del material. Así, la P_T (%), D_{eq} medio y F_f medio (Tabla 16), referidas con anterioridad a la porosidad y sus poros, considerados en volumen, también se corresponden como valor a las mismas características referidas a la superficie del sustrato en su sección plana. Es decir, mientras antes la P_T (%), D_{eq} medio y F_f medio se ha referido a características volumétricas de la porosidad del material, en la superficie se refiere a la superficie plana correspondiente o una sección plana del material, resultando que antes se relacionaba como características de un poro equivalente a una esfera, ahora se relaciona con la sección plana de la sección de un poro equivalente a un círculo.

La microscopía SEM permite obtener imágenes a mayor magnificación que la OM, pero no sólo esto, sino que nos permite conocer la topografía, tanto de la propia superficie como de las paredes de los poros, gracias a la mayor profundidad de campo que posee. Por ello, su utilización en la caracterización de los sustratos porosos resulta de gran interés.

Las imágenes por microscopía SEM de las probetas porosas (Figura 33 a y b) muestran una distribución de porosidad homogénea, repartida a lo largo de toda la superficie, similar a la obtenida por MO, tras la preparación metalográfica hasta el pulido de ésta. La morfología de los poros, de modo cualitativo, es irregular y no tiene dirección preferente, observándose poros con diversas formas y profundidades. Con una magnificación intermedia (500X), en la Figura 97a se observa que la superficie del poro es rugosa. A mayores aumentos (4000X), en ambos sustratos (Figura 33 c y d), se aprecia en la superficie de los poros un cierto patrón de rugosidad consistente en unas estratificaciones o escalones que recorren su superficie, o que evocan lo que se conoce como curvas de nivel en un mapa geográfico. En la Figura 97 b, también se pueden observar dichos escalones con una morfología que recuerda a un teatro romano.

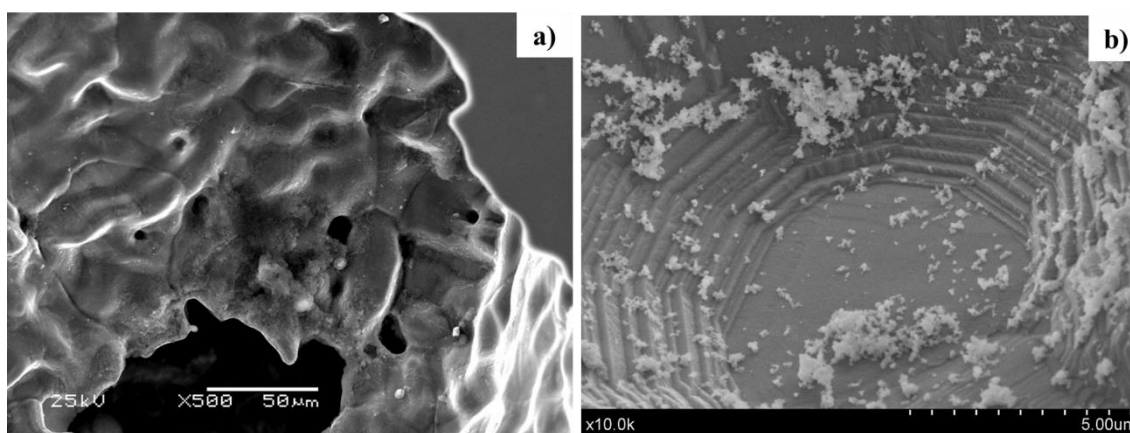


Figura 97. Micrografías SEM del sustrato de titanio poroso con tamaño de espaciador 100-200 μm : a) interior de un poro (500X), b) patrón de rugosidad del interior del poro (4000X).

La existencia de este patrón de rugosidad en las paredes de los poros requiere un estudio detallado de la topografía de los sustratos fabricados. Por ello, se hace

Capítulo 4

necesario el uso de otras técnicas de caracterización, tales como la Micro-CT y la microscopía confocal láser, de forma que la rugosidad inherente pueda ser cuantificada mediante ciertos parámetros.

Los sustratos, cuando son porosos, presentan un área de contacto con el medio (hueso, cultivos celulares, bacterias, etc.) mayor que los densos, ya que se ve incrementada por la superficie de los propios poros. Adicionalmente, esta área puede aumentar aún más como consecuencia de la rugosidad que puedan tener estos. Por ello, es muy importante conocer el alcance y magnitud de la superficie total.

La rugosidad relativa puede ser determinada mediante Micro-CT como describen Yin et Al [253], basada en la reconstrucción en 3D de los poros y la relación de su volumen con el volumen erosionado y suavizado de forma cuantitativa (Figura 98). La Rug_{vol} (%) y Rug_{sup} en mm^2/mm^3 (Tabla 17), son parámetros que están relacionados con el volumen del poro. Sin embargo, se trata de dos formas de expresar la rugosidad en la técnica de micro-CT.

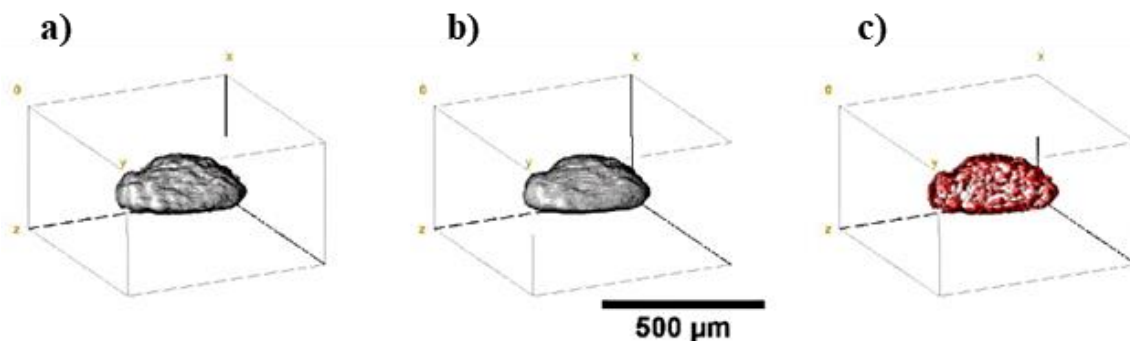


Figura 98. Reconstrucción 3D del volumen de un poro a partir del volumen erosionado y suavizado (escala común). a) volumen real del poro, reconstruido por triangulación, b) volumen suavizado con filtro gaussiano, c) diferencia de volúmenes anteriores.

Los valores de Rug_{sup} recogidos en la Tabla 41, junto con el resto de los parámetros que se encuentran en ella (AF, AP y AT), permiten establecer el área de contacto que realmente expone una superficie porosa. Con el fin de cuantificar y relativizar este efecto, en la Tabla 41 se presentan para cada material estudiado, los valores

referidos al área de contacto plana correspondiente. Considerando esta área como 100%, se ha evaluado el área relativa de los poros y el área total relativa, realmente expuesta al contacto.

Tabla 41. Área estimada (A_F , A_P y A_T) de los sustratos porosos a partir de los datos obtenidos por micro-CT.

	Rug_{sup}	A_F		A_P		A_T		Volumen
	mm^2/mm^3	mm^2	%	mm^2	%	mm^2	%	mm^3
Denso	-	107.7	100	-	-	107.7	100	-
100-200	17.3	54	100	321	494	375	594	18.6
250-355	10.7	59.9	100	260.2	334	320.1	434	24.3

De la Tabla 41 podemos extraer que la muestra densa, al considerarse que no tiene porosidad (sólo la inherente al propio proceso PM convencional), su área real de contacto resulta ser del 100% de área real de contacto. Por el contrario, los sustratos porosos exponen una superficie real de contacto mucho mayor. Así, el sustrato con tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm presenta una superficie total del 594%, tomando que la totalidad de su superficie plana (100%) estará en contacto con el medio. Igualmente, el sustrato con espaciadores de 250-355 μm presenta una superficie de contacto real de 434%, con relación a su respectiva área plana. Comparando los sustratos porosos, el de mayor tamaño de espaciador, relativamente, presenta una menor superficie real de contacto. Esto se explica debido a una menor relación superficie de poro a volumen, y se refuerza con el hecho de que los sustratos con rango de tamaño de espaciador 250-355 μm han resultado con una porosidad medida de 40.8% vs. 49.8% del sustrato de 100-200 μm (Tabla 17).

En cuanto a los resultados de la Figura 34, se obtiene la mayor frecuencia (1518) de para el 10.2 % de Rug_{vol} para el sustrato de 100-200 μm de tamaño de espaciador, y 6.6 % para la mayor frecuencia del sustrato poroso 250-355 μm (904), respectivamente. La dispersión para el primero es mucho mayor, con poros de un porcentaje de rugosidad volumétrica que varía desde un 5 a un 60%, siendo casi la mitad para el caso de 250-355 μm . La razón de esto se atribuye a una porosidad

Capítulo 4

muy dispersa, considerando que los valores más altos corresponden a la población de poros generados por el proceso de fabricación. Dichos poros poseen más superficie rugosa dividida por su propio volumen en comparación con los macroporos generados por las partículas de espaciador. Por tanto, cuanto más número de poros pequeños, más rugosidad por volumen se obtiene.

Por otra parte, las imágenes en 2½ D y 3D obtenidas por microscopía confocal láser (Figura 35 y Figura 36, respectivamente) confirman la topografía rugosa en el interior de los poros, mostrando la variación de profundidad de los mismos (ver escalas de colores). Se observa que la morfología de la superficie se presenta de forma irregular en el interior de las cavidades, mientras que en la parte plana y pulida se obtiene una superficie más fina y homogénea.

Atendiendo a los valores de rugosidad de la Tabla 19, se observa que la parte plana (sustrato denso y para ambos rangos de tamaño de partícula de espaciador) son del mismo orden ($S_a = 0.7$ a $5.0 \mu\text{m}$) y menores que los correspondientes a la parte porosa. Cabe destacar que los valores de S_z , son bastante superiores a S_a para la parte plana. La razón podría ser que, debido a que la zona plana está pulida, la muestra refleja de forma considerable, teniendo lugar una gran saturación a la hora de la toma de medidas.

En cuanto a la parte porosa, presenta una rugosidad de un orden superior ($S_a = 15.5$ a $30.8 \mu\text{m}$), como se ha observado previamente mediante Micro-CT. Sin embargo, al comparar ambas muestras porosas, resulta más rugoso el sustrato 100-200 μm de tamaño de espaciador, al contrario que en Micro-CT. Cabe decir aquí, que la P_T (%) es similar para ambos sustratos, datos diferentes a los de Micro-CT. Por otra parte, la tendencia entre sus valores de S_a y S_z es la misma, aunque la causa por la que S_z alcanza valores tan elevados es la adicional profundidad existente en los poros. Como cabe esperar, la parte plana presenta una rugosidad mucho menos acusada que la porosa en relación a los parámetros S_a y S_q , consecuencia del pulido mecano-químico de la superficie, el cual no llega al interior de los poros.

En general, los valores de rugosidad (S_a , S_q y S_z) del sustrato poroso de rango de tamaño de poro 250-355 μm son mayores que los de 100-200 μm en la parte porosa, siendo en plana más similares. La razón es que, a mayor tamaño, la cavidad penetra más hacia el interior del sustrato, implicando mayores diferencias de altura en el perfil topográfico. Este hecho repercutirá en la mayor o menor adhesión y proliferación celular, así como bacteriana, a dichas zonas, de forma que los microorganismos presentarán una mayor predilección para el área plana o porosa en función de la topografía del sustrato, entre otros parámetros.

Tras esta caracterización, se pone de manifiesto la necesidad de empleo de técnicas que sean complementarias. En este caso, unas técnicas han servido para corroborar los resultados de otras, así como para proporcionar información adicional con respecto a otros parámetros. En resumen, se requiere del empleo de más de una técnica de caracterización. Entre ellas, el método de Arquímedes resulta ser indispensable en cuanto al estudio de la mejora de la osteointegración, como consecuencia de ser una sencilla técnica que proporciona información de la porosidad interconectada (1.3, 43.7 y 41.0 % para los sustratos denso y porosos de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm , respectivamente). Por su parte, IA realiza el estudio de la superficie de los sustratos, permitiendo conocer parámetros relativos a la morfología de los poros (161.1 y 261.5 μm de D_{eq} para las muestras porosas de 100-200 y 250-355 μm , respectivamente), así como realizar el estudio de la porosidad inherente al proceso de sinterizado (1.2 % de porosidad con un D_{eq} de 5.5 μm). Con respecto a micro-CT, se complementa la información obtenida por las anteriores y se añade información relativa tanto a la distribución de la porosidad (porosidad total 49.8 y 40.8 % para los sustratos porosos de tamaño de espaciador 100-200 y 250-355 μm , respectivamente) como a la topografía del interior de los poros (área plana y porosa de 54 y 321 mm^2 (594%), y de 59.9 y 260.1 mm^2 (434%), para las muestras de menor y mayor rango de tamaño de partícula de espaciador, respectivamente).

En relación con el comportamiento mecánico de los sustratos, el estudio del módulo de Young por la técnica de ultrasonidos, así como el análisis de la curva tensión-

Capítulo 4

deformación proporcionan información acerca de las propiedades mecánicas del material en un estado dinámico y estático, respectivamente. De esta forma, permiten conocer los límites últimos del material antes de romperse. Este hecho es de suma importancia, ya que tanto el hueso como un implante, están sometidos a continuos esfuerzos de tracción y compresión que pueden llevarlos a condiciones límites.

La técnica de ultrasonidos y el ensayo de compresión uniaxial mostraron unos valores muy alejados para el Módulo de Young y límite de fluencia con respecto a los del hueso cortical para la muestra densa (Tabla 20), tal y como se esperaba. Dicha diferencia origina el fenómeno de apantallamiento de tensiones entre el hueso el titanio, como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, al introducir porosidad mediante la técnica de espaciadores, el módulo elástico disminuye hasta aproximarse al del tejido óseo, solventando dicho problema y validando la técnica de fabricación empleada. Sin embargo, también disminuye su límite de fluencia, debiendo de obtenerse un equilibrio entre ambos factores.

Al observar la gráfica correspondiente al ensayo de compresión uniaxial (Figura 37), la curva del mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm) no se estabiliza comparada con la de 100-200 μm , no mostrando una tendencia clara. Dicha curva queda por debajo de la correspondiente al menor tamaño de espaciador, corroborando que, a mayor tamaño de poro, disminuyen las propiedades mecánicas. Cada sección transversal de la matriz de titanio es única para una probeta cilíndrica durante el ensayo de compresión, produciéndose el colapso de la matriz en la zona que menos contenido de Ti posee.

Al comparar los resultados del módulo de Young por la técnica de ultrasonidos con el valor E de la norma convencional del ensayo de compresión de materiales metálicos a temperatura ambiente, ASTM E9 (Tabla 20), se observa que los primeros son significativamente mayores. Torres et al. [36, 52] reportaron esta tendencia para el Ti obtenida tanto por pulvimetalurgia convencional como por la técnica de espaciadores. Este hecho fue asociado a la rigidez de la propia máquina de compresión, siendo necesaria la corrección de dicho valor (E_c).

En general, se observa que, de igual forma, los valores obtenidos por ultrasonidos y tras el ensayo de compresión uniaxial, son mucho más próximos entre sí para los sustratos de mayor tamaño de espaciador con respecto al sustrato de 100-200 μm .

La Figura 99 presenta un diagrama basado en las comparaciones de los valores del módulo de Young dinámico frente a la P_T , no existiendo, dentro de un cierto rango de presiones, una notable influencia de la presión de compactación en las técnicas empleadas. Dicho diagrama se compone de los resultados obtenidos por pulvimetalurgia convencional con porosidad homogénea y con gradiente [52], así como para la técnica de espaciadores [36] y por los valores obtenidos en el presente trabajo. Generalmente, el módulo de Young obtenido mediante la técnica de ultrasonidos (módulo de Young dinámico) muestra valores mayores que los estimados tras las curvas de compresión. Sin embargo, para valores menores (mayores porosidades), ambos resultan ser mucho más próximos.

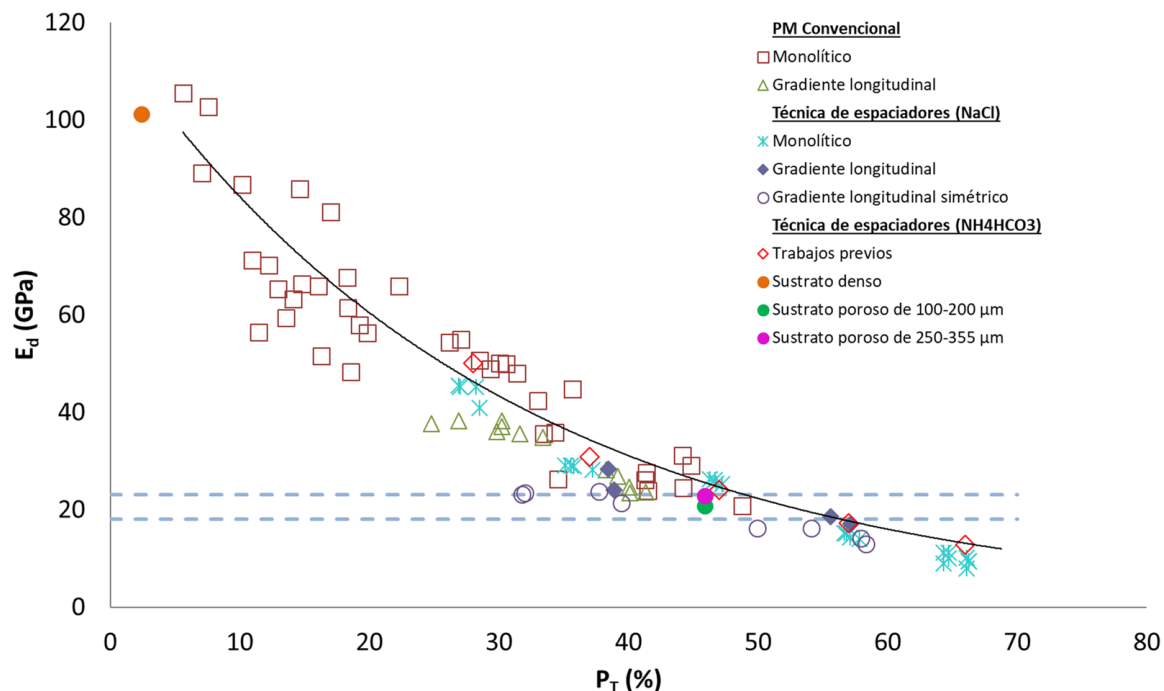


Figura 99. Diagrama comparativo de módulos de Young frente a P_T de los resultados de la presente tesis doctoral y de trabajos previos [36, 52].

Los resultados para el sustrato denso se localizan en torno a valores mucho más alejados, como cabía esperar. Sin embargo, los calculados para muestras con un

Capítulo 4

50% de porosidad de diseño, concuerdan con los valores obtenidos en los trabajos previos [36, 52], donde para las porosidades entre el 45 y 55%, el módulo de Young se encuentra en la franja correspondiente a los valores del hueso cortical. De esta forma, los valores obtenidos por la técnica de ultrasonidos quedan validados.

Continuando con el comportamiento mecánico, los ensayos de dureza y de rayado permiten conocer la respuesta del material poroso frente a esfuerzos estáticos y dinámicos que generen una deformación permanente o plástica. Por otro lado, permiten el estudio de la influencia que la porosidad generada, en cuanto a fracción volumétrica y morfología, ejerce en cuanto a la resistencia y propiedades tribológicas del sustrato empleado.

Los resultados de microdureza dependen de la carga de indentación aplicada (Tabla 21). Las cargas elegidas fueron HV0.3 y HV1, con el fin de estudiar la influencia tanto de la porosidad como de tamaño de poro sobre la matriz de titanio. Observando los resultados de la probeta densa, se observa que el valor de micro-indentación Vickers es mayor para la menor carga aplicada (377 HV0.3 vs. 342 HV1). Este hecho puede estar relacionado con fenómenos de micro-plasticidad localizada y los propios efectos de la micro-indentación. En cuanto a los sustratos porosos, los valores de micro-indentación decrecen debido a la existencia de poros en comparación con los resultados obtenidos para la muestra densa. Cabe destacar que, para la carga HV0.3 no hay gran diferencia en cuanto al tipo de sustrato. Esto se debe a que la matriz remanente de titanio es lo suficientemente amplia como para que no haya gran influencia de los poros que hay alrededor de donde se realiza la penetración, de forma que las muestras porosas se comportan como la densa. Sin embargo, al aumentar la carga de la indentación, el indentador penetra más y deja mayor huella. Así, la influencia de los poros se hace notable (Figura 100) y los valores disminuyen con la porosidad de la muestra (Tabla 21). Adicionalmente, se observa que los resultados decrecen conforme aumenta el tamaño de poro, presentando la muestra de mayor rango de tamaño de partícula de espaciador (250-355 μm) menor dureza.

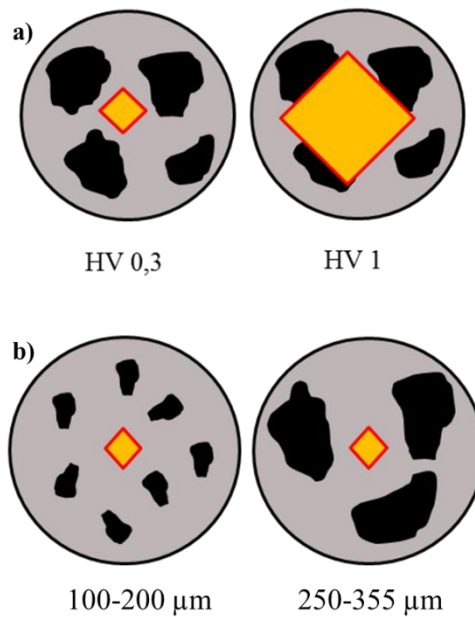


Figura 100. Esquema de la influencia de la carga de micro-indentación Vickers y del tamaño de poro en los sustratos porosos.

Esto se corrobora en las micrografías de la Figura 101, donde las huellas correspondientes a HV0.3 son muy similares en cuanto a tamaño, mientras que para HV1 la huella resulta ser significativamente mayor para el sustrato poroso.

Capítulo 4

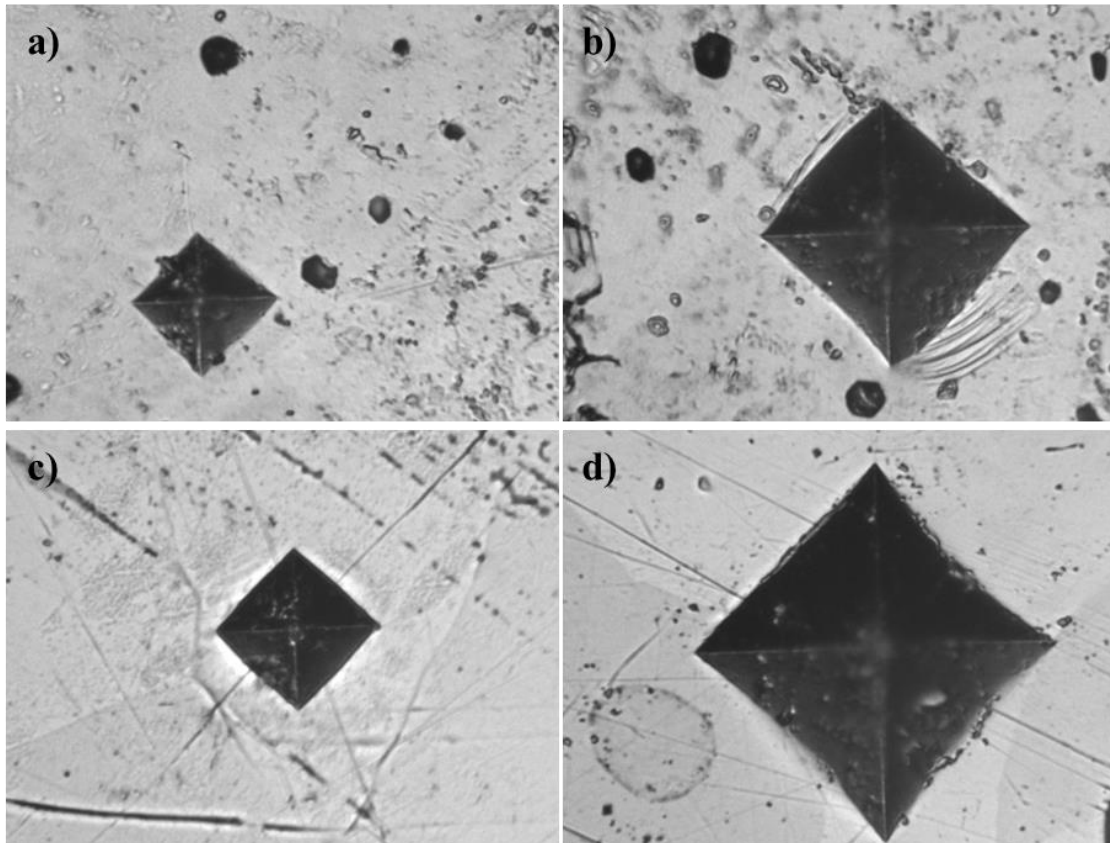


Figura 101. Huellas a carga a) HV0.3, b) HV1 para el sustrato denso y c) HV0.3, d) HV1 para el sustrato poroso de rango de tamaño de espaciador 100-200 μm .

Los ensayos de micro-indentación instrumentada (curvas $P-h$), por su parte, muestran una penetración mayor para los sustratos porosos de titanio frente al denso (Figura 38), en concordancia con los resultados comentados anteriormente. Se produce así una pérdida de rigidez en comparación con la muestra densa, asociada al efecto que generan los macro-poros sobre el sustrato de titanio. Por su parte, se observa además que el sustrato poroso presenta una recuperación elástica mayor que la del sustrato denso, donde tienen lugar más efectos ligados a microplasticidad. Los resultados obtenidos para el sustrato de 250-355 μm fueron similares a los de menor rango de tamaño de poro en comparación con el sustrato denso.

En cuanto a los valores obtenidos de este ensayo, se recogen en la Tabla 22, partiendo del esquema de la Figura 39. A partir de estos resultados se observa que, a máxima carga, la penetración es mayor para el sustrato poroso, siendo la

profundidad final remanente C menor. Por tanto, la recuperación elástica en porcentaje $(B-C)/B$ experimentada por las muestras porosas aumenta frente a la probeta densa. Cabe destacar la presencia de un comportamiento de *pseudo-creep* en ambos tipos de sustrato (Tabla 22, columna $B-A$), que sugiere que a cierta carga constante se produce el colapso de la matriz de titanio.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de rayado o *scratch test* se muestran en la Figura 40 y en la Figura 41. Como cabe esperar, en la pre-palpación (Figura 40) se representa un perfil mucho más rugoso para la muestra porosa, mientras que para la densa la topografía resulta ser lisa y homogénea. De la misma forma, el perfil obtenido en la pospalpación (penetración permanente) muestra una superficie aún más irregular que la de la prepalpación para la muestra porosa, de acuerdo con los valores de los parámetros de rugosidad de la Tabla 23. Cabe destacar que los parámetros de rugosidad obtenidos a partir del ensayo de rayado corresponden a la rugosidad 2D, mientras que los obtenidos mediante microscopía confocal son sus análogos en 3D. Los resultados de la muestra porosa de mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm) fueron similares a la del rango de 100-200 μm en términos de comparación con la muestra densa.

Observando la Figura 41, se presenta una mayor recuperación elástica para la muestra porosa de 100-200 μm de rango de partícula de espaciador que para la densa. Esto se explica debido a que el sustrato denso resulta ser mucho más rígido que el poroso, como se muestra en la Tabla 24. De esta forma, estos valores refuerzan los resultados obtenidos por micro-indentación instrumentada.

El movimiento de las articulaciones del cuerpo humano, así como el relativo entre hueso e implante, genera una fricción que desemboca en desgaste del material. Éste, además, puede verse agravado por la presencia de fluido fisiológico. Por esta razón, se hace necesario el análisis de la resistencia que opone el material a la fricción, mediante ciertos parámetros como la tasa de desgaste, que da idea de la cinética de degradación por fricción que puede tener el material.

Capítulo 4

El ensayo de desgaste muestra mayor daño para la muestra densa que para la muestra porosa de 100-200 μm (Tabla 25), a pesar de presentar esta última una dureza menor. Por su parte, la muestra porosa de mayor rango de tamaño de partícula de espaciador presentó el mismo comportamiento que esta última. Este hecho podría explicarse debido a que la probeta porosa tiene menor área efectiva en contacto con la bola de ensayo, así como por el colapso que tiene lugar en la matriz de titanio y a la recuperación elástica, que es mayor en los sustratos porosos, como se ha comentado anteriormente. La Figura 102 muestra el surco generado para el sustrato denso y el sustrato poroso, mediante macrografías, OM y SEM.

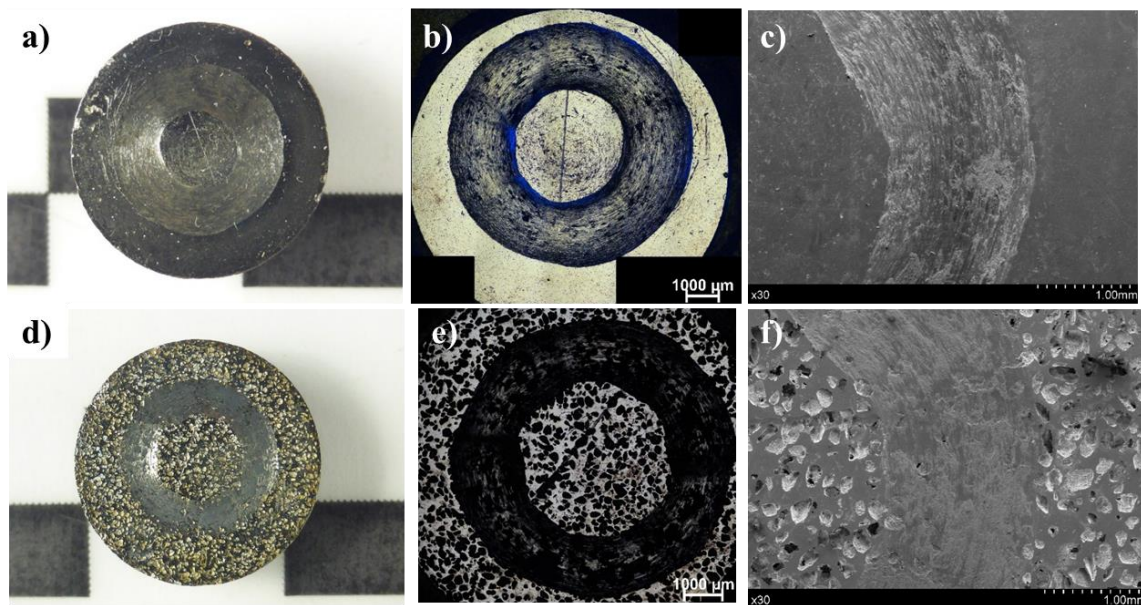


Figura 102. a) y d) macrografías, b) y e) collage de OM, y c) y f) imágenes SEM de una sección del surco de las muestras densa y porosa de de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , respectivamente, tras el ensayo de desgaste.

La Figura 43 expone las grandes diferencias existentes entre el sustrato denso y el sustrato poroso de rango de tamaño de espaciador 100-200 μm en cuanto al coeficiente de fricción y la profundidad del surco en el ensayo de desgaste. Se observa cómo el coeficiente de fricción es menor en el caso del sustrato denso (0.47) frente al de la muestra porosa (0.75), conllevando el daño mayor para la muestra densa que se comentó anteriormente. Sin embargo, la bola de alúmina empleada penetra más durante la ejecución del ensayo en la muestra porosa, ya

que esta posee menor rigidez. Este hecho se traduce en una mayor recuperación elástica para la muestra porosa, como se corrobora en la profundidad permanente del surco de la Tabla 25 mayor para la probeta densa, la cual sufre un colapso de la matriz de titanio). Los resultados de la probeta de mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm) fueron similares que los del rango de menor tamaño (100-200 μm).

En cuanto a la profundidad del surco (h , Tabla 25), cabe preguntarse por qué dichos valores resultan ser mayores que los obtenidos en tiempo real para el LVDT (0.12 y 0.25 mm para la muestra densa y porosa de 100-200 μm , respectivamente). La razón es la expansión que sufre la bola por el calor generado en el ensayo, de forma que el aumento de volumen de la bola (en su diámetro), se traduce en un error de medida (reducción de la distancia vertical que penetra) [254].

Según los resultados obtenidos para la tasa de desgaste tanto absoluto como normalizado (Tabla 25), se observa que ambos tipos de sustrato presentan tasas de desgaste de orden similar (en torno a 10^{-3} y 10^{-4}), siendo ligeramente superior para el caso de la muestra densa, donde el daño es mayor como se ha comentado anteriormente. No obstante, los coeficientes de desgaste normalizado para ambos sustratos se encuentran por encima del límite ingenieril (10^{-5}), indicando un desgaste de tipo adhesivo (Figura 103). Este tipo de desgaste es el más común en los ensayos de bola sobre disco (*ball on disk*). Para el caso de la probeta porosa, se aprecia que el arrastre de material en la realización del ensayo taponaba parte de los poros, consecuencia propia del desgaste de tipo adhesivo (Figura 102 f).

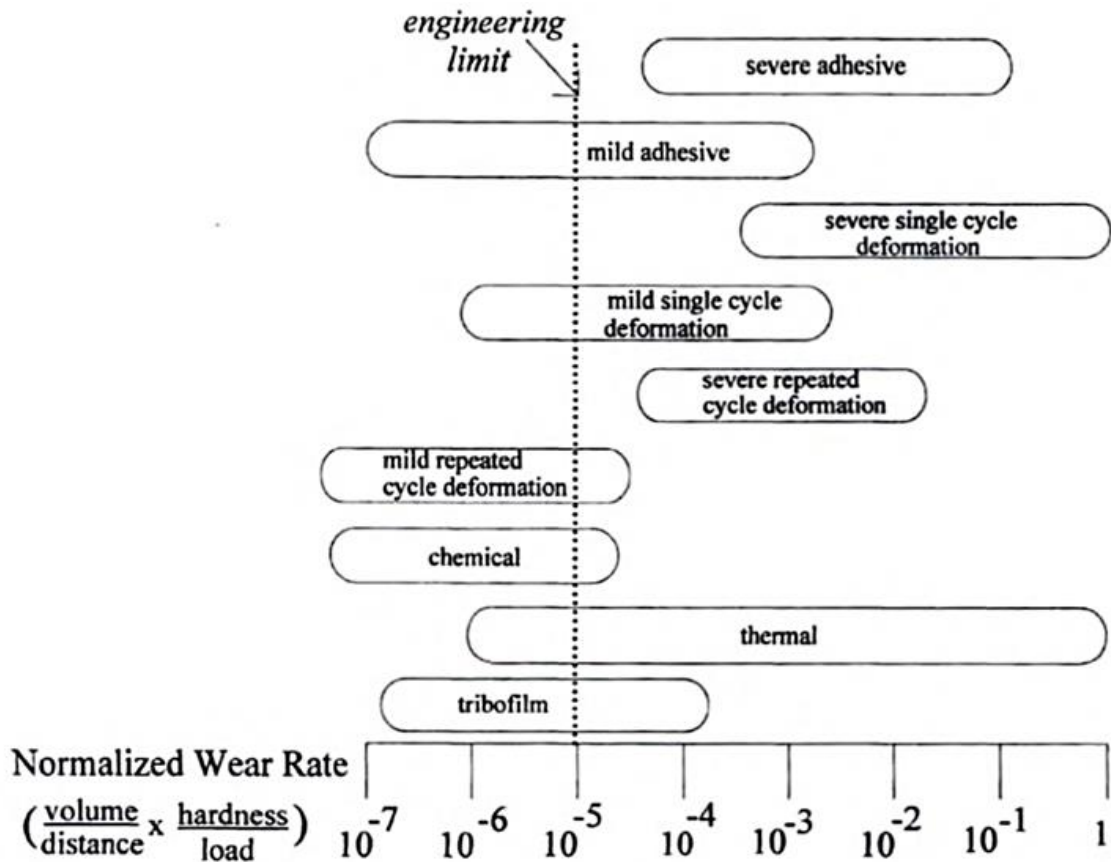


Figura 103. Mecanismos de fricción en función de la tasa normalizada [255].

Una vez realizada la caracterización micro-estructural, mecánica y tribológica, es necesario llevar a cabo el estudio del comportamiento biológico que poseen los sustratos de titanio.

Los patrones de rugosidad hallados han resultado de gran interés en cuanto a los ensayos biológicos realizados. Estudios previos a esta tesis doctoral, llevados a cabo por Yadir et al. [53] han demostrado que topografías de este tipo generadas por otras técnicas, permiten la adhesión celular a sus paredes gracias a la rugosidad inherente (Figura 104). En este contexto, se realizaron ensayos de adhesión y proliferación celular de la línea C2C12 de preioblastos de ratón (*ATCC, American Type Culture Collection*).

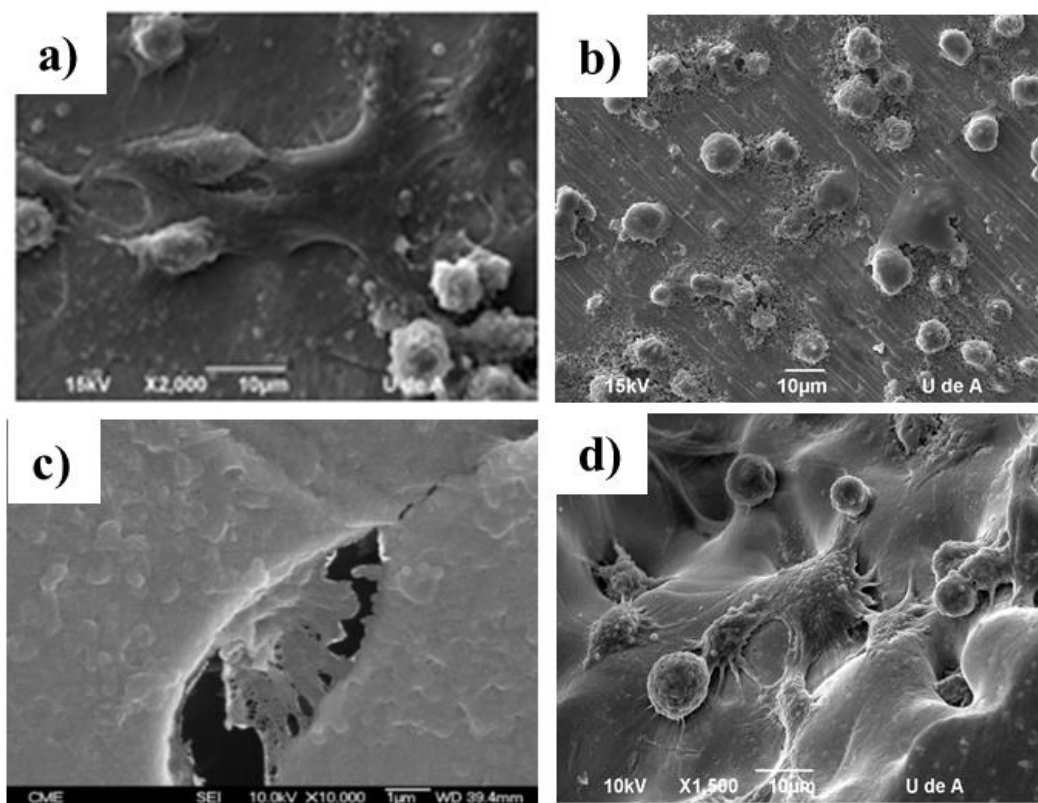


Figura 104. Micrografías SEM de la adhesión de osteoblastos a sustratos de titanio fabricados por: a) Mecanizado convencional, b) superficie especular, c) loose sintering, d) técnica de espaciadores [53].

La adhesión celular para los sustratos vírgenes fue similar para ambos sustratos porosos (Figura 45), siendo ligeramente superior para el caso de la muestra densa. Este hecho se explica debido a que no hubo migración celular al fondo del pocillo que está tratado especialmente para cultivos celulares, así como pérdidas durante la siembra celular. En cuanto a los sustratos porosos, la actividad metabólica celular presentó niveles semejantes tras 24 h de cultivo. En el caso de las muestras porosas, sin embargo, sí se apreció pérdida del pellet celular durante el proceso de siembra y muchas de las células C2C12-GFP llegaron al fondo del pocillo quedando adheridas en esta superficie en vez del titanio poroso.

Las imágenes de microscopía invertida de fluorescencia (Figura 45), corroboran una mayor adhesión celular para el sustrato denso frente a los porosos que corresponde con los niveles de fluorescencia obtenidos. La muestra densa presenta una forma

Capítulo 4

más alargada de las células, confirmando así la adhesión al sustrato. Sin embargo, para el caso de los sustratos porosos, la forma es algo más redondeada y en algunos casos desenfocada, implicando que la adhesión de éstas no se ha completado a las 24 h.

La proliferación tras 4, 7 y 10 días de cultivo, por su parte, presentó tendencias contrarias para el sustrato denso, el cual mostró niveles de actividad celular mucho más bajos que los sustratos porosos en todos los casos (Figura 46). Por su parte, la muestra porosa de 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador obtuvo valores mayores a los 4 días de proliferación, siendo la de 100-200 μm la más destacada tras los 7 días de cultivo. Sin embargo, cabe destacar que ambos sustratos revelaron unos niveles similares a los 10 días de cultivo, demostrando que la existencia de poros promueve la proliferación celular. Este hecho se confirma con las imágenes de microscopía invertida de fluorescencia, donde se observa un mayor crecimiento de las células en el interior y alrededor de los poros.

Por otro lado, cabe destacar que la morfología presentada por las células resulta ser más alargada tanto para el sustrato denso como para los porosos, adquiriendo una forma de tipo fibroblástica.

Como se expuso en el capítulo 3, apartado Proliferación de cepas de bacterias, el hecho de proliferación celular implica de forma directa la posibilidad de crecimiento de bacterias en los sustratos de titanio fabricados, con la consecuente aparición de infecciones. Dicho crecimiento se ve influenciado por los patrones de rugosidad de las paredes de los poros [53, 55].

El estudio del comportamiento bacteriológico se llevó a cabo a través de dos vías: un método 1 para *E. coli* y un método 2 para *MRSA* y *P. aeruginosa*. Las macrográficas de las placas Petri en las que se llevó a cabo el cultivo de *E. coli* sobre los sustratos de titanio (Figura 47), pone de manifiesto la existencia de crecimiento bacteriano de la cepa para las muestras estudiadas. En concreto, se observa una mayor densidad de bacterias para los sustratos porosos que para el denso.

La Figura 48, correspondiente a los resultados obtenidos por el protocolo P1, permitió la medida de las concentraciones de bacterias en el medio en el que los sustratos de titanio fueron sumergidos. Se observa que, para ambos tipos de sustrato (denso y porosos), el crecimiento bacteriano se inhibe para las tres concentraciones iniciales estudiadas. En concreto, cabe destacar una reducción significativa de la concentración para el caso de la muestra densa y la menor concentración (Concentración 3). Por su parte, a altas concentraciones la influencia del sustrato fue poco relevante.

El protocolo P2 no mostró crecimiento de bacterias en la superficie plana de los sustratos, a diferencia del protocolo P3, donde sí hubo resultados de proliferación en las paredes de los poros (Figura 49). En términos de superficie, este hecho puede explicarse debido al patrón de rugosidad que presenta el interior de los poros generados por el espaciador. La Figura 49 presenta de forma gráfica el número de unidades de formación de colonias en el interior de los poros en valor absoluto, revelando un mayor crecimiento bacteriano para el sustrato poroso de mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm) y para las mayores concentraciones estudiadas. La razón estriba en que, a mayor concentración, existe una mayor probabilidad de que las bacterias penetren en el interior de las cavidades del sustrato poroso.

En cuanto a la influencia del tamaño de poro, la Figura 49 a) no muestra diferencias significativas. Sin embargo, al normalizar los valores absolutos por la superficie interior de los poros (Figura 49 b), se aprecia un crecimiento levemente mayor para el sustrato poroso de mayor rango de tamaño de espaciador. Esto puede explicarse ya que, a mayor tamaño, es más fácil que un número mayor bacterias se introduzcan en los poros.

La Figura 50 y la Figura 52 para *P. aeruginosa* y *MRSA*, respectivamente, manifiestan de manera visual una densidad de bacterias mayor para la primera cepa, tanto para el sustrato denso como para el poroso. El método 2 reveló resultados similares que el método 1 para las cepas *P. aeruginosa* y *MRSA*, mostrando que la presencia de porosidad promueve la proliferación de bacterias, tal

Capítulo 4

y como se aprecia en las macrografías mencionadas. Por su parte, el ensayo de bacterias vivas/muertas por microscopía confocal para la cepa *MRSA* (Figura 53), corroboró una mayor densidad de bacterias vivas (teñidas en verde) en ambos sustratos porosos a comparación del denso. No obstante, presentó también para los porosos un mayor número de bacterias muertas, ubicadas en el interior de los poros (teñidas en rojo). Esto último puede estar relacionado con la falta de oxígeno a ciertas profundidades.

Al igual que para la cepa de *E. coli* estudiada por el método 1, tanto el tamaño de poro como la concentración inicial para el cultivo resultan ser parámetros determinantes. Para el método 2, tanto la *P. aeruginosa* (Figura 51) como la *MRSA* (Figura 54) mostraron mayores niveles de crecimiento de bacterias para el sustrato de mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm), como se mostró para la *E. coli* (Figura 49). Sin embargo, se observan ciertas diferencias con respecto al método 1. Para los valores normalizados por la superficie del interior de los poros (Figura 51 b y Figura 54 b), el método 2 reveló que, a menores concentraciones, la proliferación resultó ser mayor tanto para los sustratos densos como los porosos. Esto puede explicarse mediante dos posibles factores.

Por un lado, la velocidad de crecimiento puede ser mayor a menores concentraciones iniciales de bacterias, con el fin de alcanzar un estado estacionario. El segundo factor posible, por su parte, consiste en que, a grandes concentraciones, las bacterias pueden taponar parte de los poros, impidiendo así su propia penetración en el interior de éstos.

Tras el estudio del comportamiento biológico, tanto celular como bacteriológico, se manifiesta la influencia de la porosidad, morfología y rugosidad de las paredes de los poros de los sustratos fabricados. El análisis celular establece unos niveles de adhesión, tras 24 h de cultivo, menores para las muestras porosas que para la densa, como consecuencia del proceso de siembra. Sin embargo, tras 4, 7 y 10 días de cultivo, las tendencias se invierten, mostrando una mayor actividad celular, y, por tanto, proliferación, para los sustratos porosos frente al denso. La existencia de

poros, por tanto, promueve la proliferación y la adhesión tanto en el borde como en el interior de estos, sin presentar diferencias notables en cuanto a tamaño.

Respecto al estudio bacteriológico, en general, se observan niveles de proliferación mayores para los sustratos porosos que para los densos, consecuencia de un incremento del área de contacto (poros interconectados provistos de paredes rugosas). Este mismo hecho fue observado para las tres cepas bacterianas estudiadas. A diferencia del comportamiento celular, el análisis de proliferación de bacterias revela la influencia del tamaño de poro, así como de la concentración inicial de bacterias del medio de cultivo. En este sentido, se observa que un mayor tamaño de poro favorece el aumento del número de colonias de bacterias. Se manifiesta, por tanto, la importancia de la presencia de poros en los sustratos, tanto para la proliferación celular (deseada), como para la de bacterias (no deseada), siendo determinante el tamaño de poro para esta última.

4.2 Evaluación de los tratamientos de modificación superficial para la mejora de la osteointegración

El estudio para mejorar la integración del hueso y los sustratos se llevó a cabo siguiendo líneas distintas, tal y como se expone en el apartado " 3.2. Mejora de la capacidad de osteointegración: tratamientos de modificación superficial".

4.2.1 Ataque químico por inmersión: análisis de la topografía, la integridad estructural y la capacidad de adhesión celular

Tal y como se ha expuesto en la presente tesis doctoral, se llevaron a cabo dos tipos de ataque por inmersión en HF, a igual concentración, diferenciados en el tiempo de exposición de ataque: 125 y 625 s.

Las porosidades, total e interconectada, de los sustratos atacados por inmersión para ambos tiempos de ataque, aumentan en todos los casos con respecto a sus análogos vírgenes (Tabla 26 frente a resultados de Arquímedes de la Tabla 40, respectivamente). Las variaciones de P_T tras los ataques de inmersión se grafican en la Figura 105.

Capítulo 4

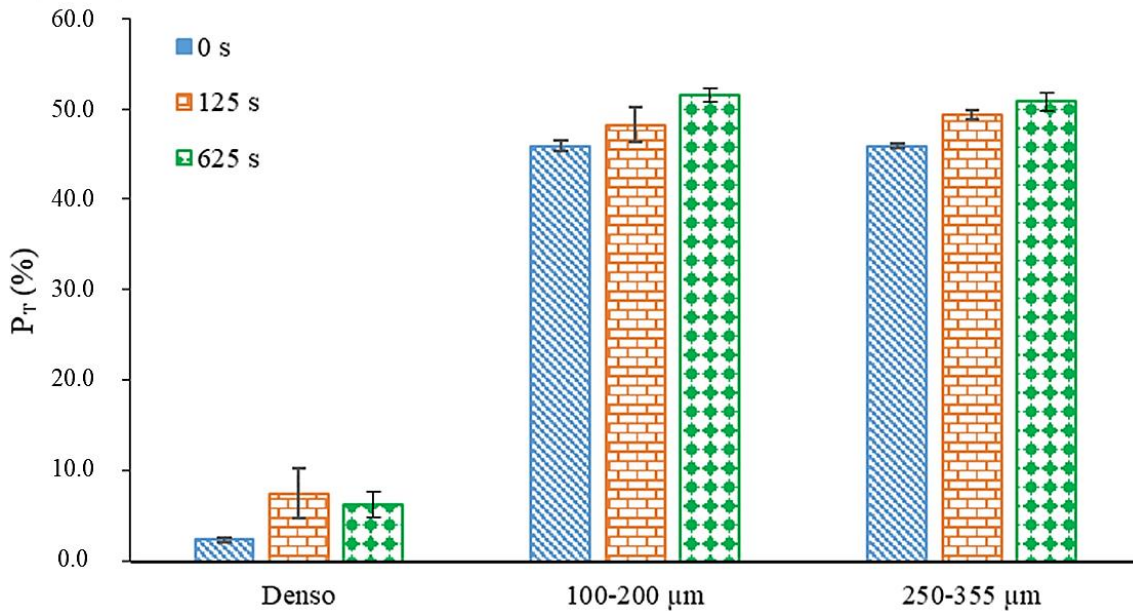


Figura 105. Porosidad total por el método de Arquímedes para los sustratos denso y porosos de 100-200 y 250-355 μm , antes (0 s) y tras el ataque por inmersión a 125 y 625 s.

De igual forma, dichas diferencias en la porosidad se cuantifican en la Tabla 42, donde se recopilan los incrementos de P_T (ΔP_T), tomando como referencia las muestras vírgenes. Como cabe esperar, se observa que, de forma global, las porosidades aumentan con el tiempo de exposición al ácido, con la excepción de la muestra densa. El sustrato denso virgen se caracteriza por tener una porosidad abierta, como se ha referido anteriormente. El ataque a 125 s aumenta dicha porosidad, acentuando las pequeñas irregularidades que puedan existir en la superficie. Sin embargo, a altos tiempos de ataque (625 s), el efecto que tiene lugar resulta ser contrario, homogeneizando la superficie y desdibujando los poros procedentes del proceso de fabricación.

Discusión de resultados

Tabla 42. ΔP_T (%) de los sustratos denso y porosos de ambos tamaños de partícula de espaciador, atacados a 125 y 625 s por inmersión, con respecto a sus análogos vírgenes por el método de Arquímedes.

		ΔP_T (%)
Densa	125 s	5.2
	625 s	4.0
100-200 μm	125 s	1.2
	625 s	4.5
250-355 μm	125 s	3.1
	625 s	4.5

En general, no se observan tendencias muy claras. A pesar de ello, se evidencian cambios en la porosidad de las muestras atacadas. Como se comentó previamente, la porosidad total de los sustratos, antes y después del ataque, resulta ser prácticamente interconectada, representando la porosidad cerrada un porcentaje muy pequeño de la total (Tabla 15 y Tabla 26). Al aumentar la porosidad total tras el ataque, lo que realmente se incrementa es el % de porosidad interconectada. Este hecho pone de manifiesto que, tras el ataque químico, puede favorecerse el crecimiento del hueso al interior del material (*bone in-growth*).

Mediante micro-CT, al igual que ocurrió para los sustratos sin atacar, se caracterizó la porosidad (P_T (%), D_{eq} medio y fracción volumétrica de la porosidad en % vs D_{eq}) tras el ataque químico por inmersión a 125 s, mostrándose en la Tabla 43 las variaciones respecto a los sustratos vírgenes.

Tabla 43. ΔP_T (%) y ΔD_{eq} (%) de los sustratos porosos de ambos tamaños de partícula de espaciador, atacados a 125 s por inmersión, con respecto a sus análogos vírgenes por micro-CT.

	ΔP_T (%)	ΔD_{eq} (%)
100-200 μm	-0.6	7.1
250-355 μm	4.7	29.8

Capítulo 4

La P_T del sustrato 100-200 μm de tamaño de espaciador, casi no se ve alterada por el ataque a 125 s, presentando un valor similar al de su sustrato análogo virgen (ver Tabla 17 y Tabla 27). En cuanto al D_{eq} medio, aumenta en un 7,1 % tras el ataque de la muestra. Por su parte, las variaciones, tanto de P_T como del D_{eq} de los poros para el sustrato poroso de 250-355 μm , presentan cambios mucho más acusados. En este caso, la P_T de la muestra tras el ataque a 125 s se ve incrementada en un 4.7 % con respecto a la muestra virgen, confirmando los resultados preliminares por el método de Arquímedes de la Tabla 42 (mayor incremento para la muestra de mayor tamaño de poro). En cuanto al D_{eq} medio, aumenta un 29.8 %, variación mucho más elevada que para la muestra de menor rango de tamaño de espaciador. Esto puede explicarse debido a una mayor facilidad de intrusión del ácido a través del sustrato de 250-355 μm .

Las distribuciones de D_{eq} también muestran de forma gráfica las diferencias que se han expuesto. En general, éstas son más anchas y están desplazadas a la derecha respecto de la de los sustratos vírgenes tras ser atacados a 125 s (Tabla 44). Por otra parte, esto corrobora los resultados expuestos en la Tabla 43, de manera que el ataque ácido incrementa el D_{eq} medio de los poros (Figura 106 y Figura 107), obteniendo en ambas muestras atacadas a 125 s unos parámetros de distribución que resultan ser mayores que sus análogas vírgenes.

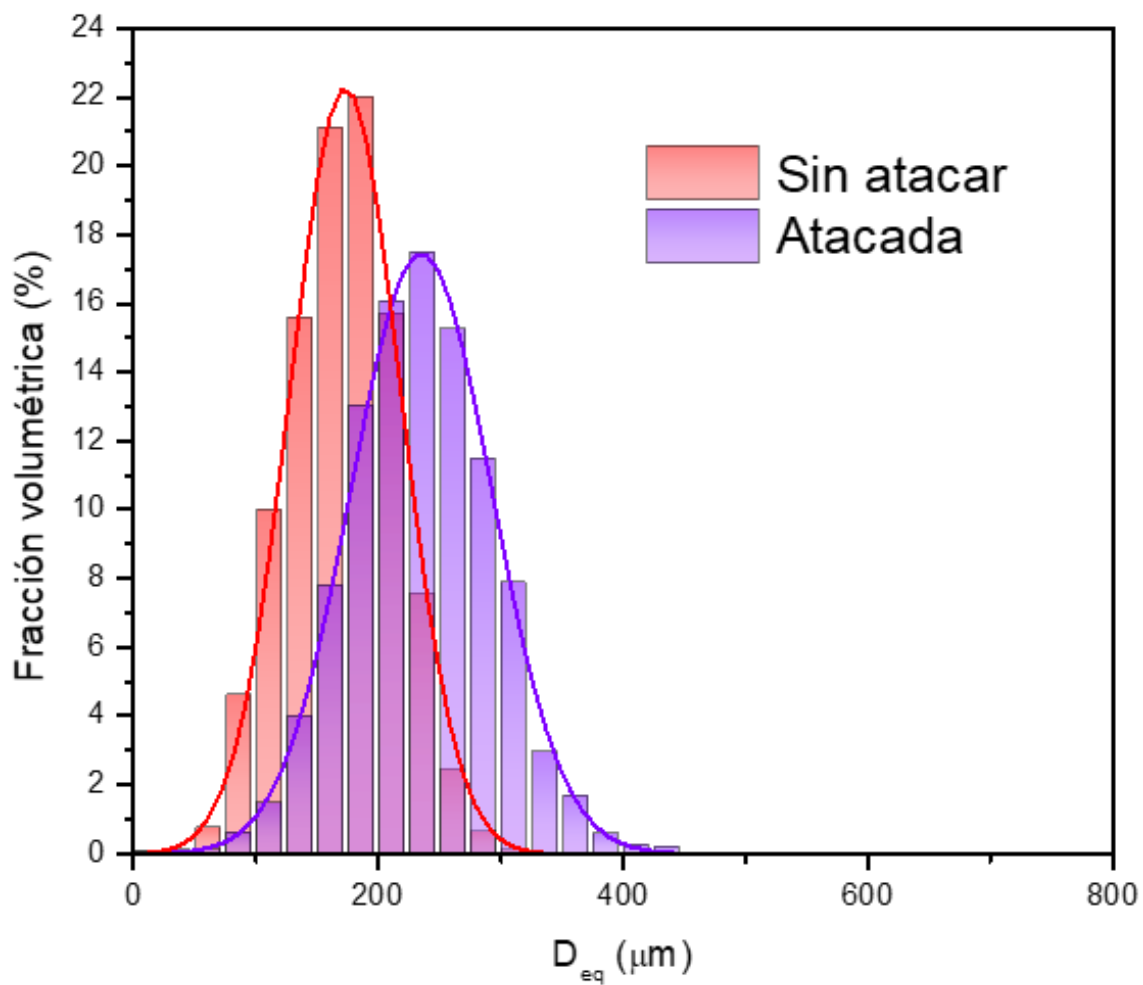


Figura 106. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.

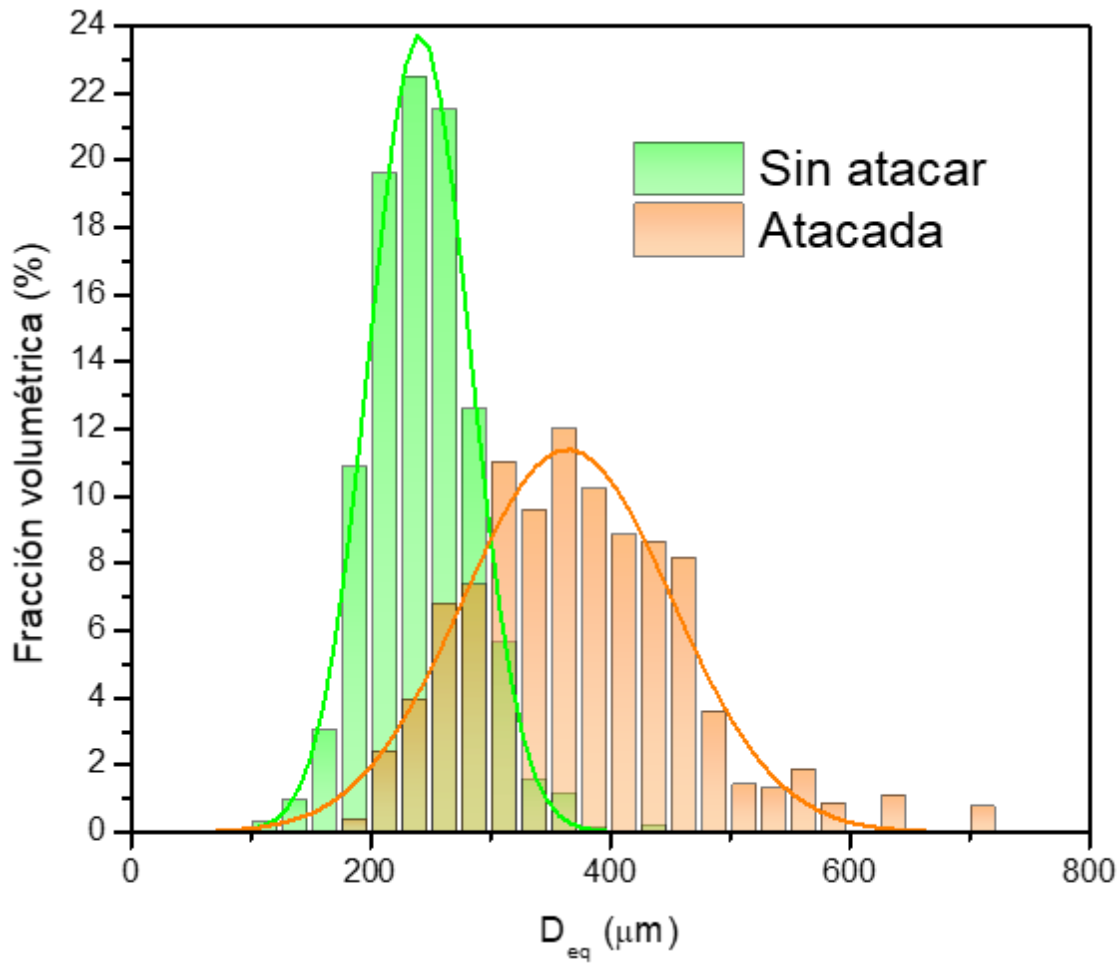


Figura 107. Fracción volumétrica (%) frente a D_{eq} (μm) de los sustratos porosos de titanio de tamaño de partícula de espaciador 250-355 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.

Tabla 44. FWHM y Desviación Típica de las distribuciones de D_{eq} de los sustratos porosos antes y después del ataque a 125 s.

	FWHM (μm)	Desv. Típica (μm)
100-200 μm Sin atacar	106.6	45.3
100-200 μm Atacada	135.3	57.5
250-355 μm Sin atacar	98.5	41.8
250-355 μm Atacada	206.0	87.5

Mientras que, para los sustratos porosos vírgenes, las curvas correspondientes son relativamente similares (*FWHM* y desviación típica), el ataque químico genera grandes diferencias de *FWHM* y desviación típica, siendo estos valores mayores para el sustrato de mayor rango de tamaño de espaciador.

Las micrografías SEM de las Figura 57 y Figura 58 para los sustratos atacados químicamente por inmersión, muestran evidencias de un ataque mucho más agresivo para el mayor tiempo de exposición al ácido (625 s) en ambos tipos de sustratos denso y poroso. En los sustratos de 100-200 μm de tamaño de espaciador, las probetas sumergidas se encuentran en contacto con la solución ácida alrededor de todo su volumen, permitiendo la infiltración del fluido por capilaridad a través toda la superficie de la probeta hacia el interior. Por tanto, a mayor tiempo de ataque, más contacto hay entre la solución y los sustratos.

Cabe destacar que para las probetas densas atacadas por inmersión (Figura 57), el ataque ha revelado los límites de grano perfectamente delimitados, junto con los poros procedentes del proceso de fabricación en la parte central de los mismos. Adicionalmente, aparecen unas formas geométricas que simulan picaduras sobre los sustratos metálicos, haciéndose especialmente notorias en la parte plana de las matrices de titanio, tanto en la densa como en las porosas (Figura 57 y Figura 58).

En cuanto a los sustratos porosos, la topografía del interior de los poros revela un patrón de rugosidad distinto, apreciándose un aumento de rugosidad en la superficie interior de los poros a escala submicrométrica (Figura 59). El resultado es una topografía mucho homogénea. Este patrón se acentúa y se hace más brusco tras el ataque a 625 s.

Al adentrarse en la forma geométrica que aparece en la superficie plana de los sustratos, se observa que el patrón de rugosidad generado en su interior es similar al que se genera en las paredes de los poros de los sustratos de 100-200 y 250-355 μm de tamaño de partícula de espaciador (Figura 108).

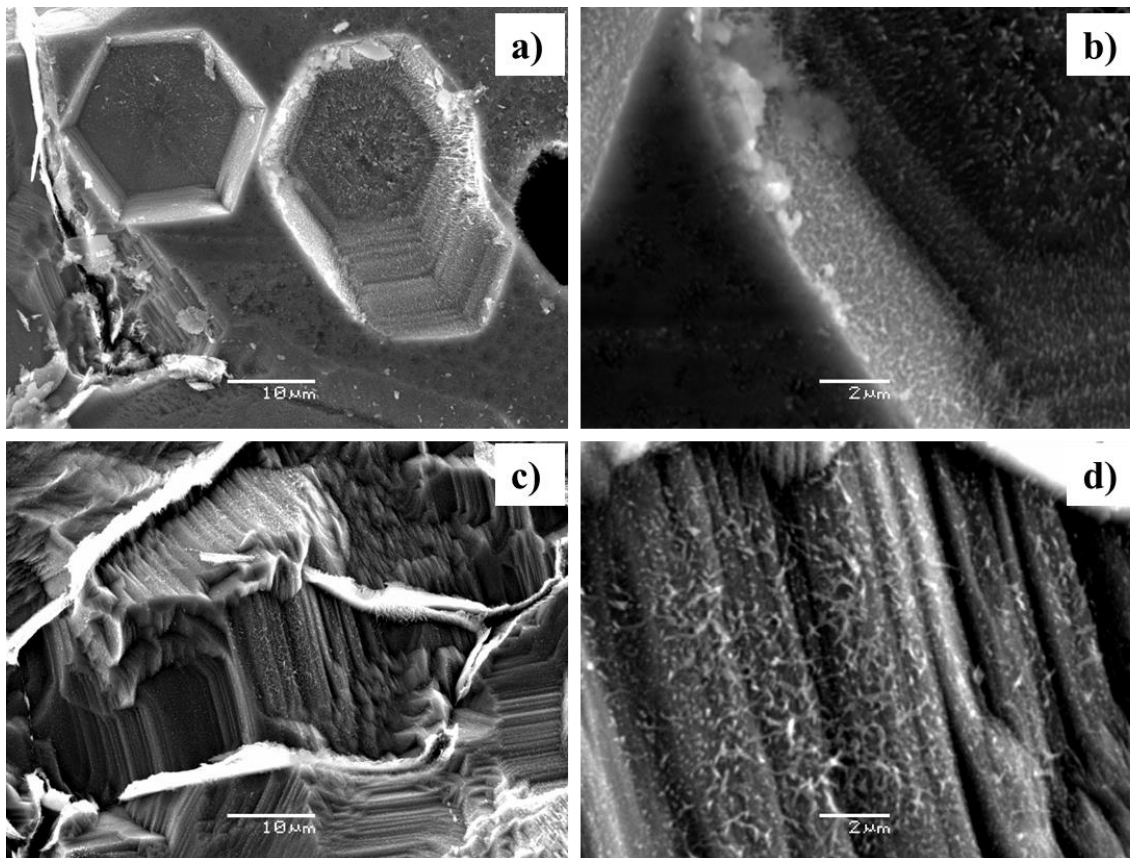


Figura 108. Imágenes SEM de la muestra porosa de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el ataque por inmersión a 125 s. a) formas geométricas de la parte plana a menores aumentos, b) interior de las formas geométricas de la parte plana a mayores aumentos, c) pared de uno de los poros de la muestra a menores aumentos y d) pared de uno de los poros a mayores aumentos.

En el ataque por inmersión, cuando el tiempo de exposición al ácido aumenta (625 s), las estratificaciones que estaban presentes en el interior de los poros de los sustratos atacados a 125 s se suavizan, reduciendo los escalones que genera el ataque. Adicionalmente, tiene lugar la aparición de formas geométricas, similares a las observadas en la parte plana de los sustratos atacados a 125 s, en las paredes de los poros tras el ataque a 625 s, acentuando aún más el patrón de rugosidad generado (Figura 109).

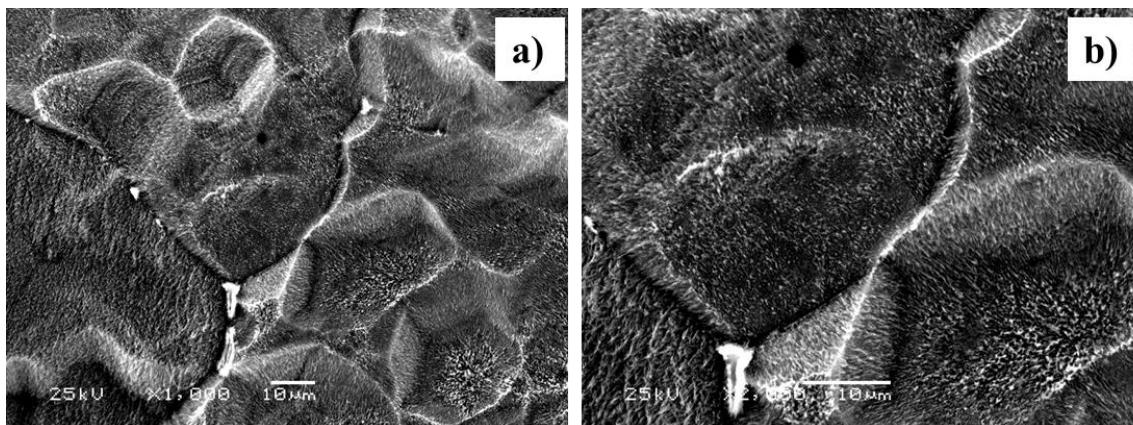


Figura 109. Interior de un poro de la muestra de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador que presenta formas geométricas tras el ataque por inmersión a 625 s: a) Pared del poro a menores aumentos y b) pared del poro a mayores aumentos.

En este contexto, se sometió a las muestras atacadas por inmersión (125 s) a la técnica de micro-CT, tal y como se procedió con los sustratos vírgenes. Los resultados de la Figura 60 evidencian una distribución de Rug_{vol} (%) más amplia para el menor rango de tamaño de partícula de espaciador (100-200 μm) frente a la del tamaño de 250-355 μm . Este hecho se explica en términos de superficie, ya que, a menor tamaño de poro, se obtiene una mayor área específica y, por tanto, una topografía más rugosa. Cuando la solución de ataque penetra en el interior de las muestras, ésta atacará de forma más significativa aquel sustrato que presente más superficie de contacto, generando consecuentemente, una topografía adicional a la existente en los vírgenes.

Comparando los sustratos porosos atacados a 125 s con sus correspondientes vírgenes (Figura 110 y Figura 111), se observa en ambos sustratos que este tiempo de ataque por inmersión presenta los histogramas desplazados ligeramente hacia la derecha del sustrato sin atacar. Esta desviación se debe al incremento de rugosidad que experimenta la superficie de los sustratos tras el ataque químico.

Capítulo 4

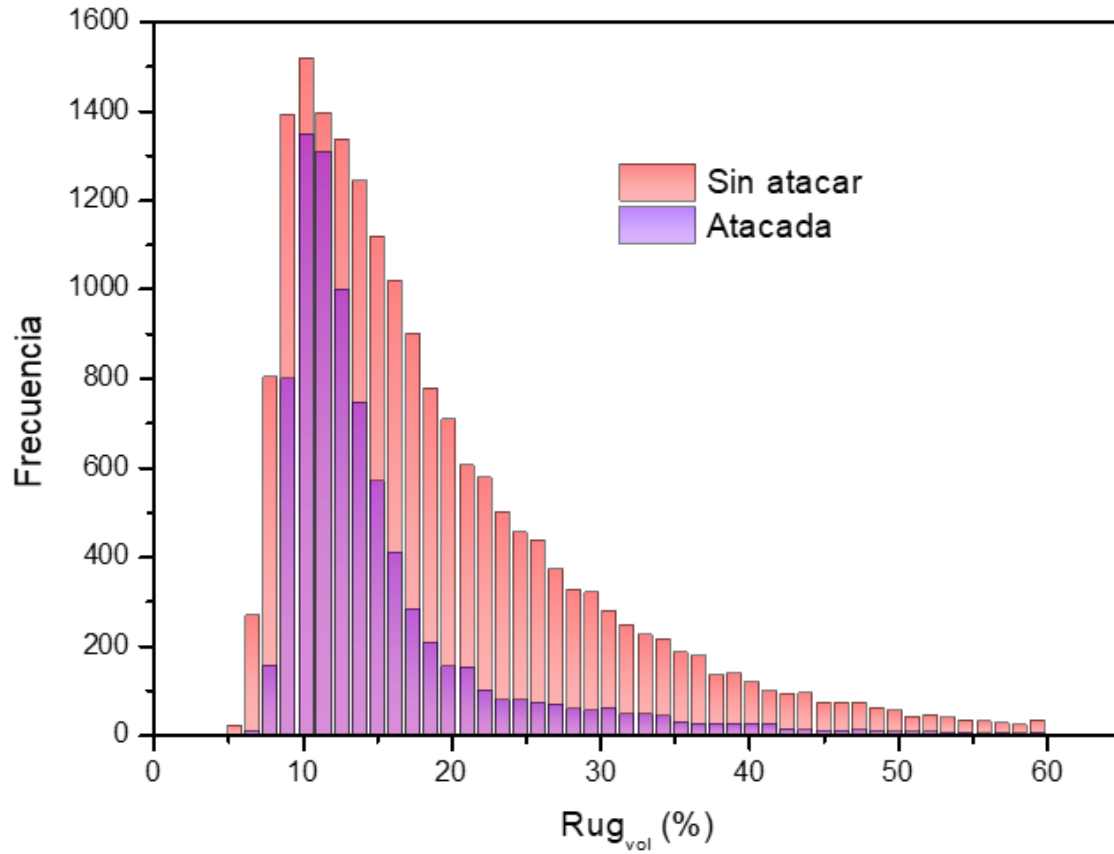


Figura 110. Distribución de la rugosidad volumétrica (%) para el sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.

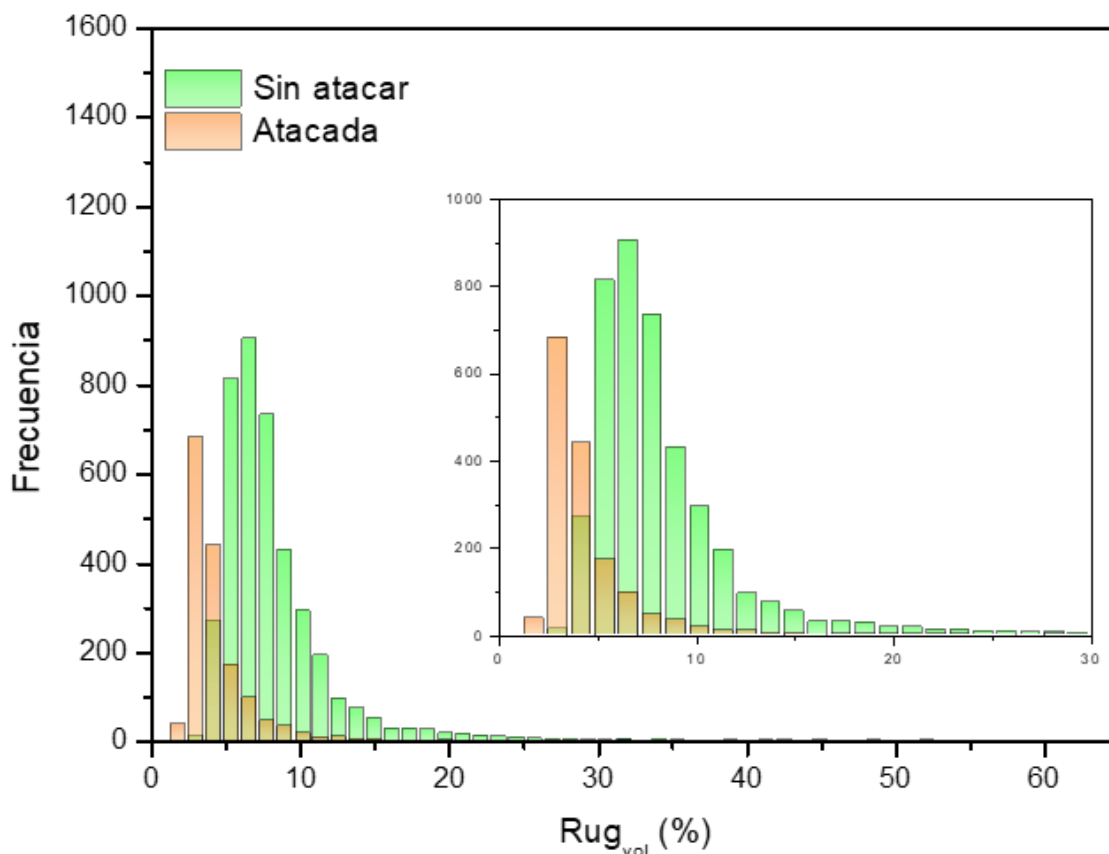


Figura 111. Distribución de la rugosidad volumétrica (%) para el sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 250-355 μm virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 s.

Al igual que se ilustró anteriormente, se observa que las distribuciones antes y después del ataque a 125 s para el sustrato de menor rango de tamaño de espaciador, son similares entre sí, aunque el porcentaje de Rug_{vol} aumenta ligeramente (desplazamiento a la derecha de la distribución tras el ataque). La razón es que, al penetrar el ácido en el interior de los poros, la rugosidad de estos aumenta, pero el volumen no se ve incrementado de manera acusada (no hay gran variación de D_{eq} , Tabla 43). Por su parte, el sustrato poroso de 250-355 μm , experimenta un desplazamiento de la distribución de Rug_{vol} del ataque mucho mayor. Esto se debe a que no sólo aumenta la rugosidad de las paredes de los poros, sino el volumen de los estos (incremento del 29.8 % del D_{eq} , Tabla 43).

Capítulo 4

Cabe destacar que, mientras para los sustratos porosos sin atacar y atacados de 100-200 μm , los valores de frecuencia máxima alcanzan niveles de 1518 y de 1346 para Rug_{vol} de 10.2 %, respectivamente, las muestras de 250-355 μm , sin atacar y atacadas, obtienen las mayores frecuencias (904 y 682, respectivamente) para el 6.6 y el 3 % de Rug_{vol} , de manera correspondiente. Esto corrobora lo expuesto anteriormente en la discusión.

Los resultados obtenidos tras microscopía confocal, también ponen de manifiesto que, conforme el tiempo de exposición al ácido aumenta, el ataque se vuelve mucho más agresivo, generando una superficie muy heterogénea en cuanto a alturas se refiere (ver diferencias entre el punto más alto y más bajo en las escalas de colores, Figura 61). Así, para la muestra porosa de menor rango de tamaño de espaciador, la escala (diferencia entre el punto más alto y el más bajo del sustrato) para el ataque a 125 s presenta una diferencia en valor absoluto de 219.4 μm , mientras que para el ataque a 625 s aumenta considerablemente, mostrando un valor de 475.5 μm . De igual forma, las diferencias en función del tiempo de ataque son muy acusadas para el sustrato poroso de 250-355 μm , tomando valores de 338.2 y 551.09 μm a 125 y 625 s, respectivamente. Para el caso de las muestras densas, sin embargo, la escala se mantiene en el mismo orden en valor absoluto (400.2 μm para el ataque a 125 s y 373.6 μm para el de 625 s). Este hecho implica que el ataque es homogéneo en toda la superficie del sustrato denso, independientemente del tiempo de ataque.

Asimismo, la topografía de los sustratos porosos se presenta más continua y suavizada, desdibujando los bordes de los poros y las discontinuidades que existían previamente. Un ejemplo claro de esta afirmación se muestra en la Figura 112, donde se representa el sustrato poroso de 250-355 μm antes y después de ambos ataques. Para las densas, por su parte, se aprecia una mayor densidad de formas geométricas en la superficie conforme aumenta el ataque, corroborando lo comentado tras la imagen SEM de la Figura 109.

Discusión de resultados

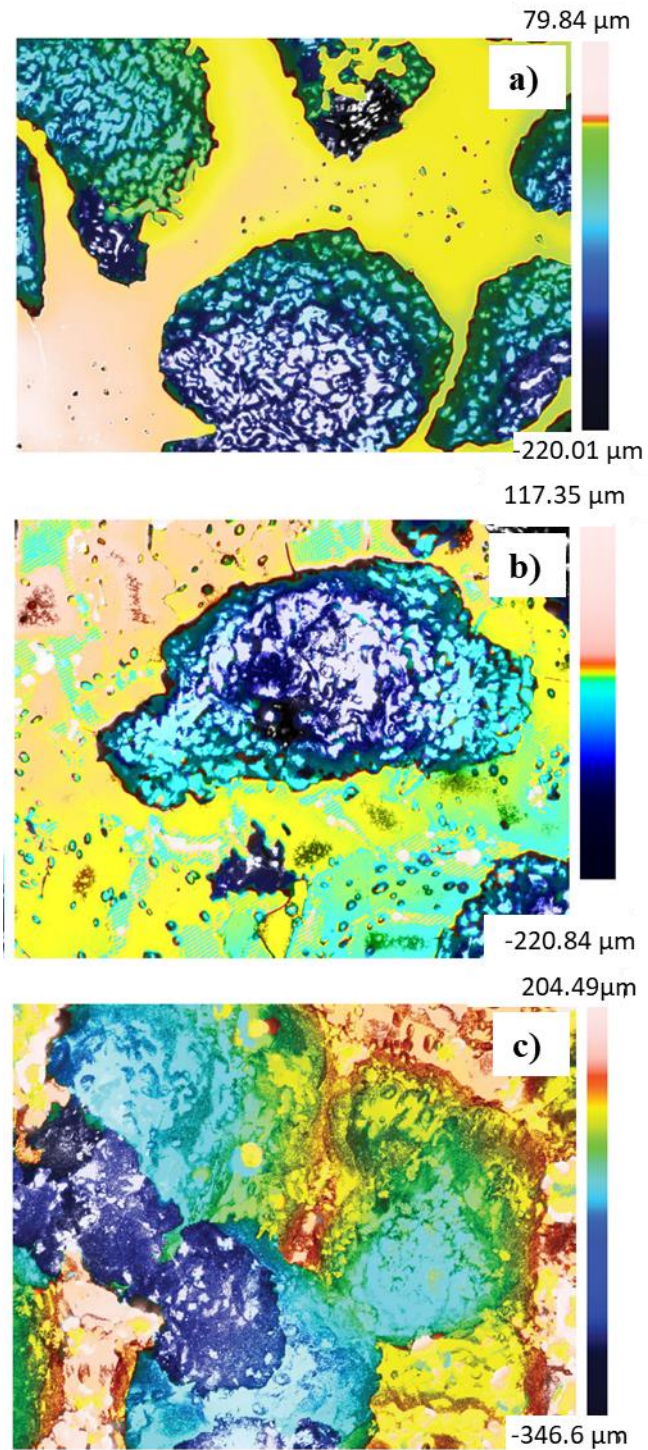


Figura 112. Imágenes de microscopía confocal 2½ D de los sustratos de titanio poroso de 250-355 μm : a) virgen, y atacados por inmersión: b) 125 s y c) 625 s.

Capítulo 4

El ataque por inmersión para ambos tiempos de exposición, genera así una rugosidad submicrométrica adicional a la que había previamente en los poros, analizada en el subapartado “3.1.1 Caracterización”, dentro del apartado **“3.1. Disminución del apantallamiento de tensiones: sustratos de Titanio poroso obtenidos por rutas pulvimetalúrgicas”**.

En cuanto a las imágenes 3D obtenidas por microscopía confocal (Figura 62 y Figura 63), se corrobora de manera cualitativa que los ataques por inmersión resultan ser más agresivos a 625 s que a 125 s. Destaca que, después del ataque químico, los bordes de los poros se suavizan más conforme aumenta el tiempo de ataque (los colores cambian de forma más gradual y continua en la superficie para el ataque a 625 s), siendo mayores las diferencias de alturas en la topografía (ver valores en las escalas de colores).

Este análisis se complementa de forma cuantitativa con los parámetros de rugosidad recogidos en la Tabla 28, siendo, de manera general, mayores los parámetros de rugosidad para el ataque a 625 s en comparación al de 125 s, como cabe esperar tras observar las imágenes de confocal. En cuanto a la distinción de zonas, se confirma que las áreas porosas obtienen rugosidades mayores que las planas para ambos tiempos de ataque por inmersión.

Al observar las diferencias de rugosidad entre los tiempos del ataque por inmersión mediante confocal, se aprecia que, para las muestras porosas, los valores aumentan con el tiempo de exposición al ácido. Por el contrario, en el caso de la muestra densa estos parámetros decrecen. Así, para la muestra densa, el ataque se realiza de forma homogénea a lo largo de toda la superficie, degradándola por igual. En el caso de las muestras porosas, el medio de ataque se comporta de forma distinta, ya que también se infiltra por los poros para acceder a su interior.

Se observa que, tanto para el sustrato denso como para las zonas planas de los porosos, la rugosidad aumenta (Tabla 45).

Tabla 45. Parámetros de rugosidad S_a obtenido por microscopía confocal láser de las superficies de los macro-poros y la matriz de Ti en función del contenido y rango de tamaño de espaciador, antes y tras el ataque químico por inmersión a 125 y 625 s.

		S_a (μm)		
		0 s	125 s	625 s
Densa	plana	0.7	4.4	5.0
100-200 μm	plana	5.0	8.5	5.2
	porosa	15.5	18.9	47.1
250-355 μm	plana	3.4	6.0	10.4
	porosa	30.8	18.3	71.7

En términos de la rugosidad media S_a , la muestra densa experimenta un aumento del 547.1 % para 125 s y de 635.3 % para 625 s. En cuanto a los porosos, estas tendencias son menos acusadas, mostrando más aumento en las zonas planas que en las paredes de los poros. Destaca el sustrato de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, donde la parte porosa experimenta una reducción del 40.6 % de la rugosidad para 125 s. Sin embargo, a 625 s la rugosidad de las paredes de los poros se ve aumentada en un 132.8 %. Esto puede ser atribuido a que, a menores tiempos de ataque, las zonas más rugosas comienzan a suavizarse y asemejarse al resto de la topografía. Esto se confirma al observar los valores dentro de los poros para los sustratos de 100-200 y 250-355 μm a 125 s, los cuales alcanzan valores de S_a que rondan los 18 μm (Tabla 28). No obstante, a tiempos largos, se vuelve a generar una cierta rugosidad, que será determinante en función del tamaño poro: a mayores tamaños de poro, más facilidad para que penetre el ácido en el interior del sustrato, generando así una nueva topografía aún más acusada.

La modificación superficial por ataque químico, en general, consigue un pronunciado incremento de los valores de rugosidad, especialmente para el ataque por inmersión a 625 s. Cabe destacar que los valores del parámetro de rugosidad S_a , son similares a los reportados por otros autores [256-259]. A título de ejemplo, Conrado et al. obtuvieron valores de S_a alrededor de 7 μm para la superficie plana

Capítulo 4

de titanio tras ser sometido a un tratamiento de arenado, lo que supuso una mejora en la diferenciación de osteoblastos [260].

El ataque químico, en tanto que agresivo, influye en la integridad estructural de los sustratos, variando la resistencia a los esfuerzos a los que estos pueden ser sometidos. En este contexto, se hizo necesario el estudio del comportamiento de estos mediante un ensayo a compresión. Cabe destacar que las otras técnicas de comportamiento mecánico anteriormente aplicadas, como el ensayo de ultrasonidos, microdureza, rayado y desgaste, no se emplearon debido a la dificultad de medida que presentan los sustratos atacados, consecuencia de la pérdida de integridad estructural por el gran aumento de la porosidad y de la rugosidad.

La disminución de las propiedades mecánicas de los sustratos con el tamaño de poro y el tiempo de ataque se corrobora al observar la Figura 64. Las gráficas muestran mucha menor resistencia para los sustratos atacados de 250-355 μm de rango de tamaño de espaciador, aunque el tiempo de ataque no presenta grandes diferencias en cuanto a la integridad estructural de las muestras.

La Figura 113 permite comparar las diferencias en el comportamiento mecánico a compresión, tanto entre los diferentes sustratos porosos vírgenes, como entre éstos y sus correspondiente atacados químicamente. En ella se revelan las mayores resistencias mecánicas de los sustratos porosos sin atacar, como era de esperar. Los sustratos porosos atacados de menor rango de tamaño de espaciador presentan mayores resistencias que sus análogas de 250-355 μm , así como mayores valores para el tiempo de ataque menor (125 s), como cabe esperar. Estos hechos están relacionados con tanto con la mayor porosidad como por aumento del tamaño y el redondeamiento de los poros.

Por su parte, las muestras atacadas de 250-355 μm presentan curvas similares entre ellas. Esto se traduce en que, de manera cualitativa, el tiempo de ataque influye más en la muestra porosa de 100-200, implicando una disminución de la resistencia mecánica, mientras que la de mayor rango de tamaño de espaciador no presenta gran variación en su comportamiento mecánico.

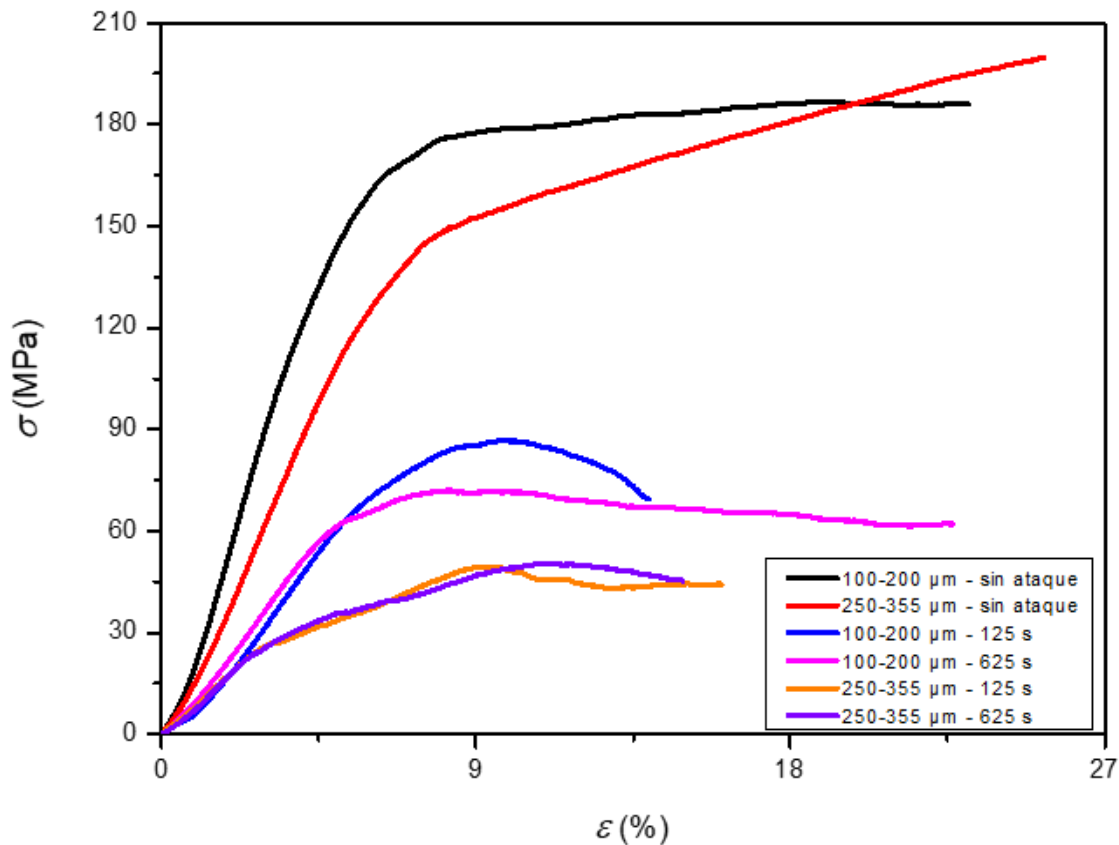


Figura 113. Curvas tensión (σ) - deformación (ε) obtenidas por el ensayo de compresión para los sustratos porosos de titanio con rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm , vírgenes y atacados por inmersión a 125 y 625 s. Ensayo realizado bajo la norma ASTM E9-09 [244].

En cuanto al límite de fluencia, se observan valores similares para un mismo tipo de sustrato. Sin embargo, se aprecia una disminución clara del límite de fluencia (σ_y) con relación a los resultados obtenidos para los sustratos vírgenes (Tabla 46), como consecuencia de un aumento de la P_T . El límite de fluencia σ_y , además, depende del tamaño de poro, mostrando valores más bajos conforme el D_{eq} medio aumenta.

Capítulo 4

Tabla 46. Comparación del límite de fluencia de las muestras porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador 100-200 y 250-355 μm , antes y tras ser atacadas químicamente por inmersión a 125 y 625 s. Límite de fluencia (σ_y) calculado por la norma convencional ASTM E9-9.

	Límite de fluencia, σ_y (MPa)		
	0 s	125 s	625 s
100-200 μm	126.9	60.0	62.0
250-355 μm	117.8	23.0	22.0

Tras las caracterizaciones llevadas a cabo, se confirma que las variaciones microestructurales y topográficas llevadas a cabo mediante el ataque químico conllevan una modificación severa de la superficie y porosidad de los sustratos, en términos de volumen y de morfología. Asimismo, se produce una disminución de las propiedades mecánicas con el aumento del tiempo de ataque. Por tanto, el ataque químico, potencialmente mejora factores que favorecen la osteointegración, pero empeora su comportamiento mecánico.

Tras la caracterización llevada a cabo, es necesario el estudio de viabilidad biológica de los sustratos atacados. Varios estudios han reportado que la topografía, química y la energía superficial de los biomateriales metálicos tienen una gran influencia en la adhesión celular inicial y en el proceso de diferenciación osteoblástica [261, 262]. Además, está recogido en la literatura que el incremento en los valores de rugosidad tras el ataque químico o el anodizado conllevan un incremento del área superficial, mejorando así los procesos de adhesión y diferenciación celular [263, 264].

La Figura 65 muestra, en general, una mayor actividad metabólica tras 24 h de cultivo a mayor tiempo de ataque. Además, se observa una actividad metabólica más notable para los sustratos denso y poroso de 250-355 μm atacados por inmersión a 625 s. Por su parte, el sustrato de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador presentó un comportamiento con niveles similares para ambos tiempos de ataque. Sin embargo, el sustrato con mayor actividad metabólica entre

los sustratos atacados por inmersión a 125 s fue el de 100-200 μm , mientras para 625 s fue el de 250-355 μm .

Tras 4 días de cultivo, los sustratos presentaron tendencias distintas (Figura 66). En concreto, la muestra de mayor rango de tamaño de espaciador mostró los niveles más altos para el tiempo de ataque por inmersión de 125 s, seguida por el sustrato de 100-200 μm atacado a 625 s. En el caso de las probetas densas, los valores fueron similares para ambos tiempos de ataque. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Chang et al., quienes cultivaron células madre mesenquimales sobre superficies de titanio con un 70 % de porosidad. De igual forma, aunque la densidad celular tras 24 h resultó ser baja, ésta aumentó debido a la migración y proliferación tras 4 días de cultivo [265].

En general, las muestras atacadas por inmersión a ambos tiempos tras 7 días de cultivo no obtuvieron grandes diferencias al compararlas entre sí (Figura 67). Destaca la muestra porosa de 100-200 μm , ya que presentó valores similares para ambos tiempos de ataque. Por otro lado, también es interesante remarcar la disminución de actividad metabólica del sustrato de 250-355 μm , atacado a 625 s.

Por último, la actividad metabólica celular sobre los sustratos de titanio tras 10 días de cultivo (Figura 68), muestra, en general para todas las muestras atacadas, unos niveles mayores de proliferación para el tiempo de ataque de 125 s. Adicionalmente, revela la mayor proliferación para la muestra densa atacada a 125 s. En lo referente a las muestras porosas, sin embargo, los niveles más altos se centraron en aquéllos atacados durante 125 s, siendo mayor para el sustrato de menor rango de tamaño de espaciador. Los resultados obtenidos tras 10 días de cultivo no revelan diferencias significativas para el sustrato de los del sustrato de 250-355 μm , atacado a 625 s al ser comparado con 7 días de cultivo.

Si se analiza la adhesión celular, así como la proliferación, medidas mediante los niveles de actividad metabólica que presenta cada tipo de sustrato (estado virgen y atacado químicamente por inmersión a 125 y 625 s), se observa, a grandes rasgos (Figura 114, Figura 115 y Figura 116), que si se comparan las muestras atacadas a

Capítulo 4

125 s con sus correspondientes vírgenes, estos niveles también resultan ser superiores en el caso de los sustratos porosos vírgenes. En cuanto a los tiempos de ataque, los mayores resultados se obtienen para las muestras atacadas a 125 s frente al ataque a 625 s, tras 10 días de cultivo en todos los casos. Esto implica que, el ataque por inmersión a 625 s puede considerarse demasiado agresivo, generando una rugosidad adicional quizás demasiado pequeña para que las células consigan una buena adhesión.

Esto último se confirma en las curvas de la Figura 114, Figura 115 y Figura 116, donde se ilustran las tendencias de proliferación celular en función del tiempo de ataque para cada sustrato. En general, se observan los mejores resultados para el tiempo de ataque de 125 s, de forma que la proliferación aumenta considerablemente conforme avanzan los días de cultivo. Por el contrario, el tiempo de ataque a 625 s presenta, para todos los sustratos estudiados, una proliferación más lenta a lo largo de los días de cultivo, obteniendo unos valores finales menores. El motivo puede ser la obtención de una rugosidad que no es la adecuada para que las células se adhieran al sustrato, por tratarse de un ataque más agresivo, como se comentó anteriormente.

En cuanto a las muestras vírgenes, las tendencias observadas no son claras. Mientras que para la muestra densa, como cabe esperar debido a su superficie pulida, los niveles de proliferación crecen de forma más lenta y son menores (Figura 114), para la muestra porosa de 250-355 μm se aprecia un comportamiento contrario, alcanzando mayores niveles y de manera más rápida que la muestra atacada a 125 s (Figura 116). Con respecto al sustrato de menor rango de tamaño de espaciador (Figura 115), la curva revela una proliferación más lenta que para las muestras atacadas químicamente durante 7 días de cultivo, alcanzando en la fase final (10 días), niveles similares a los obtenidos tras el ataque a 125 s.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que los sustratos vírgenes, con la excepción del denso, poseen una rugosidad adecuada para la proliferación de bacterias. Sin embargo, los niveles de proliferación se ven mejorados tras el tratamiento químico por inmersión de las muestras a 125 s, obteniendo un crecimiento más rápido durante los días de cultivo.

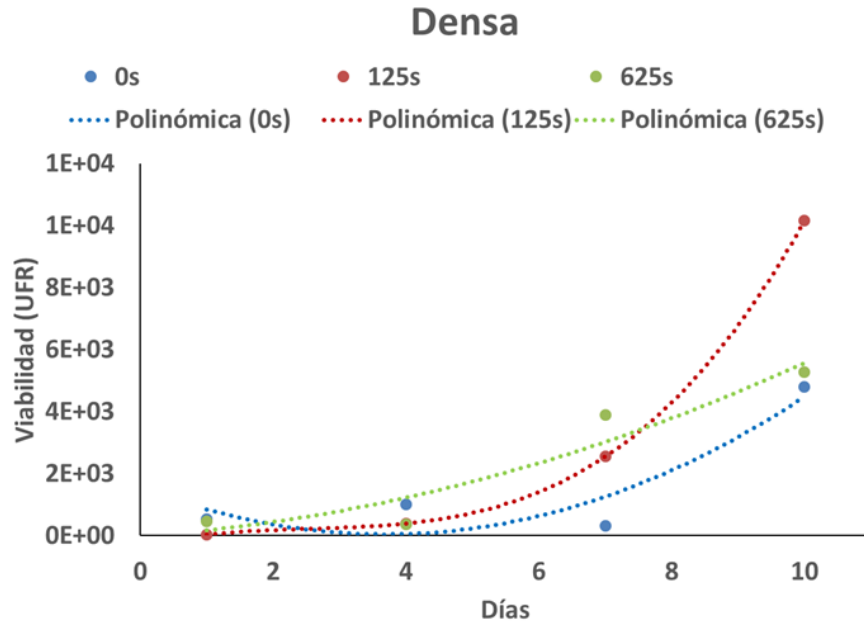


Figura 114. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre el sustrato denso virgen, y atacados por inmersión a 125 s y a 625 s respectivamente.

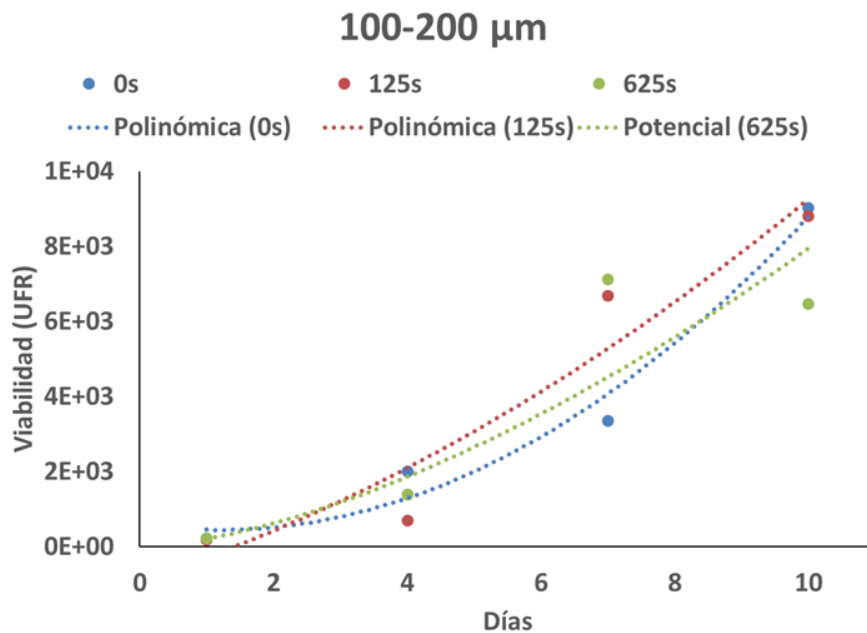


Figura 115. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre el sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador virgen, y atacados por inmersión a 125 s y a 625 s respectivamente.

Capítulo 4

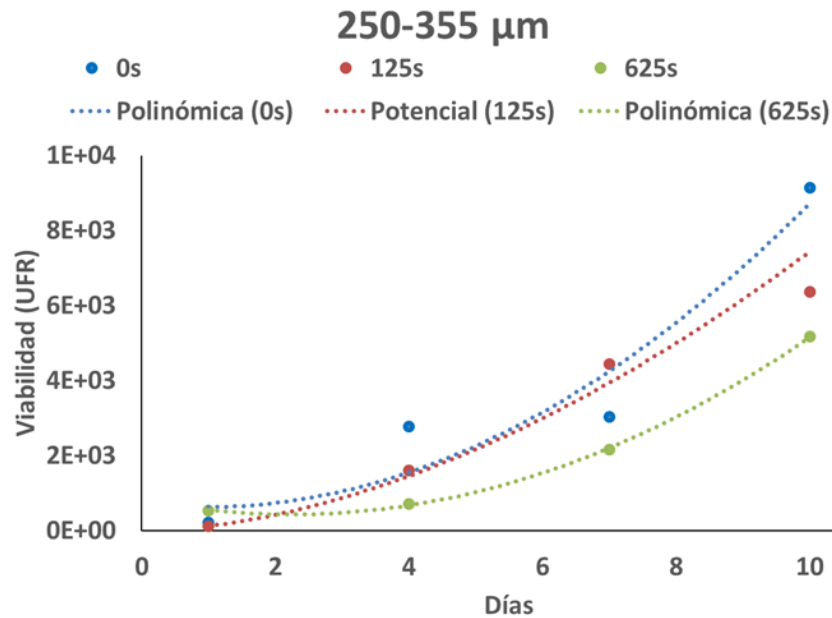


Figura 116. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre el sustrato poroso de 250-355 µm de rango de tamaño de partícula de espaciador virgen, y atacados por inmersión a 125 s y a 625 s respectivamente.

En relación con las imágenes obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia, se muestran tendencias similares a las observadas para los sustratos vírgenes. En la etapa de adhesión celular (Figura 69), se manifiesta una mayor densidad celular para el sustrato denso frente a los porosos, para el tiempo de ataque de 125 s. Por el contrario, el resto de los sustratos atacados (625 s), muestran niveles de densidad celular similares. Este hecho, observado previamente en los cultivos con C2C12-GFP de los sustratos vírgenes, indica una vez más que las células se adhieren tras 24 h a los sustratos porosos, pero de manera deficiente, debido a la pérdida en la siembra. Sin embargo, la densidad celular aumenta considerablemente tras el estudio de proliferación (Figura 70). En concreto, se observa un mayor crecimiento de las células en el interior y en el borde de los poros para las ambas muestras porosas atacadas a 125 s, destacando también el sustrato poroso de 250-355 µm de rango de tamaño de espaciador atacado a 625 s. Puede establecerse que, en cuanto al tiempo de ataque, no se aprecian grandes diferencias para el sustrato con mayor tamaño de partícula de espaciador. Sin embargo, para el de 100-200 µm, se muestra una mayor densidad celular a 125 s.

Al comparar los resultados por microscopía de microscopía de fluorescencia invertida de los sustratos atacados con sus análogos vírgenes (Figura 46), se confirma lo expuesto anteriormente: los mayores niveles de densidad celular, y, por tanto, de proliferación, se obtienen para las muestras vírgenes y para los sustratos atacados a 125 s.

En relación con la morfología, se observa que, tras 24 h, las células depositadas en el sustrato macizo presentan una forma más irregular, manifestando la adhesión a la superficie de éste. Sin embargo, las muestras porosas muestran células más redondeadas y desenfocadas, sin influencia del tipo de ataque. Este hecho corrobora que la adhesión aún no ha sido completa, de manera que es posible encontrar las células en el fondo del pocillo o bien dentro de los poros, tal y como ocurre en los sustratos vírgenes previamente estudiados.

Por el contrario, tras 7 días de cultivo, en ambos tipos de sustratos porosos atacados, las células presentan una morfología de tipo fibroblástica, consecuencia de que se han adherido a la superficie de las muestras y han adecuado su forma a la topografía de esta. En este caso, las células desenfocadas se aprecian dentro de los poros, confirmando así la potencialidad de los sustratos porosos para mejorar el *bone in-growth*. En este contexto, el sustrato con mayor rango de tamaño de espaciador (250-355 μm), muestra considerablemente más células desenfocadas que el de menor rango (100-200 μm). Tras esto, se puede afirmar que un mayor tamaño de poro permite una mayor infiltración del tejido óseo en el interior del implante.

En general, las tendencias son similares entre los sustratos antes y después del ataque químico, presentando una densidad celular menor tras 24 h de cultivo para los sustratos porosos como consecuencia del proceso de siembra. Sin embargo, la modificación superficial de los sustratos de titanio mediante ataque químico conlleva una mejora en la adhesión, proliferación y diferenciación celular con respecto a las muestras vírgenes. En concreto, el ataque químico a 125 s favorece la biocompatibilidad celular, mientras que el de 625 s mejora la diferenciación de osteoblastos. Adicionalmente, se ha constatado que el tamaño de poro tiene

Capítulo 4

influencia en el comportamiento de las muestras atacadas (Figura 118 y Figura 119), mientras que es un parámetro no determinante en los sustratos vírgenes (Figura 117).

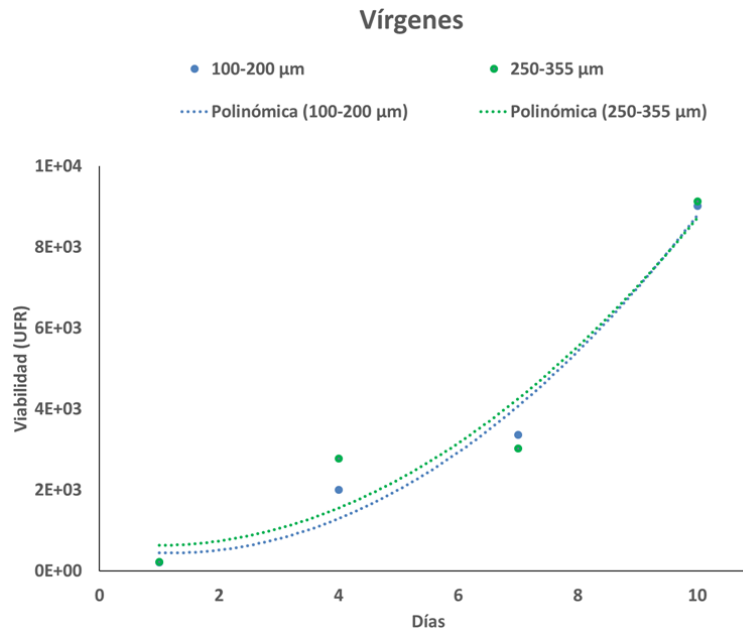


Figura 117. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm vírgenes.

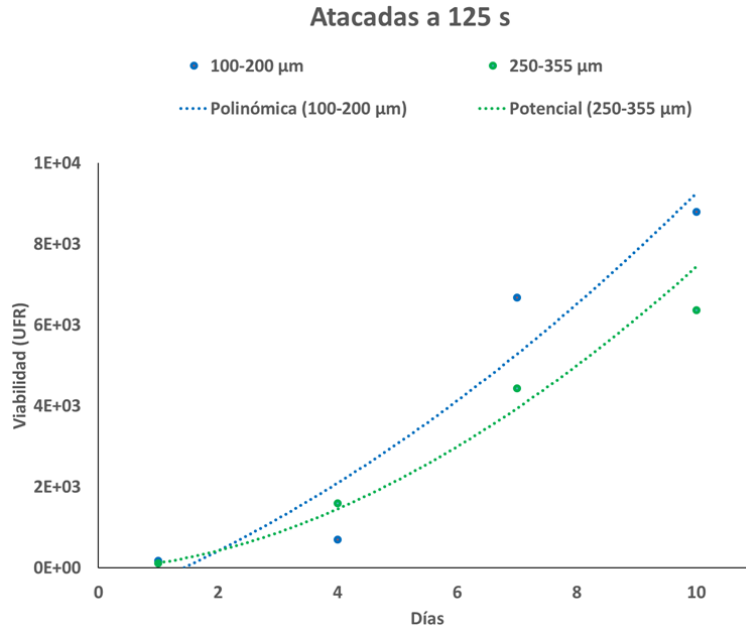


Figura 118. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm atacados por inmersión a 125 S.

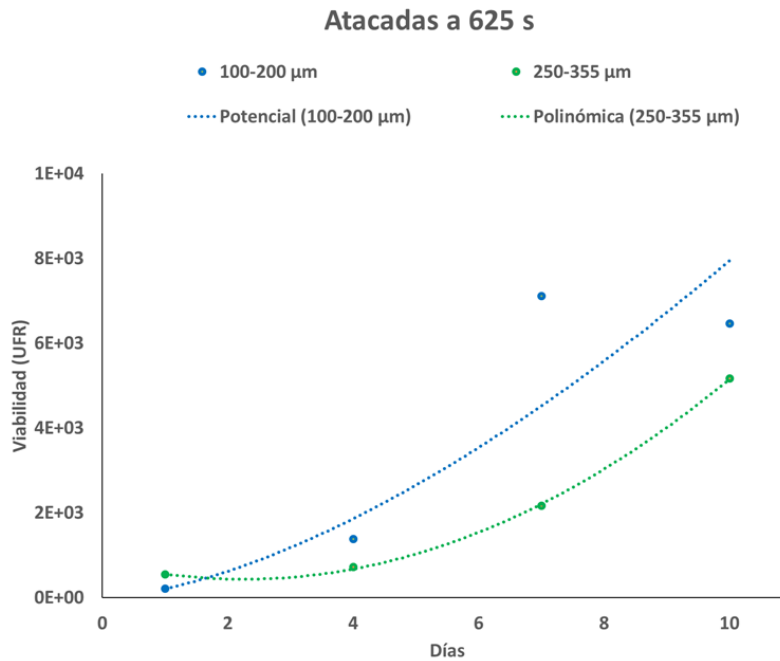


Figura 119. Adhesión tras 24h y evolución de la proliferación celular tras 4, 7 y 10 días de cultivo sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm atacados por inmersión a 625 S.

Capítulo 4

En este caso, los resultados muestran que, un menor tamaño de poro origina mayores niveles de proliferación celular en los sustratos atacados para ambos tiempos de ataque (125 y 625 s), lo que se facilitaría una mayor infiltración del tejido óseo en el interior del implante. Sin embargo, en cuanto a los vírgenes, los niveles de proliferación son similares para ambos tipos de muestra, no influyendo así el tamaño de poro en el comportamiento celular.

4.2.2. Recubrimientos cerámicos bioactivos

El empleo de los recubrimientos como la HA y el BG tienen el objeto de transformar las superficies de bioinertes a bioactivas, promoviendo en ambos casos la formación de HA.

La HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es un fosfato cálcico cuya composición y estructura son muy similares a las del hueso, como se ha comentado anteriormente. Está formada por una relación Ca/P semejante a la del componente inorgánico de la matriz ósea, por lo que resulta ser un acelerador en la formación de tejido óseo. Es por ello que, resulta ser un material altamente atractivo para las aplicaciones biomédicas.

Viabilidad y efectividad del uso de la técnica de sol-gel como ruta para deposición de hidroxiapatita sobre sustratos porosos

En la presente Tesis, se estudia el sistema sustrato de titanio poroso recubierto con HA, con el fin de mejorar la osteointegración. Por ello, dicha combinación se estudia de forma análoga a los sustratos vírgenes, caracterizando el recubrimiento de manera microestructural y tribomecánica, con el fin de evaluar la homogeneidad, adhesión e integridad del recubrimiento. Es necesario mencionar la ausencia del estudio de la muestra densa recubierta con HA, debido a la falta de adhesión y de puntos de agarre sobre la superficie pulida de la misma.

La Figura 72 muestra los espectros correspondientes a EDX de cada tipo de sustrato poroso recubierto. En ambos se detectan los elementos principales por excelencia de la HA: Ca, P y O. Cabe destacar que los picos de todos los elementos son más intensos para el sustrato poroso de 100-200 μm de rango de tamaño de

partícula de espaciador (43 ± 3 % para Ca, 11 ± 2 % para P y 46 ± 3 % de O en peso), evidenciando un posible mayor espesor del recubrimiento en la zona analizada. La razón puede ser haber realizado el análisis en una zona de mayor acumulación de recubrimiento, ya que es más irregular. Adicionalmente, cabe destacar la ausencia de picos de otros elementos o del sustrato metálico, confirmando así la continuidad del recubrimiento. No se ha podido comprobar la relación Ca/P obtenida sea cercana a la relación Ca/P de la HA en el cuerpo humano (1.67), ya que no ha sido posible cuantificarla.

El ion fosfato es el principal componente molecular de la HA, siendo así el más empleado para su caracterización estructural. Existen cuatro modos de vibración según la literatura para este ion: ν_1 (961 cm^{-1}), ν_2 ($475\text{--}440 \text{ cm}^{-1}$), ν_3 ($1190\text{--}976 \text{ cm}^{-1}$) y ν_4 ($660\text{--}520 \text{ cm}^{-1}$) (Fowler, 1974). Las bandas características de la vibración antisimétrica P-O-P, las cuales definen de forma acertada la HA, se encuentran entre los $500\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$ [266-270].

Los espectros FTIR de las muestras porosas recubiertas se detallan en la Figura 73. En ambos espectros se observan las bandas anteriormente mencionadas, de forma que se manifiesta el ordenamiento de los poliedros de PO_4^{3-} en la estructura del cristal, y, por tanto, la formación de HA cristalina tras el tratamiento térmico del recubrimiento. La vibración ν (OH^-) se observa a 3572 cm^{-1} y a 632 cm^{-1} .

La HA estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ en su forma más común, presenta estructura hexagonal. La principal diferencia entre ella y la apatita biológica radica en que alrededor de un 5 y 6 % en peso, correspondiente a los iones CO_3^{2-} , se sustituyen por cualquiera de los grupos PO_4^{3-} u OH^- [271]. Durante el proceso de obtención del sol-gel de HA, se detecta la presencia de las bandas del ion CO_3^{2-} a 1400 cm^{-1} , indicando así la formación de HA carbonatada o CaCO_3 , sin que llegue a constituir una impureza para la aplicación biomédica del material [272-274].

La elevada cristalinidad obtenida tras el tratamiento térmico del recubrimiento de HA sobre ambos tipos de sustratos porosos se muestra en los difractogramas de XRD de la Figura 74. Este hecho evidencia la importancia de la temperatura (450°C) en

Capítulo 4

el tratamiento, ya que a temperaturas más bajas la morfología resultó ser distinta según la literatura [275, 276]. Los picos que aparecen, en 25.93° (002), 31.82° (211), 32.27° (112), 32.99° (300) y 49.58° (213), son característicos de la fase de HA, mostrando la concordancia de estos con los patrones de la cartoteca *PCPDFWIN v. 2.4 # 09-0432*, sin detectarse picos de fosfatos de calcio correspondientes a otras fases. La fase de CaCO_3 por su parte, corresponde a la calcita según la cartoteca *PCPDFWIN v. 2.4 # 86-2343*, reforzando así los resultados obtenidos en la caracterización FTIR.

Todo lo anterior confirma que las capas de HA evolucionaron de amorfo a cristalino [277, 278]. Landi y col. [279] determinaron una ecuación para el cálculo de la fracción de fase cristalina (χ_c) en la HA (Ecuación 2)

$$\chi_c = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}}$$

Ecuación 2. Cálculo de la fracción de fase cristalina (χ_c) en la HA

Siendo $V_{112/300}$ la intensidad del valle entre los picos de los planos (112) y (300) e I_{300} la intensidad del pico de difracción del plano cristalográfico (300) para la HA. En el caso de los recubrimientos de HA preparados por vía sol-gel sobre ambas muestras de titanio poroso, el grado de cristalinidad calculado a partir de los difractogramas obtenidos de la Figura 74, se encuentra entre el 83 y 87 %.

La Figura 75 muestra las micrografías SEM del recubrimiento de HA sobre los sustratos porosos de titanio. El recubrimiento se infiltra a través de los poros, llegando incluso a cubrir la totalidad de gran parte de ellos (ver Figura 75 a y c). Se muestra la formación de agregados policristalinos en forma de racimos, estructura típica de la HA. Además, se observa un recubrimiento homogéneo, con una morfología sin discontinuidades ni presencia de grietas. Sin embargo, a mayores aumentos (Figura 120), se aprecia que el recubrimiento presenta una microporosidad y cierta heterogeneidad, revelando posibles puntos preferenciales de nucleación para la precipitación de HA en presencia de fluido fisiológico. Esto se debe a la morfología y rugosidad del recubrimiento, así como a la propia existencia

de poros bajo el mismo, de forma que se puede potenciar una mejor adherencia y unión implante-hueso.

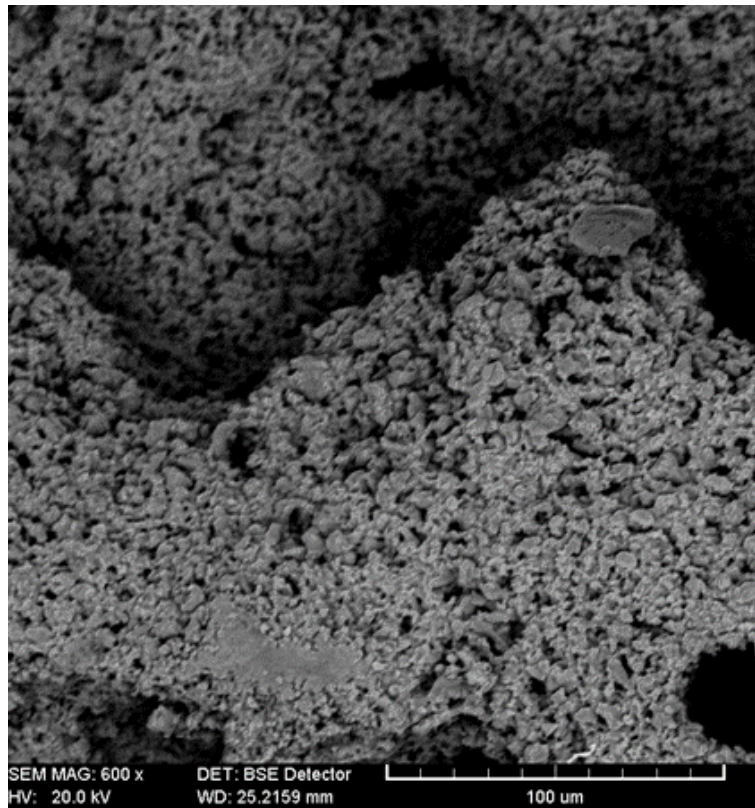


Figura 120. Micrografía SEM de la superficie del recubrimiento de HA mediante la técnica de sol-gel del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 250-355 µm.

Las topografías de microscopía confocal en 3D (Figura 75 b, d) dibujan una superficie bastante rugosa, ya que en ciertas zonas se produce una mayor acumulación de HA con respecto a otras, reforzando lo observado en las imágenes SEM a mayores aumentos. En concreto, el sustrato de 100-200 µm de rango de tamaño de partícula de espaciador presenta un recubrimiento más irregular, en términos de acumulación de partículas de HA y de poros en los que no hay una infiltración total del recubrimiento. Esta heterogeneidad se traduce en variaciones en el espesor, en la micro-porosidad comentada anteriormente y en la acumulación de “escombros” como consecuencia de desconche en ciertas zonas. Este desconche o *chipping* puede deberse a la diferencia del coeficiente térmico de expansión (*thermal expansion coefficient*, TEC) entre sustrato y recubrimiento.

Capítulo 4

La Figura 121 muestra un corte transversal del sustrato poroso de titanio de menor rango de tamaño de espaciador, recubierto con HA. En la imagen se observa que los poros de la superficie quedan totalmente recubiertos por la capa de HA, formada por aglomeraciones de partículas unidas entre sí, originando la porosidad del recubrimiento mencionada anteriormente.

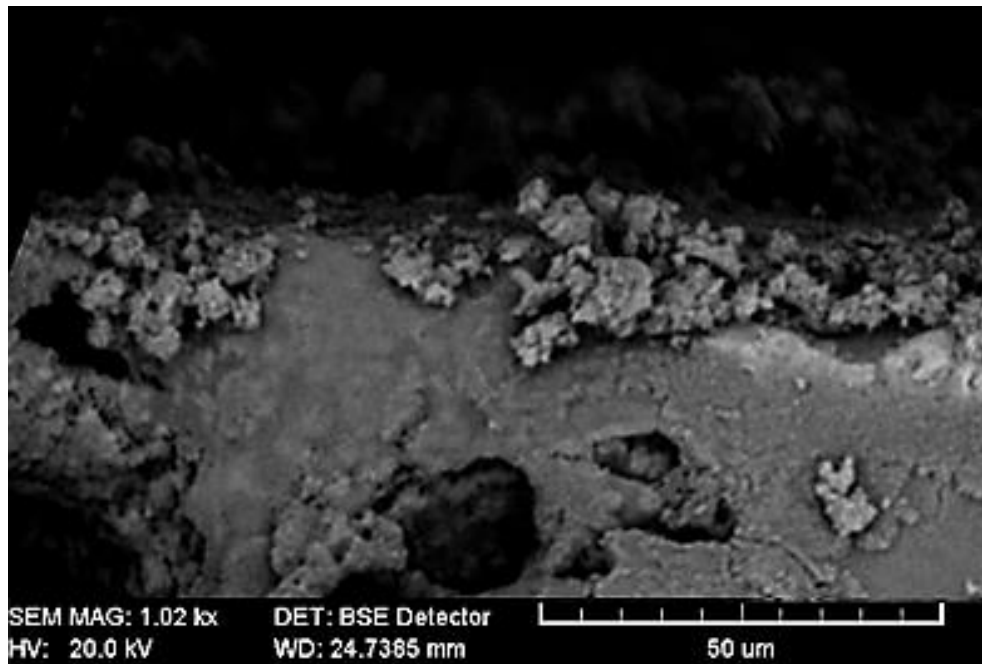


Figura 121. Micrografía SEM del corte transversal del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm recubierto con HA mediante la técnica de sol-gel a gran aumento.

La irregularidad de la topografía del sistema sustrato-recubrimiento de HA se pone de manifiesto de manera cuantitativa en la Tabla 30, la cual expone los parámetros de rugosidad principales para cada tipo de sustrato recubierto. Al comparar dichos parámetros con los análogos de los sustratos vírgenes (Tabla 19), se aprecian tendencias distintas en función del tipo de sustrato. Estas diferencias se ilustran mediante el parámetro de rugosidad aritmética S_a (Tabla 47), tratando de caracterizar separadamente la parte plana de la parte porosa de la superficie de los sustratos porosos. Sin embargo, en el caso de las muestras porosas con recubrimiento de HA no ha sido posible diferenciar entre zona porosa y zona plana, debido a que muchos de los poros quedan totalmente cubiertos por el recubrimiento.

Tabla 47. Parámetro de rugosidad S_a , obtenido por microscopía confocal láser de las superficies vírgenes y recubiertas por HA de los sustratos porosos de Ti, en función del tamaño de espaciador y la zona estudiada.

		S_a (μm)	
		Virgen	Recubierta con HA
100-200 μm	plana	5.0	31.9
	porosa	15.5	
250-355 μm	plana	3.4	23.2
	porosa	30.8	

Los sustratos vírgenes muestran unos parámetros de rugosidad de la muestra de 250-355 μm de valor mayor que para la de 100-200 μm . No obstante, una vez que se deposita el recubrimiento, éstos presentan unos valores más suavizados que el sustrato poroso de 100-200 μm . Esto puede deberse a que las partículas del recubrimiento se distribuyen de forma más homogénea en los poros de mayor tamaño, mientras que en los más pequeños cubre la totalidad de algunos y otros los deja semivacíos. Por tanto, los valores de rugosidad resultan ser más acusados para el sustrato de menor tamaño de partícula de espaciador.

Al igual que se ha procedido anteriormente, es necesario el estudio del comportamiento micro-mecánico del sistema. La Tabla 31 recoge los valores de microdureza Vickers sobre las muestras porosas recubiertas con HA. Se observa con tendencia clara, que dichos valores aumentan para cargas mayores, al contrario que ocurría en los sustratos vírgenes (Tabla 48).

La dureza de la HA, según la literatura [10, 107], se sitúa entre los 1-7 GPa, siendo menor que la del titanio (≈ 9.7 GPa). Este hecho explica los resultados obtenidos en el ensayo, ya que a bajas cargas (HV0.3) se evalúa únicamente el recubrimiento de HA realizado, mientras que a mayores cargas (mayor penetración) tiene lugar la influencia del sustrato de titanio sobre el sistema.

Capítulo 4

Tabla 48. Valores de microdureza Vickers para cargas HV0.3 y HV1 sobre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, vírgenes y recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.

		HV0.3	HV1
Virgen	100-200 μm	401 \pm 4	167 \pm 28
	250-355 μm	356 \pm 25	152 \pm 28
Recubiertas con HA	100-200 μm	279 \pm 77	360 \pm 72
	250-355 μm	427 \pm 92	576 \pm 63

Atendiendo a las diferencias entre ambos sustratos, se observa que la dureza aumenta en ambos casos para el mayor tamaño de partícula de espaciador. La razón podría estribar en que, a mayor tamaño de partícula, se produce una mayor infiltración y adherencia del recubrimiento sobre los poros, dando lugar a un espesor de HA menor que permite una mayor influencia de la matriz de titanio al ejecutar el ensayo.

No obstante, comparando los valores obtenidos con la microdureza correspondiente a los sustratos vírgenes (Tabla 48), se observan tendencias contrarias, además de resultados menores para estas últimas. En este contexto, cabe destacar la dificultad para medir las huellas sobre el recubrimiento, dando lugar a grandes desviaciones para el caso del sistema titanio-HA y conllevando que la comparación entre las muestras antes y después del recubrimiento no sea suficientemente fiable.

Los ensayos de resistencia al rayado se han realizado buscando dos objetivos principales: evaluar la adherencia del recubrimiento de HA sobre el sustrato (carga incremental) y la homogeneidad del recubrimiento (carga constante).

El ensayo de rayado a carga incremental revela una tendencia lineal para ambos tipos de sustratos porosos, de forma que, a mayor carga aplicada, mayor penetración en el sistema sustrato-recubrimiento tiene lugar, como cabía esperar (Figura 76). Se observan variaciones más bruscas para el sustrato de menor tamaño de partícula de espaciador. Esto se debe a que existe un mayor número de poros por unidad de longitud, estando más separados para el sustrato de 250-355 μm . En cuanto a las variaciones en el perfil, en general, se deben al arrastre de material que tiene lugar cuando se ejecuta el rayado, en concreto, el arrastre de las

partículas que forman parte del recubrimiento. Las gráficas (Figura 76) muestran una mayor resistencia al rayado para el sustrato recubierto de mayor tamaño de poro (menor penetración durante el ensayo de rayado a carga incremental), reforzando los resultados de micro-indentación Vickers (menor espesor del recubrimiento de HA, mayor influencia de la matriz metálica para el sustrato de menor rango de tamaño de espaciador).

Debido a que a grandes cargas se evalúa el sustrato de titanio (la penetración es mayor que el espesor del recubrimiento) y a un recubrimiento poroso que conlleva una adherencia incompleta, se realizaron ensayos de rayado a carga constante de 3 N, de forma que fuera posible evaluar en su mayor parte el recubrimiento.

La Figura 77 también muestra, en la pre-palpación, un recubrimiento de HA mucho más homogéneo para la muestra de mayor rango de tamaño de partícula de espaciador, como se ilustró anteriormente. De forma cuantitativa, estos mismos resultados se pueden observar en los parámetros de rugosidad del perfil, donde los valores son ligeramente superiores para la muestra de 100-200 μm . Esta misma tendencia es la trazada por los parámetros de rugosidad de la Tabla 30, obtenidos por microscopía confocal.

En cuanto a la penetración permanente, la topografía resulta ser de nuevo mucho más abrupta para el caso del tamaño de espaciador de 100-200 μm , ya que hay un mayor número de poros por unidad de longitud bajo la capa de HA que se ha depositado, dejando entrever que la infiltración del recubrimiento en los poros de este tamaño es menor. Como consecuencia, los parámetros de rugosidad de la Tabla 32 resultan ser mayores para el menor tamaño de poro. La Figura 78 muestra por su parte la recuperación elástica que experimentan ambos sistemas de sustrato poroso de titanio – recubrimiento. En general, la penetración in situ durante el rayado, así como la permanente (Figura 122), resultan ser mayores para el tamaño de partícula de espaciador de 250-355 μm . De nuevo, la explicación se debe a un menor espesor y una mayor homogeneidad del recubrimiento. Es por ello, que la recuperación elástica en esta combinación resulta ser algo menor (Tabla 33), como consecuencia de una mayor influencia del recubrimiento cerámico frente al sustrato

Capítulo 4

metálico. Por el contrario, en el caso del tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm , la heterogeneidad del recubrimiento de HA conlleva una mayor recuperación elástica en términos generales, como consecuencia de que la matriz metálica presenta menor rigidez que la HA (cerámica).

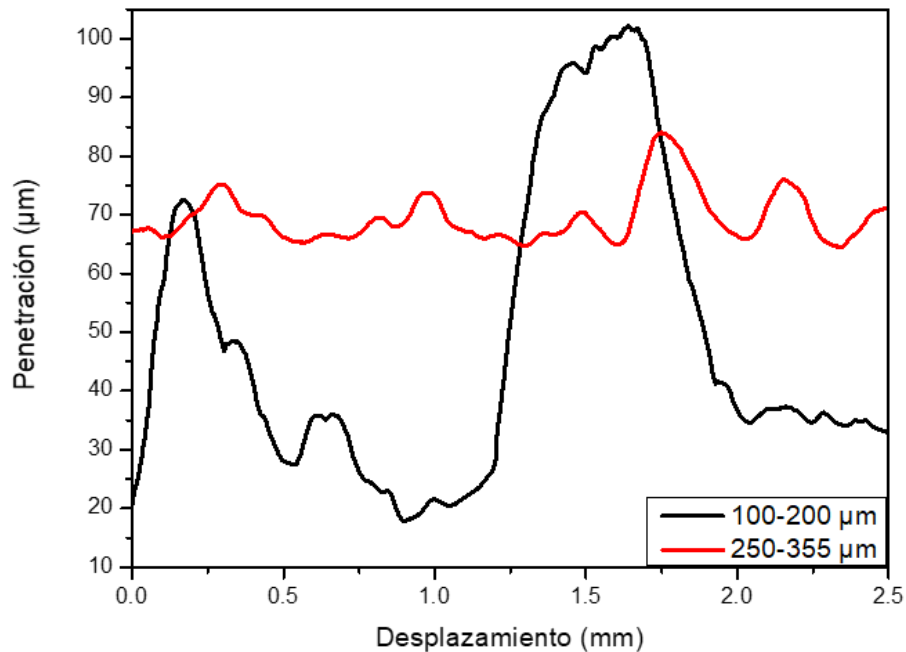


Figura 122. Penetración permanente de los sustratos porosos de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm y 250-355 μm recubiertos de HA mediante la técnica de sol-gel.

Atendiendo a las diferencias entre sustrato virgen y sustrato recubierto para el tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm (Tabla 49), se observa una topografía más rugosa para las muestras con la capa de HA, como cabría esperar frente a un sustrato pulido, debido a la propia naturaleza de la HA (rugosa), la acumulación de las partículas de HA en ciertas zonas de la muestra y a la infiltración del recubrimiento en los poros. Frente a la penetración permanente y a la recuperación elástica, se obtienen diferencias no esperadas, debido a la rigidez de la HA como material cerámico frente a la matriz metálica. Sin embargo, esto se debe a diversos factores: en primer lugar, el recubrimiento depositado es altamente poroso, con una fracción volumétrica de poros mayor que la de los discos porosos de titanio, de manera que las propiedades mecánicas del recubrimiento son mucho

Discusión de resultados

menores que las del sustrato; por otro lado, al realizar el ensayo de rayado parte del recubrimiento se desprende, penetrando más el indentador. De igual forma, al desprenderse el recubrimiento, es posible arrastrar más material y que se produzcan ciertas acumulaciones, de forma que se falseen los datos de recuperación elástica cuando se comparan con los sustratos vírgenes.

Tabla 49. Comparación de los parámetros de rugosidad de la topografía, valor medio de penetración permanente y recuperación elástica (RE) del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm .

100-200 μm	Prepalpación				Penetración permanente (μm)	RE (μm)
	R_a (μm)	R_q (μm)	R_y (μm)	R_z (μm)		
Virgen	4.9	5.2	32.5	32.5	4.9	4.0
Recubrimiento de HA	15.6	18.4	59.8	59.8	36.0	11.9

Tras esta discusión, se valida la técnica de sol-gel como medio para depositar recubrimientos de HA, así como el tratamiento térmico de la HA depositada a 450 °C, obteniéndose un recubrimiento poroso y adherido a la superficie del sustrato de titanio, en el que la estructura de la HA resulta ser cristalina. Esta adhesión de la HA se debe a una unión mecánica, en el que los poros funcionan como puntos de anclaje, así como a cierta unión química. No obstante, se observan mejores propiedades mecánicas para el menor tamaño de poro (100-200 μm), como consecuencia de una mayor influencia del sustrato metálico poroso frente a la cerámica depositada.

El recubrimiento de HA ejerce un doble papel: por un lado, previene la corrosión del sustrato, ya que reduce la liberación de iones metálicos; en segundo lugar, convierte la superficie inerte en una superficie con un recubrimiento bioactivo, promoviendo así la adherencia del hueso.

Capítulo 4

Capacidad de la técnica de sedimentación por goteo para depositar recubrimientos de vidrios bioactivos: relación entre los parámetros del proceso y las propiedades de las capas de BG

En esta ruta propuesta para la mejora de la osteointegración, las partículas del BG 45S5 se depositaron en forma de capas sucesivas, lo que permitió el estudio y optimización de distintos sistemas recubrimiento de BG – sustrato de titanio. Otros parámetros principales para tener en cuenta en la obtención de un recubrimiento con buena integridad estructural son los relativos al tratamiento térmico al que se somete el sistema. En la presente tesis doctoral, siguiendo experiencias previas, se utilizó una rampa para el proceso de sinterizado de las partículas de BG de hasta 820 °C, manteniendo esta temperatura durante 5 s en condiciones de alto vacío.

La optimización del recubrimiento, como se ha mencionado anteriormente, tuvo como objetivos principales la consecución de la homogeneidad de éste al sustrato, de una correcta capacidad de infiltración hacia el interior de los poros, así como adherencia y una integridad microestructural adecuada, sin presencia de grietas o de desconche (*cracking* y *chipping*).

Se evaluaron los sustratos denso y porosos de titanio con distinto rango de tamaño de partícula de espaciador y la deposición de diversas capas de recubrimiento, como muestra las macrografías de la Figura 79, realizándose hasta tres capas.

En las macrografías se puede observar la influencia de las variables anteriormente mencionadas (sustrato y número de capas). Se aprecia cómo a medida que aumenta del número de capas, se consigue una mayor homogeneidad e infiltración del recubrimiento a través de los poros de la matriz de titanio, en especial para el sustrato poroso de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm . En cuanto a la adhesión del BG sobre los sustratos de titanio, resulta ser mejor para los sustratos porosos una vez se ha realizado el tratamiento térmico, debido a la no presencia de grietas ni de desconches en el recubrimiento, no ocurriendo lo mismo para el caso del denso. Este hecho se debe principalmente a dos factores. Por un lado, a la diferencia de coeficiente de expansión térmica (TEC) entre sustrato y

recubrimiento, de manera que la presencia de grietas en el sustrato denso es inevitable. En segundo lugar, a los puntos de anclaje que presentan los sustratos porosos frente a los densos, como consecuencia de la rugosidad de las paredes de los poros y de la interconectividad entre los mismos [36, 52, 58].

Por otro lado, la heterogeneidad de la topografía del recubrimiento disminuye conforme aumenta el número de capas, ya que las partículas de BG se van depositando unas sobre otras. Este efecto resulta ser mayor para los sustratos porosos de titanio, debido a que dichas partículas van rellenando los poros hasta cubrirlos en su mayor medida. Por ello, la cantidad de BG que queda depositada es mayor en los sustratos porosos que en el denso, de forma que es posible esto promoverá una mayor formación de HA tras sumergir los sustratos en SBF, como se verá en apartados posteriores de la presente tesis doctoral.

La Figura 80 muestra una micrografía SEM del corte transversal de la probeta de 100-200 de rango de tamaño de partícula de espaciador recubierta, donde se puede apreciar la infiltración de las partículas de BG en los poros descubiertos de la superficie, promoviendo potencialmente una infiltración mayor del hueso al interior del sustrato, así como una mejor osteointegración, objetivo principal de este trabajo. Dicha infiltración se corrobora con el análisis de EDX de las distintas zonas del sistema sustrato-recubrimiento, mostrando concretamente picos intensos de Si y Ca para el caso del poro infiltrado en comparación a la matriz de titanio y a un poro interno y aparentemente aislado en el interior de esta. Como cabe esperar, dichos resultados fueron similares tanto para la muestra densa como la porosa de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador.

En cuanto a la morfología del 45S5, cabe destacar que, tras el tratamiento térmico, el BG pasa de un estado amorfo a un estado cristalino, tal y como muestran los difractogramas de la Figura 81. De esta forma, se confirma la fase cristalina $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, cuyos patrones característicos se encuentran en la cartoteca PDF 22.1455. Esta misma fase ha sido también identificada en la literatura tras el proceso de sinterización de otros vidrios [34,182, 280].

Capítulo 4

La cristalización de los vidrios bioactivos ha sido ampliamente estudiada en la literatura, de forma que la aparición de la fase cristalina del silicato de calcio sódico ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) depende fuertemente del tamaño de partícula de vidrio, así como de las condiciones a las que se lleva a cabo el tratamiento térmico. En concreto, dicha fase se hace predominante en condiciones de alta temperatura, por encima de los 800–1000°C.

En la Figura 123, se presentan los difractogramas de los recubrimientos de BG sobre muestras porosas de rango de tamaño de partícula de espaciador de 100-200 μm , tratados térmicamente en dos equipos distintos. Por un lado, se empleó un horno de molibdeno, y por otro, un horno de tubo cerámico. En ambos casos, la rampa de calentamiento fue la misma (820°C durante 5 s, atmósfera de 10^{-5} mbar y enfriamiento en el horno). Se observa que, para el horno de molibdeno, el estado del recubrimiento es totalmente cristalino, mientras que, para el horno de tubo cerámico, se obtiene una morfología de las partículas semicristalina, mostrando una pequeña parte amorfa. Cabe cuestionarse la razón por la que, tratándose del mismo ciclo térmico, las mismas condiciones de atmósfera y un enfriamiento en el horno, se generan resultados tan distintos. Uno de los principales motivos, es que cada horno tiene una inercia de temperatura distinta, no siendo posible el mismo control de temperatura y de la rampa del tratamiento térmico. Otro de los factores que afectan al proceso es el propio controlador del horno, así como la precisión de éste, no siendo posible determinar la temperatura real a la que se realiza el proceso. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia no sólo del tratamiento térmico en el proceso de sinterizado del vidrio, sino también la del equipo donde se lleva a cabo, imponiendo la necesidad de optimización de éste para obtener un recubrimiento adecuado en cuanto a propiedades bioactivas.

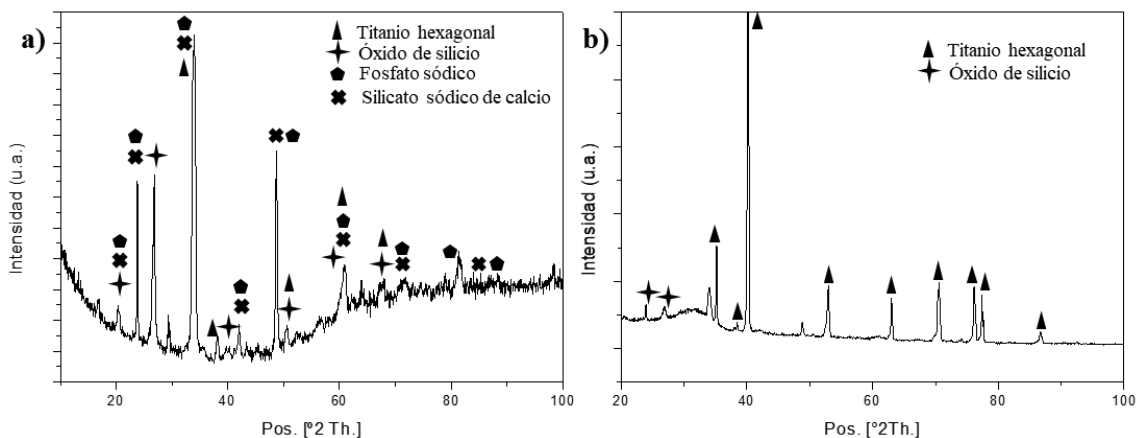


Figura 123. Espectro XRD del sustrato poroso de 100-200 de rango de tamaño de partícula de espaciador, recubierto con 3 capas de BG, sometidos al proceso de sinterizado (820 °C durante 5 s), tras la deposición del recubrimiento en a) un horno de molibdeno y b) un horno de tubo cerámico.

En líneas generales, las Figura 82 y Figura 83 muestran un recubrimiento homogéneo, pero no continuo, sobre ambos sustratos porosos. Sin embargo, se observa una peor sinterizabilidad en el caso del recubrimiento del sustrato poroso de rango de tamaño de espaciador 250-355 μm , ya que se observan ciertas grietas micrométricas. Este hecho se puede explicar debido a que, en dicho sustrato, hay menor número de poros por unidad de superficie, por lo que la matriz remanente de titanio entre ellos es mayor. Puesto que la superficie está pulida (como ocurría en el caso del sustrato denso frente al poroso comentado previamente), la aparición de grietas como consecuencia de la diferencia de TEC es irremediable. En cuanto a la sinterizabilidad del recubrimiento, tanto para las zonas planas como para las zonas porosas, cabe destacar que a mayores aumentos en las imágenes SEM se observa la misma morfología y estructura de las partículas de BG (Figura 82 y Figura 83, b y c). Adicionalmente, dichas micrografías corroboran la microporosidad de este recubrimiento.

En cuanto al recubrimiento sobre los poros, en el caso del sustrato de rango de tamaño de espaciador de 100-200 μm (Figura 82 c), la infiltración del recubrimiento se evidencia de manera clara hacia el interior de éste, mientras que para el mayor

Capítulo 4

rango de tamaño, las partículas de BG se reparten de manera más regular (Figura 83 c).

Por su parte, la Figura 84 presenta este hecho de manera brusca y acentuada, dejando ver en ciertas zonas la matriz de titanio bajo el recubrimiento, como consecuencia de la adhesión deficiente de las partículas de BG a la superficie de la muestra. En la Figura 124 se muestra la presencia de grietas sobre el sustrato denso, que originan el desconche del recubrimiento como consecuencia de un déficit en la adherencia a la matriz metálica.

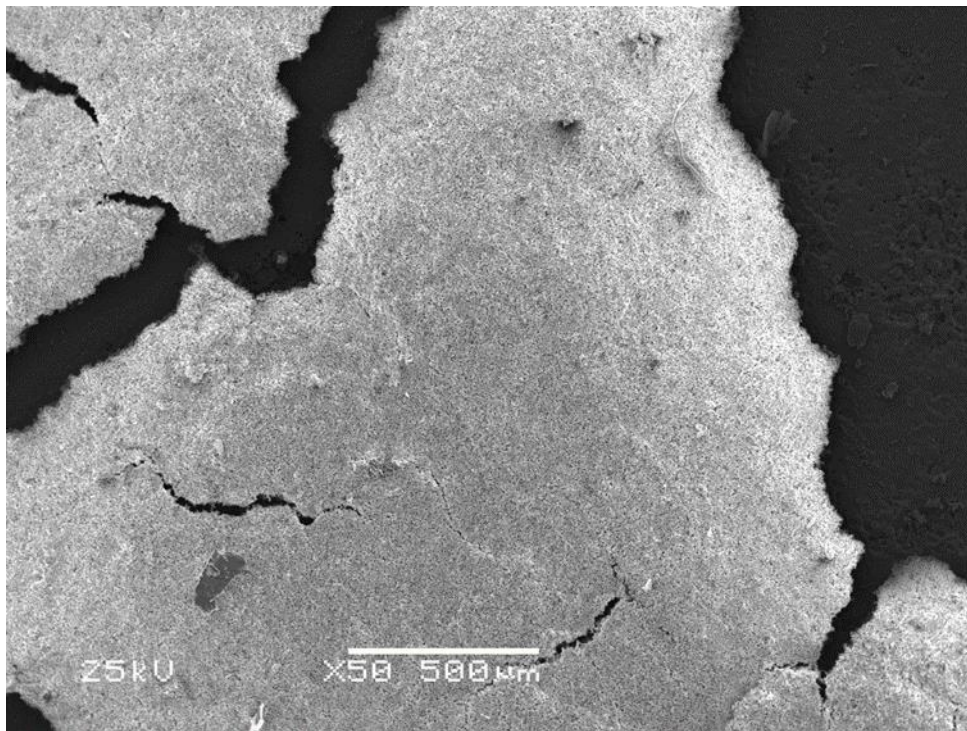


Figura 124. Micrografía SEM de las grietas formadas sobre el sustrato denso tras el recubrimiento de BG de 3 capas.

En este contexto, es interesante el estudio del espesor de recubrimiento obtenido tanto para el sustrato denso como para el poroso de 100-200 μm (Figura 85). Se observa cómo se obtiene un espesor mayor con la presencia de porosidad, debido a que la adherencia al sustrato es mejor. Debido a esto, cabe plantearse la influencia tanto de la porosidad del sustrato como del tamaño de poro. La Figura 125 presenta las imágenes SEM de sustratos porosos de una porosidad del 30 % en volumen

Discusión de resultados

para dos rangos distintos de tamaño de espaciador (100-200 y 355-500 μm). Tras la medida de los espesores, se obtuvo para el sustrato con menor rango de tamaño de partícula de espaciador un recubrimiento de 138 μm , mientras que para el tamaño mayor el espesor disminuyó drásticamente (51 μm).

En cuanto a la influencia del tamaño medio de poro de los sustratos para una misma fracción volumétrica de porosidad, se evidencia que, a gran tamaño tiene lugar una mayor infiltración del recubrimiento en el interior de los poros, debido a un mayor volumen a rellenar por las partículas de vidrio (Figura 125 b y d). Consecuentemente, el espesor resultante es menor.

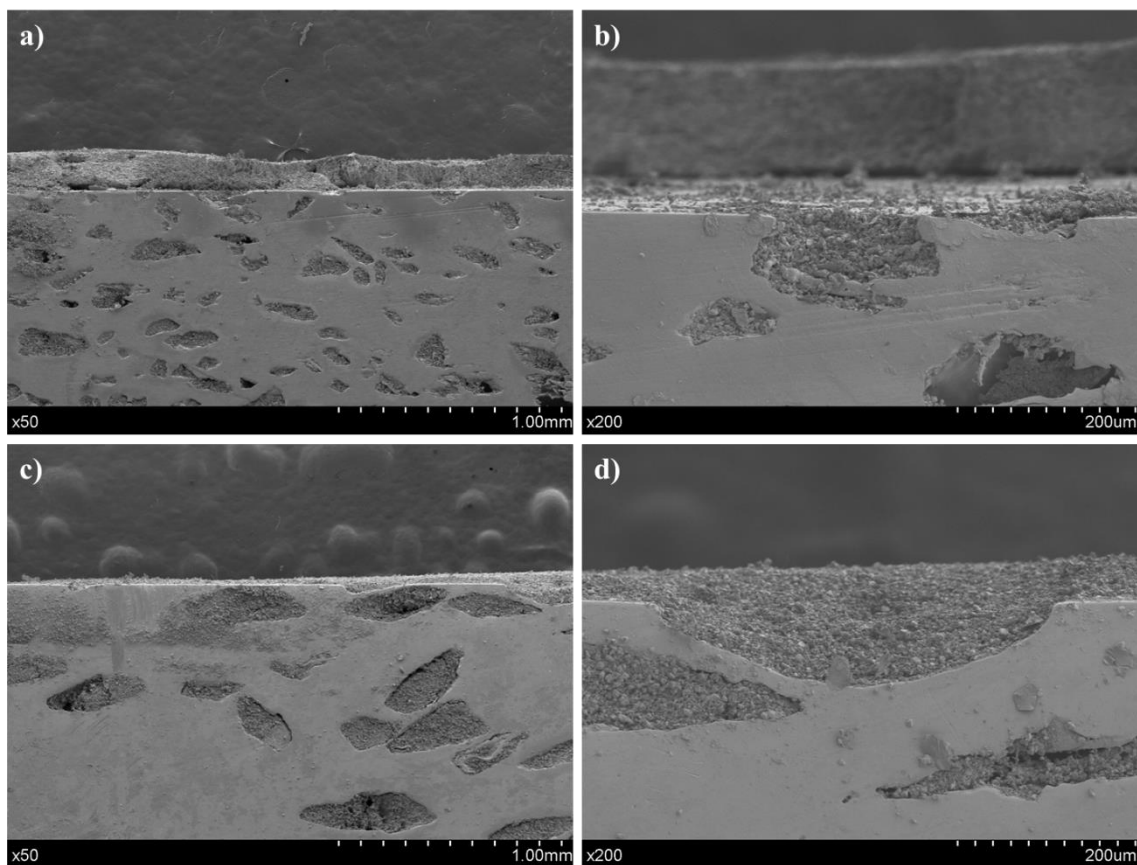


Figura 125. Micrografías SEM de la sección transversal de sustratos porosos de a) y b) 100-200 μm ; c) y d) 355-500 μm , de rango de tamaño de partícula de espaciador tras el recubrimiento de BG de 3 capas. Ambos con una porosidad del 30 % en volumen. Infiltración de las partículas de BG en los poros del sustrato.

Capítulo 4

Comparando los resultados obtenidos para los sustratos estudiados en esta tesis doctoral (50 % en volumen de porosidad), se puede establecer que, a mayor porosidad, el espesor aumenta para un mismo tamaño medio de poro, debido al aumento de área específica del sustrato en el interior de los poros, que implica una mayor adhesión.

La infiltración del recubrimiento en el interior los sustratos porosos se observa también en las imágenes de la topografía 3D realizadas por microscopía confocal (Figura 86), donde el recubrimiento se presenta, de forma visual, más uniforme al infiltrarse en los poros del sustrato de mayor rango de tamaño de partícula de espaciador (250-355 μm).

Sin embargo, atendiendo a los parámetros de rugosidad mediante confocal, la topografía del recubrimiento resulta ser más rugosa tanto en la parte plana como en la parte porosa para el sustrato poroso de 250-355 μm (Tabla 34). Si se comparan los parámetros de los sustratos porosos recubiertos con los sustratos vírgenes, se observa, sin embargo, que mientras que en las zonas planas la rugosidad de la topografía aumenta al depositar el recubrimiento, en las zonas porosas la tendencia es contraria, disminuyendo los valores de dichos parámetros de forma clara (Tabla 50). Esto se debe a que la zona plana de la muestra virgen se encuentra pulida, mientras que, en la zona porosa, al depositarse el recubrimiento las partículas se adhieren a las paredes rugosas y rellenan los poros, de forma que los patrones de rugosidad comentados en el apartado 4.1, quedan sobrepuestos por el BG.

Tabla 50. Comparación de rugosidad aritmética S_a (μm), obtenida a partir de la microscopía confocal láser, entre los sustratos porosos de 100-200 y 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador, sin recubrir y recubiertos con 3 capas de BG.

		S_a (μm)		
		Virgen	Recubrimiento de HA	Recubrimiento de BG
100-200 μm	Plana	5.0	31.9	3.2
	Porosa	15.5		8.1
250-355 μm	Plana	3.4	23.2	6.1
	Porosa	30.8		18.2

Al comparar los resultados obtenidos, mediante microscopía confocal, para ambos recubrimientos de HA y BG (Tabla 50), se aprecia que el recubrimiento de HA resulta ser más heterogéneo que el de BG, de tal forma que no es posible diferenciar la parte plana de la parte porosa. Los valores de este recubrimiento de HA resultan ser mayores, en todos los casos, que para el recubrimiento de BG, confirmando una topografía más abrupta para el primero. Adicionalmente, se observa un recubrimiento de HA más rugoso para el caso de menor tamaño de poro, mientras que ocurre al contrario para el recubrimiento de BG (mayores valores de rugosidad para el sustrato de 250-355 μm). Este hecho pone de manifiesto las diferencias en cuanto a infiltración se refiere: la HA no se adentra de manera completa en el sustrato de menor rango de tamaño de espaciador, lo que implica aglomeraciones de partículas a lo largo de la superficie de la muestra. Por tanto, una buena infiltración depende fuertemente del tamaño de partícula del material del recubrimiento.

Al evaluar el sistema sustrato de titanio-recubrimiento mediante micro-indentación instrumentada, se observa una mayor penetración para el sustrato poroso de titanio frente al sustrato denso, así como para ambos tipos de sustratos recubiertos, en comparación con el pellet de BG sinterizado (Figura 87). La razón es que dicho pellet ha sido previamente prensado y sinterizado, mientras que la deposición del recubrimiento tuvo lugar por gravedad, dando lugar a una micro-porosidad en cada capa. Al comparar los sustratos denso y poroso, la penetración resulta ser menor como consecuencia de la rigidez del sistema titanio denso-recubrimiento. Por otro lado, dicha rigidez se confirma en la recuperación elástica que experimentan las muestras densas recubiertas frente a las porosas. Este mismo efecto se obtuvo al comparar los sustratos recubiertos de 250-355 μm con distinto número de capas con la probeta densa.

En cuanto al número de capas, se concluye que al aumentar el número de capas disminuye la dureza del sistema como consecuencia de la micro-porosidad del recubrimiento. Dicha micro-porosidad puede ser también considerada la razón del

Capítulo 4

comportamiento de *pseudo-creep* que se manifiesta en las mesetas de las curvas (Tabla 35).

Tras este análisis micro-mecánico, así como tras la evaluación visual del recubrimiento, se considera que el sistema óptimo en cuanto a homogeneidad, adherencia del recubrimiento y potencial bioactividad es el de 3 capas de BG.

Los sistemas sustrato-recubrimiento presentaron distinto comportamiento frente al ensayo de micro-indentación instrumentada (Figura 88). En concreto, el sustrato poroso de 250-355 μm recubierto presentó la máxima penetración, pero la mínima recuperación elástica $((B-C)/B)$ y el mínimo comportamiento de pseudo-creep (B-A), tal y como se muestra en la Tabla 36. Se aprecia que, a mayor tamaño de poro, la resistencia a la penetración de los sustratos recubiertos disminuye, así como la recuperación elástica (Tabla 36). Por otro lado, si se comparan los sustratos vírgenes y recubiertos, se observan tendencias contrarias: para el sustrato denso, tanto la penetración máxima y la recuperación elástica son mayores para la muestra recubierta. La razón es la porosidad de la capa de BG depositada. Sin embargo, en los sustratos porosos ocurre lo contrario. Esto puede explicarse debido a que el BG es un material cerámico, por lo que es más duro que el titanio poroso. A esto se le suma que el sustrato poroso de titanio presenta una porosidad mayor que la que presenta la capa de BG a simple vista, de forma que el sistema sustrato-recubrimiento presentará una menor recuperación elástica.

El estudio del comportamiento tribológico de los sistemas recubrimientos de 3 capas de BG – sustratos de titanio se llevó a cabo en las mismas condiciones que para la combinación con el recubrimiento de HA. Tan sólo se presenta el sustrato de 100-200 μm frente al macizo, ya que la muestra de 250-355 μm de rango de tamaño de partícula de espaciador obtuvo valores muy similares a su análoga porosa.

Tras la primera fase del ensayo de rayado se muestra una topografía uniforme del recubrimiento, tanto para el sustrato denso como para el sustrato poroso de rango de tamaño de espaciador de 100-200 μm (Figura 89, Pre-palpación). Si se compara con la Pre-palpación de los sustratos vírgenes (Figura 40), se evidencia que las

partículas de BG cubren los poros completamente, enmascarando la superficie del sustrato poroso.

Sin embargo, una vez realizado el rayado, mientras que el sustrato denso presenta un surco uniforme, el sustrato poroso muestra una tendencia en la que la profundidad permanente del surco va disminuyendo a lo largo de su longitud (Figura 89, Penetración permanente). La razón es la deficiente adhesión del recubrimiento de BG por la diferencia del TEC con el sustrato metálico, de manera que, al realizar el rayado, se produce la rotura y el desconche del recubrimiento con el consiguiente arrastre de material.

Tras el análisis realizado de los sustratos recubiertos con BG, se valida la técnica de sedimentación por goteo para la deposición de recubrimientos de BG sobre sustratos de titanio poroso. El resultado de dicha deposición dependerá del tamaño de partícula de BG, del número de capas depositadas y del tratamiento térmico. En este contexto, se observa una mejor adherencia del recubrimiento sobre las muestras porosas de titanio, consecuencia de los poros y la rugosidad de sus paredes, que promueven la infiltración del vidrio a su través. Destaca que la infiltración resulta ser mayor para la muestra porosa de mayor rango de tamaño de espaciador, como cabía esperar, dado el tamaño de las partículas de BG. En cuanto al recubrimiento, se requiere la deposición de 3 capas para que sea homogéneo y a su vez, no comprometa la integridad y la adhesión de éste.

Lo previamente expuesto se corrobora al comparar los parámetros de rugosidad de la superficie de los sustratos vírgenes y recubiertos con HA y BG. Se observa que los valores de estos disminuyen tras la deposición de cualquiera de los recubrimientos, homogeneizando así la superficie (Tabla 51). Sin embargo, como cabe esperar, no ocurre lo mismo en la etapa de post-palpación, ya que la topografía del surco es más rugosa en el recubrimiento por los motivos mencionados previamente.

Capítulo 4

Tabla 51. Comparación de parámetros de rugosidad de la topografía en la etapa de prepalpación, valor medio de penetración permanente y recuperación elástica (RE) del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 μm , sin recubrir y recubiertos con: 1) HA mediante la técnica de sol-gel y 2) 3 capas de BG mediante la técnica de goteo, tras el ensayo de rayado.

100-200 μm	Prepalpación				Penetración permanente (μm)	RE (μm)
	R_a (μm)	R_q (μm)	R_y (μm)	R_z (μm)		
Virgen	4.9	5.2	32.5	32.5	4.9	4.0
Recubrimiento de HA	15.6	18.4	59.8	59.8	36.0	11.9
Recubrimiento de BG	2.2	2.6	9.4	9.3	16.5	4.6

En cuanto a la recuperación elástica, se observa que para el sustrato denso recubierto es mucho menor que para el sin recubrir, como consecuencia de que el BG es un material cerámico (Figura 90 y Tabla 38). Sin embargo, con respecto al sustrato poroso, la recuperación elástica resulta ser mayor que para el sustrato virgen, aunque mostrando de nuevo una tendencia en la que la profundidad del surco a lo largo de su longitud disminuye. Esto se explica por la porosidad del recubrimiento de BG y la mala adhesión de éste al sustrato metálico de titanio, como se refirió anteriormente.

Cabe destacar que la penetración permanente en valor real resultar ser mayor para el sustrato recubierto con BG que para el virgen. Este hecho se debe al mismo motivo del recubrimiento de HA sobre los sustratos de titanio: aunque el BG sea una cerámica, la fabricación del recubrimiento por sedimentación por goteo lleva implícita una porosidad de éste, haciendo que, a simple vista, el sistema titanio-recubrimiento de BG sea menos resistente en cuanto a propiedades mecánicas (Tabla 51).

Al comparar los recubrimientos de HA por la técnica de sol-gel y de BG por sedimentación por goteo obtenidos, se observan ciertas diferencias en cuanto al comportamiento de resistencia al rayado. En primer lugar, mientras que el

recubrimiento de BG homogeniza la superficie del sustrato virgen, el recubrimiento de HA la transforma en una topografía mucho más irregular, tal y como muestran los parámetros de rugosidad de la etapa de Pre-palpación (Tabla 51). Esto puede deberse a varias razones, como la diferencia de espesor de los recubrimientos, la sinterizabilidad de los mismos a la hora de realizarles el tratamiento térmico o que el recubrimiento se infiltre de forma distinta en el sustrato poroso, debido en gran parte a la técnica de deposición empleada.

En cuanto a los parámetros de penetración permanente y recuperación elástica, se aprecia una menor resistencia al rayado para el sustrato recubierto con HA, ya que es el sistema que mayor profundidad de surco genera tras el ensayo (Figura 126) y el que mayor recuperación elástica experimenta. Esto se traduce en un recubrimiento no solo más heterogéneo, sino también más poroso. Dicha porosidad lleva implícita una penetración permanente mayor y una recuperación mayor que el recubrimiento de BG, aun siendo ambos materiales cerámicos.

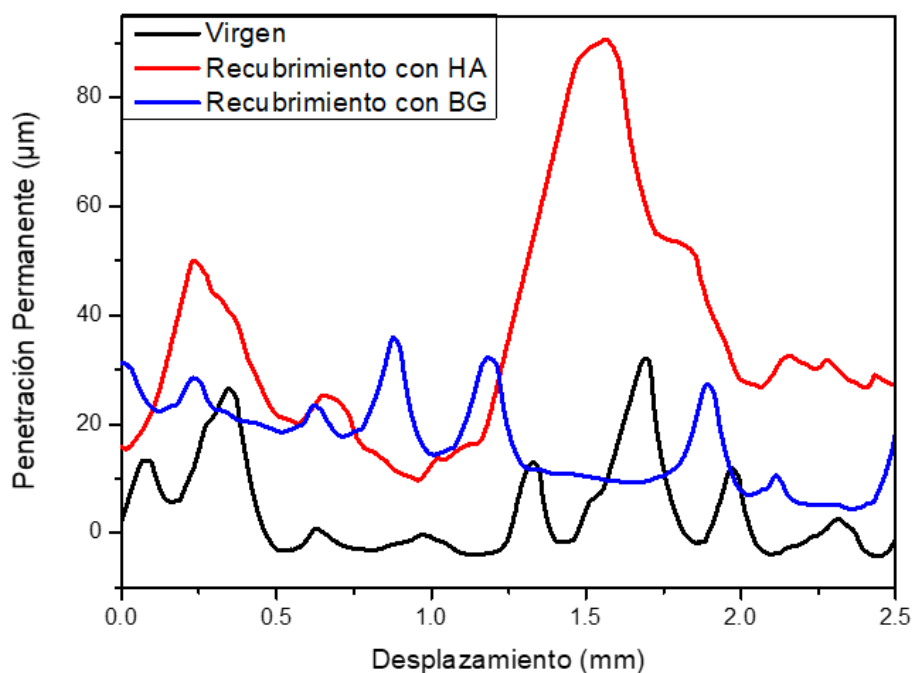


Figura 126. Penetración permanente en el surco del sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm, sin recubrir y recubierto con: 1) HA mediante la técnica de sol-gel y 2) 3 capas de BG mediante la técnica de goteo, tras el ensayo de rayado.

Capítulo 4

A la vista de estos resultados, se manifiesta una mayor adhesión del recubrimiento de BG frente al de HA, además de presentar mejores propiedades mecánicas en la combinación sustrato-recubrimiento. Por otro lado, el recubrimiento de BG resulta ser más homogéneo, replicando de manera más precisa la topografía de la muestra.

La formación de HA de los sustratos recubiertos de BG en el ensayo con SBF, también se ve influenciada por el número de capas de recubrimiento, así como por la presencia de poros en el sustrato de titanio. Los resultados obtenidos por EDX (Figura 91) no muestran presencia de los iones Ca y P para el caso de la muestra porosa de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador recubierta con una capa de BG, confirmando la ausencia de precipitación de HA. Por el contrario, la concentración de estos elementos aumenta considerablemente, tanto para la muestra densa como para la porosa de 100-200 μm , ambas recubiertas con 3 capas, obteniendo relaciones Ca/P de 1.58 y 1.56, respectivamente. Dichos valores resultan ser próximos a la relación Ca/P de la HA en el cuerpo humano (1.67). De esta forma, se corrobora no sólo la precipitación de HA en los sustratos recubiertos tras la inmersión en SBF, sino la influencia directa del número de capas de BG en la misma, de manera que, a mayor espesor del recubrimiento, mayor formación de HA. Por su parte, la Tabla 39 recoge los valores de microanálisis por ICP presentes en la solución en la cual las muestras recubiertas son sumergidas. Se observa que, para los elementos principales de la formación de HA (Ca y P), no hay variación significativa entre la solución de referencia y la de la muestra porosa recubierta con una capa de BG. Este resultado confirma de nuevo la no formación de HA tras la inmersión en SBF de las muestras durante 21 días.

Sin embargo, en el caso de las muestras densa y porosa con 3 capas de recubrimiento tiene lugar una disminución de la concentración de estos iones en la solución. Dicha disminución, por tanto, implica la formación y precipitación de la HA sobre la superficie de los sustratos, con un consumo de Ca/P de 1.6 (valor cercano al de la HA estequiométrica en el cuerpo humano). Ambos sistemas presentan unos niveles similares cuantitativamente, siendo ligeramente inferiores para el caso de la muestra porosa. La razón podría ser una mayor acumulación de partículas de BG

en los poros del sustrato, y como consecuencia una liberación y posterior consumo de iones mayor. Esta circunstancia se corrobora al comparar los resultados de concentración de los iones de Si, donde la solución de la muestra porosa presenta 6.1 mg/ml frente 2.7 mg/ml para la densa.

El intercambio de iones Si entre la solución de SBF y el recubrimiento de vidrio resulta de gran interés de estudio, ya que tanto la concentración de Si como la bioactividad del vidrio se ven muy influenciadas por las propiedades químicas y físicas del vidrio (área superficial, rugosidad y composición química entre otras). El rol de los iones Si en el hueso humano tiene una doble función en cuanto a bioactividad se refiere. Por un lado, ciertos autores reportan que la presencia de estos iones promueve la formación y proliferación de osteoblastos, pero a su vez, inhibe el proceso de inducción y actuación de los osteoclastos [281].

Al recubrir los sustratos de titanio con proteínas, los macrófagos reaccionan con el titanio generando un fenotipo M1, el cual evoluciona a un fenotipo M2 típico en el proceso de regeneración de tejidos. Mientras que los osteoblastos generan hueso, los osteoclastos son células especializadas en la resorción de la matriz ósea, de forma que contribuyen en la remodelación del hueso. Si los osteoclastos se erradican completamente, pueden tener lugar efectos tóxicos por diferentes componentes [282]. En este contexto, es sumamente importante tener un equilibrio que autorregule ambas funciones (homeostasis), y, por tanto, se hace necesario el controlar la liberación de iones Si de la capa de recubrimiento de BG.

En cuanto al contenido de Ti en la solución, resultó ser despreciable para todas las muestras (≤ 0.003 mg/ml), confirmando la integridad estructural de las muestras fabricadas.

Los difractogramas de la Figura 92 muestran la formación de HA tras la inmersión durante 21 días de las muestras recubiertas con BG en SBF, con el fin de evaluar la influencia del número de capas.

Tras la inmersión de los sustratos durante 21 días en SBF, mediante DRX, se ha determinado que la fase cristalina de la capa de BG, $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, comienza a

Capítulo 4

desaparecer, dando lugar a una capa de HA sobre la superficie de los mismos. En el caso de 1 capa de BG para la muestra porosa de 100-200 μm de tamaño de partícula de espaciador, el difractograma (Figura 92 A) no muestra los picos característicos de la HA, revelando que no se ha producido su formación. Sin embargo, para el caso de los discos denso y poroso recubiertos con 3 capas (Figura 92 B y C), se observa que la fase cristalina $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ desaparece completamente, como se reporta en estudios previos [184]. Dichos difractogramas presentan los picos característicos de la HA, corroborando su formación [183,184] [283, 284]. La aparición de HA para los casos de recubrimiento de 3 capas puede explicarse debido a que la cantidad de vidrio depositado sobre los sustratos es mayor. De esta forma, se confirma que su formación no depende en sí de la presencia de la fase cristalina previamente comentada antes de la inmersión en SBF [285, 286]. Este hecho plantea la mejora potencial en la osteointegración para aplicaciones biomédicas futuras [287, 288].

En cuanto a los difractogramas de la Figura 92, cabe destacar la presencia de TiO_2 en fase rutilo y anatasa, siendo el rutilo predominante. Ciertos estudios han reportado que ambas fases tienen, además, un efecto positivo en términos de mejora de osteointegración [289].

La Figura 93 presenta las micrográficas SEM de los sustratos recubiertos con BG (denso y porosos de ambos rangos de tamaño de espaciador estudiados en este trabajo), tras la inmersión de estos en SBF durante 21 días. En ellas se observa la ausencia de HA para los sustratos recubiertos con 1 capa de BG, mientras que existe una clara presencia para los sustratos recubiertos con 3 capas. Por ello, se corrobora que la fase cristalina no influye en la inhibición de formación de HA, como se expuso anteriormente.

Tras el análisis realizado, se determina la importancia de la velocidad de la temperatura y la atmósfera durante el tratamiento térmico del BG, para el control de la cristalización del vidrio y de las propiedades mecánicas, ligadas a la microporosidad de este, la calidad de unión entre las partículas de BG y la intercara sustrato-recubrimiento. En este sentido, es de suma importancia alcanzar un

compromiso entre la diferencia de TEC y la bioactividad del vidrio tras la posible cristalización. En cuanto a la formación de HA, se aprecia un aumento de la bioactividad para el recubrimiento constituido por 3 capas.

Las imágenes SEM de las probetas recubiertas con 3 capas de BG muestran la morfología típica de la HA (Figura 93), similar a la encontrada en la literatura [183,184, 283, 284]. Tras el análisis, se puede concluir que, a mayor número de capas, mayor BG es depositado. A mayores aumentos, se aprecia una morfología de las partículas de HA aproximadamente regular en cuanto a forma, pero no en tamaño, así como la formación de aglomerados cristalinos, también observada en el recubrimiento de HA por la técnica de sol-gel (Figura 75). En cuanto a la HA depositada por esta técnica y la precipitada tras sumergir los sustratos recubiertos con BG en SBF, se evidencia que, aunque la morfología de las partículas es similar, estas resultan ser mayores para el caso del recubrimiento con BG, así como tiene lugar una mayor formación de compuestos policristalinos (Figura 127). Para el caso de la HA formada por sol-gel, sólo es posible observar dicha morfología a grandes aumentos, debido a la presencia de partículas extremadamente finas. De igual forma, se visualiza una mayor porosidad para el recubrimiento de HA por la técnica de sol-gel, reforzando que dicha porosidad puede ser un factor claramente influyente en las propiedades mecánicas y biofuncionales del sistema sustrato-recubrimiento.

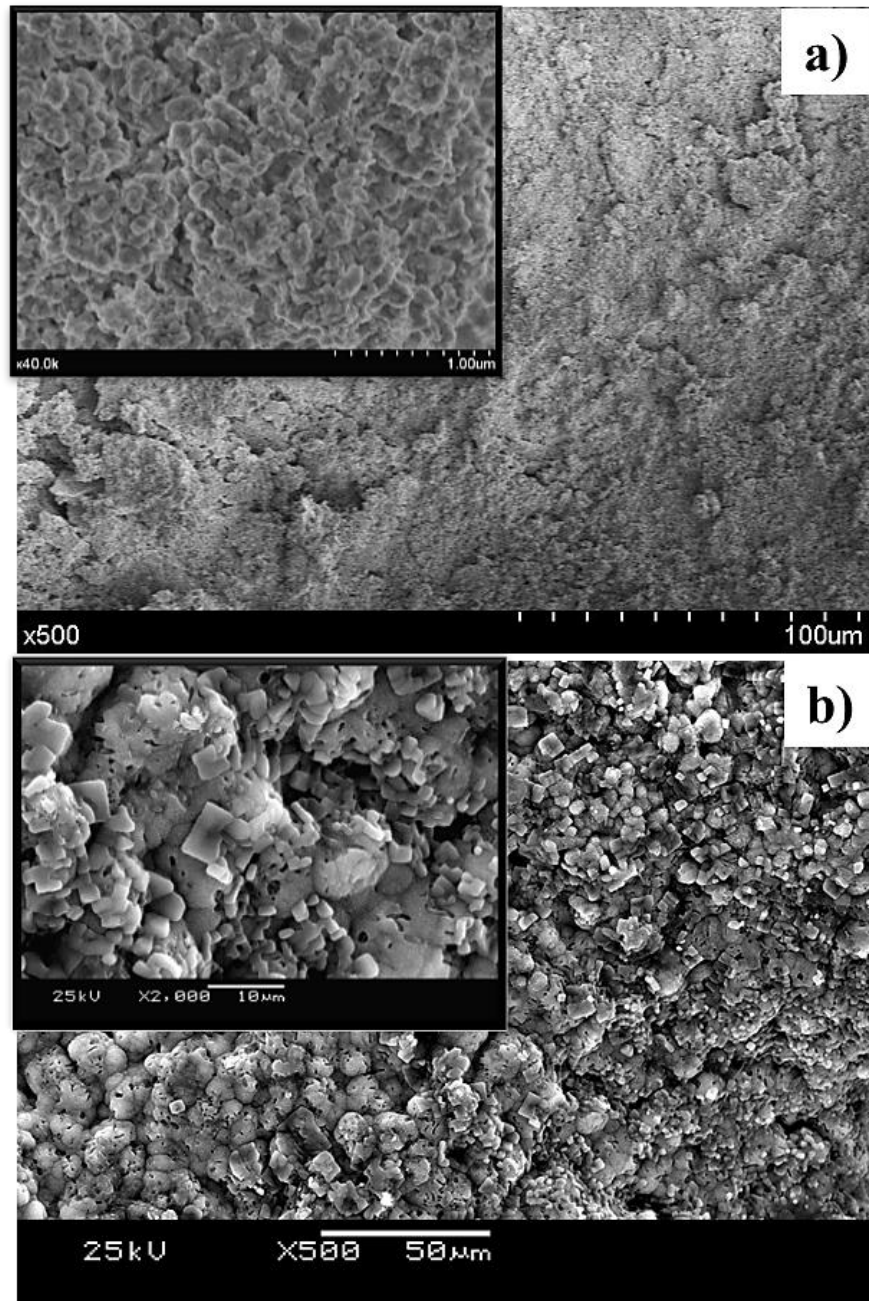


Figura 127. Micrografías SEM de la HA para el sustrato poroso de titanio con tamaño de partícula de espaciador 100-200 µm, recubierto con: a) HA mediante la técnica de sol-gel y b) 3 capas de BG mediante la técnica de goteo tras la inmersión durante 21 días en SBF.

Si se comparan las imágenes SEM de la HA obtenida en la presente tesis doctoral, tanto del recubrimiento por la técnica de sol-gel como la formada tras la inmersión de los sustratos recubiertos con 3 capas de BG en SBF durante 21 días, con HA de

procedencia humana y sintética (Figura 128), se confirma que las morfologías son muy próximas entre sí. En concreto, la HA obtenida por la técnica de sol-gel (Figura 128 c) muestra rasgos muy similares a la HA de procedencia sintética (Figura 128 b). Por su parte, la HA formada tras la inmersión en SBF (Figura 128 d), muestra un tamaño mayor y unos aglomerados más regulares y redondeados.

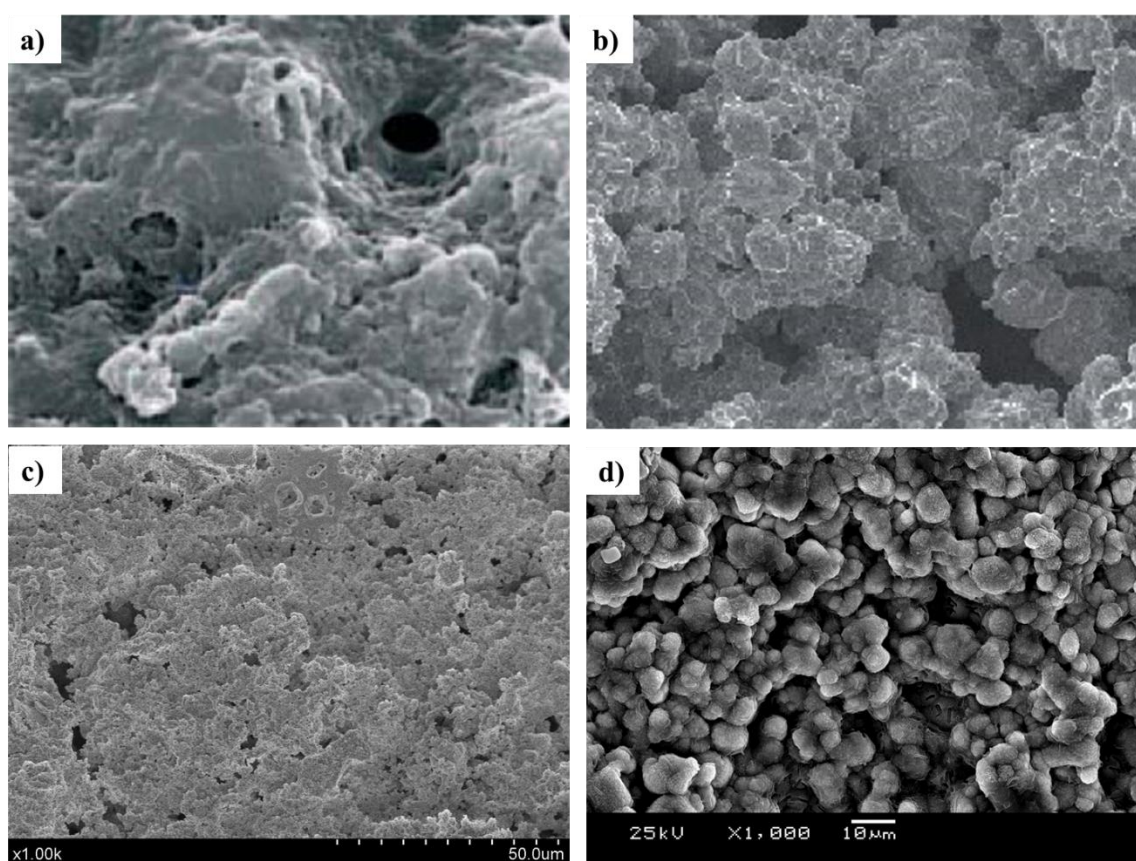


Figura 128. Micrografías SEM de HA de distintas procedencias: a) humana, b) sintética, c) del recubrimiento de HA de los sustratos de titanio obtenido por la técnica de sol-gel y d) HA formada a partir de la inmersión de los sustratos de titanio recubiertos con BG en SBF durante 21 días.

Tras este análisis de las HA obtenidas, de carácter semi-cuantitativo, se validan las técnicas empleadas como potencialmente útiles en uno de los objetivos más importantes de la presente tesis doctoral: la posible mejora de la osteointegración.

Capítulo 4

4.2.3. Efecto del recubrimiento de SPEEK como agente antibacteriano

La caracterización del recubrimiento consistió en la evaluación visual y del comportamiento bacteriano de éste, con el fin de cuantificar la capacidad antibactericida.

Las micrografías SEM de la Figura 95 muestran un recubrimiento que cubre de forma homogénea a la superficie de los sustratos (denso y poroso), dejando entrever la topografía de los sustratos vírgenes, suavizando de alguna manera las irregularidades de estos en su superficie (bordes de los poros). Sin embargo, cabe destacar la presencia de burbujas de aire en la superficie de los recubrimientos, como consecuencia de una adhesión no perfecta a las muestras. En concreto, se aprecia un mayor número de burbujas en la muestra densa, conllevando una disminución de la adherencia.

Tras los estudios del comportamiento bacteriano de los sustratos recubiertos, se observó una ligera disminución en el caso de la muestra densa, mientras que para las porosas de ambos rangos de tamaño de espaciador el crecimiento se inhibió prácticamente para la concentración inicial y las diluciones -1 y -2 (Figura 96).

Estas observaciones pueden ser explicadas por dos factores y/o su combinación. En primer lugar, es posible que el recubrimiento rellene las cavidades de los poros, impidiendo, por tanto, la penetración de bacterias y su proliferación en su interior. Esto se debería a la buena infiltración que tiene lugar en los sustratos porosos, como se ha demostrado tras la deposición de otros recubrimientos en trabajos previos sobre sustratos similares (PEEK/*chitosan*, vidrios bioactivos/*chitosan*, HA/vidrios bioactivos, etc.) [290, 291]. Cabe destacar que este hecho podría afectar también en términos de oseointegración. Sin embargo, no habría influencia sobre el equilibrio biomecánico de los sustratos, ya que el recubrimiento tan sólo repercute en la superficie de éstos.

Por otro lado, la presencia de sulfatos puede ser la razón de la inhibición de proliferación bacteriana, gracias a la capacidad esterilizadora que presenta.

Discusión de resultados

Por tanto, se puede establecer que el tratamiento superficial de recubrimiento de los sustratos de titanio con SPEEK, inhibe la proliferación de MRSA para todo tipo de muestra, tanto porosas como densa, siendo potencialmente una solución antibacteriana muy económica.

Capítulo 5: CONCLUSIONS

Capítulo 5. CONCLUSIONS

The main conclusions from this dissertation are presented in this section. They are classified according to the Objectives established in Chapter 2.

Fabrication and characterization of porous titanium substrates by space-holder technique

The fabrication and characterization of porous titanium samples are successfully achieved, showing the following statements:

1. Through the space-holder technique, porous titanium substrates are fabricated with the pore fraction and equivalent diameter defined by the design criteria.
2. Micro-CT is a suitable technique to evaluate porosity and pore morphology, as well as wall-roughness.
3. By image analysis, two types of pores have been revealed: inherent pores from the sintering ($< 5 \mu\text{m}$) and pores generated by the space-holder technique, which sizes depend on the employed space particles.
4. Most of the pores are interconnected, enhancing the bone in-growth through the substrates.

5. The controlled porosity of titanium substrates reduces the Young's modulus and the yield strength, which are closer to those of the cortical bone. Therefore, the stress-shielding phenomenon is minimized, guaranteeing good mechanical properties for the implant. In general, porous substrates with 100-200 μm of spacer particle size revealed the closest mechanical properties to those of cortical bone.
6. Vickers micro-hardness and scratch test show lower resistance to penetration for porous substrates compared to fully-dense ones, as well as greater elastic recovery.
7. Porous substrates present larger contact area than fully-dense ones, due to the pores and the roughness of their walls, promoting cell adhesion and bone in-growth. Porous substrates with 100-200 μm of spacer particle size showed the greatest contact area.
8. Best results concerning cell adhesion and proliferation were observed on porous substrates, without any influence of the pores size.
9. Greater bacteria proliferation is found on porous substrates, mainly for the size range of 250-355 μm , demonstrating the influence of the pores size distribution.

Surface modification. Influence of porous titanium substrates in osseointegration

The analyses of the employed techniques for surface modification allowed to conclude that:

- **Chemical etching by immersion**
 1. Chemical etching by substrates immersion generates additional micro-roughness on the surface of all samples, as well as modifies the morphology and volume fraction of pores.
 2. The obtained micro-structural and topographical features degrade the mechanical properties.
 3. The modified surface of titanium substrates after the chemical etching enhances the cell adhesion, proliferation and differentiation compared

to non-etched samples. The immersion at 125 s promotes cell biocompatibility, whereas the etching at 625 s improves osteoblast differentiation.

4. Cell proliferation is greater on chemical etching larger pores.
5. Apart from *in-vitro* test, *in vivo* studies are required for a fully understanding on the osteointegration on Ti-substrates.

- **Bioactive coatings: HA**

1. Sol-gel technique is validated to coat titanium substrates with HA, as well as the thermal treatment applied to the system HA-titanium to obtain a porous coating with good adhesion to the metal.
2. After heat treatment, HA crystallizes.
3. The mechanical interlocking and the possible chemical bonding perform the coating adhesion to metallic porous substrates.
4. Among the HA coated porous substrates, the combination of 100-200 μm Ti-substrate/HA presents better mechanical properties as system, due to there is more influence of porous substrates than the ceramic coating.
5. The HA coating plays a dual role: on the one hand, coating prevents the metallic ions release, enhancing the corrosion resistance of the system. On the other hand, titanium surface becomes bioactive by HA deposition.
6. Although the coating adhesion is good, it can be improved. In this context, the coating must be optimized to get better resistance to external efforts.

- **Bioactive coatings: BG**

1. Dripping sedimentation is validated in BG coating deposition on porous titanium substrates. The final coating depends on BG particle size, concentration and number coating of layers, as well as the applied thermal treatment.
2. Better coating adhesion is achieved on porous titanium samples, due to the pores and their walls roughness. Additionally, they promote BG

infiltration through the substrate. Results show greater infiltration for porous substrates with 250-355 μm size range of space holder particles.

3. To achieve a homogeneous coating, three BG coating layers are required. It is remarkable that a greater number of coating layers could compromise the system integrity and the coating adhesion.
 4. BG coating shows greater adhesion than HA, being more homogeneous and keeping the substrate topography at the same time. Additionally, this coating also presents better mechanical properties in coating-substrate system.
 5. The control of rates, temperature and atmosphere of thermal treatment is required in terms the BG crystallization and micro-mechanical properties of the coating (micro-porosity, the adherence of coating-substrate and the BG particles union).
 6. *In vitro* studies reveal HA formation in spite of BG crystallization.
 7. Better osseointegration is expected for three BG coating layers since the level of HA formation is higher. However, the TEC difference (related to coating adhesion) and the bioactivity must be considered to choose the optimal bioactive glass.
- **Antibacterial coatings: SPEEK**
 1. The implementation of SPEEK coating as surface treatment inhibits MRSA proliferation for all type of studied titanium substrates, being a potential and economical solution to avoid infections.
 2. Nevertheless, the analysis of other bacteria strains on covered substrates is required to complete the study of SPEEK coating impact.
 3. In addition, the SPEEK coating must be optimized and characterized in a micro-structural, topographical and mechanical ways.
 4. Although SPEEK coating presents good results in bacterial behavior, it is necessary to observe its influence on osteoblast proliferation, in order to guarantee the osseointegration of the implant.

Conclusions

In summary, it is concluded that coated substrates with HA, BG and SPEEK present good biomechanical properties (stiffness and yield strength), due to the substrate porosity is not modified. Nevertheless, etched substrates show an important degradation of the mechanical behavior. In addition, all the surface treatments achieve a biofunctional system, promoting bone in-growth and improving osseointegration. Therefore, they can be considered as a solution in total/partial bone replacements.

Bibliografía

Referencias

- [1] G. J. Owens, R. K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, H. C.M., C. Mahapatra, H. Kim and J. C. Knowles, "Sol-gel based materials for biomedical applications," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 77, pp. 1-79, 2016.
- [2] M. Roser, "Life Expectancy," [Online]. Available: <https://ourworldindata.org/life-expectancy>.
- [3] R. U. Anatomy & Physiology, "OpenStax CNX," [Online]. Available: <https://cnx.org/contents/FPtK1zmh@6.27:g-vsB2Y2@4/Exercise-Nutrition-Hormones-and-Bone-Tissue>.
- [4] L. L. Hench and J. Jones, *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, Cambridge, England: Woodhead Pub. Ltd., 2005.
- [5] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. vol. 55, p. 272–326, 2015.
- [6] V. Goriainov, R. Cook, J. M. Latham, D. G. Dunlop and R. O. C. Oreffo, "Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 10, p. 4043–4057, 2014.
- [7] B. S. Chang, C. K. Lee, K. S. Hong, H. J. Youn, H. S. Ryu, S. S. Chung and K. W. Park, "Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations," *Biomaterials*, vol. 21, no. 12, p. 1291–1298, 2000.
- [8] A. Arifin, A. B. Sulong, N. Muhamad, J. Syarif and M. I. Ramli, "Material processing of hydroxyapatite and titanium alloy (HA/Ti) composite as implant materials using powder metallurgy: A review," *Materials and Design*, vol. 55, pp. 165-175, 2014.
- [9] E. Boccardi, A. Philippart, J. A. Juhasz-Bortuzzo, A. M. Beltrán, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, E. Spiecker and A. R. Boccaccini, "Uniform Surface Modification of 3D Bioglass®-Based Scaffolds with Mesoporous Silica Particles (MCM-41) for Enhancing Drug Delivery Capability," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, 2015.
- [10] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants," *Journal of Materials Research*, vol. 13, no. 1, p. 94–117, 1998.
- [11] M. V. García-Garduño and J. Reyes-Gasga, "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica," *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, no. 2, pp. 90-95, 2006.
- [12] G. Zarb and T. Albrektsson, "T. Osseointegration – A requiem for the periodontal ligament? — An editorial," *Int J Periodont Restorative Dent*, vol. 11, p. 88-91, 1991.
- [13] J. P. Allain, M. Echeverry-Rendón, J. J. Pavón and S. L. Arias, "Nanostructured biointerfaces," *Nanopatterning and Nanoscale Devices for Biological Applications*, pp. 41-72, 2014.
- [14] G. Heness and B. Ben-Nissan, "Innovative ceramics," *MATERIALS FORUM*, vol. 27, pp. 104-114, 2004.
- [15] R. Chiesa and A. Cigada, "Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: Integrating Materials with Tissue," in *Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: An Introduction to Integrating Materials with Tissues*, Santin M., Phillips G. J., Online: John Wiley & Sons, Inc, 2012, pp. 141-160.
- [16] X. Yu, X. Tang, S. V. Gohil and C. T. Laurencin, "Biomaterials for Bone Regenerative Engineering," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 4, no. 9, p. 1268–1285, 2015.
- [17] C. Ning, L. Zhou and G. Tan, "Fourth-generation biomedical materials," *Materials Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2-3, 2016.
- [18] G. S. Duffó, *Biomateriales. Una mejor calidad de vida.*, Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires, 2005.

Referencias

- [19] J. M. Soria, J. Barcia-González, J. A. Andrades, J. Romero, M. Monleón Pradas and J. M. García- Verdugo, "Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso," *Trauma Fundación MAPFRE*, vol. 20, no. 1, pp. 15-22, 2009.
- [20] A. Sola, D. Bellucci, V. Cannillo and A. Cattini, "Bioactive glass coatings: a review," *Surf. Eng.*, vol. 27, no. 8, p. 560–572, 2011.
- [21] W. S. W. Harun, R. I. M. Asri, J. Alias, F. H. Zulkifli, K. Kadirgama, S. A. C. Ghani and J. H. M. Shariffuddin, "A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials," *Ceramics International*, vol. 44, no. 2, p. 1250–1268, 2018.
- [22] R. I. M. Asri, W. S. W. Harun, M. A. Hassan, S. A. C. Ghani and Z. Buyong, "A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 57, pp. 95-108, 2016.
- [23] Y. Su, C. Luo, Z. Zhang, H. Hermawan, D. Zhu, J. Huang, Y. Liang, G. Li and L. Ren, "Bioinspired surface functionalization of metallic biomaterials," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 77, pp. 90-105, 2018.
- [24] C. García, S. Ceré and A. Durán, "Bioactive coatings deposited on titanium alloys," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 352, no. 32-35, pp. 3488-3495, 2006.
- [25] J. R. Jones, "Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomaterialia*, vol. 23, no. S, pp. S53-S82, 2015.
- [26] J. M. Gomez-Vega, E. Saiz and A. P. Tomsia, "Glass-based coatings for titanium implant alloys," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 549-559, 1999.
- [27] A. Nouri, "Novel metal structures through powder metallurgy for biomedical applications," *Ph.D. thesis, Institute for Technology Research and Innovation and Centre for Material and Fibre Innovation, Deakin University*, 2008.
- [28] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, California: Elsevier Academic Press, 2004.
- [29] "ISO 5832-2".
- [30] "ASTM F67-00, Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700)".
- [31] "ISO 10993-1".
- [32] I. Nieto, "Implementación de rutas para la obtención de Ti c.p poroso: influencia en las características microestructurales y en las propiedades mecánicas," Departamento de Ingeniería Mecánica y de los Materiales, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Sevilla, Sevilla, 2010.
- [33] V. Henrich and P. Cox, *The Surface Science of Metal Oxides*, New York: Cambridge University Press, 1994.
- [34] J. Currey, *Handbook of Biomaterials Properties*, London: J. H. Black, Garth, 1998.
- [35] R. Huiskes, H. Weinans and B. v. Rietbergen, "The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 274, pp. 124-34, 1992.
- [36] Y. Torres, J. J. Pavón, I. Nieto and J. A. Rodríguez, "Conventional Powder Metallurgy Process and Characterization," *Metallurgical and Materials Transactions B*, vol. 42, pp. 891-900, 2011.
- [37] V. Dhandapani, R. Subbiah, E. Thangavel, M. Arumugam, K. Park, Z. M. Gasem, V. Veeraragavan and D.-E. Kim, "Tribological properties, corrosion resistance and biocompatibility of magnetron sputtered titanium-amorphous carbon coatings," *Applied Surface Science*, vol. 371, pp. 262-274, 2016.
- [38] H. Lee, J.-D. Liao, K. Sivashanmugan, B. H. Liu, S.-L. Weng, Y.-D. Juang and C.-K. Yao, "Dual properties of zirconia coated porous titanium for a stiffness enhanced bio-scaffold," *Materials and Design*, vol. 132, pp. 13-21, 2017.

- [39] B. R. Lawn, K. S. Lee, H. Chai, A. Pajares, D. K. Kim, S. Wuttiphan, I. M. Peterson and X. Hu, "Damage-Resistant Brittle Coatings," *Advanced Engineering Materials*, vol. 2, no. 11, pp. 745-748, 2000.
- [40] R. Ritchie, "Role of Fracture Mechanics in Life Prediction Role of Fracture Mechanics in Life Prediction," in *ASM Intl. Materials and Processes for Medical Devices Conference*, St. Paul, Minnesota (EE.UU.), 2004.
- [41] S. Wu, X. Liu, K. W. K. Yeung, C. Liu and X. Yang, "Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering," *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 80, pp. 1-36, 2014.
- [42] E. J. Tobin, "Recent coating developments for combination devices in orthopedic and dental applications: A literature review," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 112, p. 88-100, 2017.
- [43] S. Yavari, L. Loozen, F. L. Paganelli, S. Bakhshandeh, K. Lietaert, J. A. Groot, A. C. Fluit, C. H. E. Boel, J. Alblas, H. C. Vogely, H. Weinans and A. A. Zadpoor, "Antibacterial Behavior of Additively Manufactured Porous Titanium with Nanotubular Surfaces Releasing Silver Ions," *ACS Applied Materials Interfaces*, vol. 8, no. 27, p. 17080-17089, 2016.
- [44] J. Consuegra, S. J. Gutierrez, A. Jaramillo, I. Sanz, G. Olave, J. E. Soto, C. Valencia and A. Contreras, "Enteric Gram negative rods and unfermented of glucose bacteria in patients with peri-implant disease," *Biomédica*, vol. 31, no. 1, pp. 21-26, 2011.
- [45] M. Schuler, G. R. Owen, D. W. Hamilton, M. de Wild, M. Textor, D. M. Brunette and S. G. Tosatti, "Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study," *Biomaterials*, vol. 27, no. 21, pp. 4003-4015, 2006.
- [46] E. Herraiz Lalana, "Estudio de aleaciones de titanio pulvimetalúrgicas con adición de Fe y Cr," Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química, Universidad Carlos III de Madrid, Madrid, 2012.
- [47] M. González, D. Rodríguez, F. J. Gil, J. Peña and J. M. Manero, "Estudio de la biocompatibilidad de una nueva aleación beta-titanio de bajo módulo de elasticidad," *Biomecánica*, vol. 18, no. 1, pp. 24-28, 2010.
- [48] C. Betts, "Benefits of metal foams and developments in modelling techniques to assess their materials behaviour: a review," *Materials Science and Technology*, vol. 28, no. 2, pp. 129-143, 2012.
- [49] X. Miao and D. Sun, "Graded/Gradient Porous Biomaterials," *Materials*, vol. 3, pp. 26-47, 2010.
- [50] X. Tan, Y. J. Tan, C. S. L. Chow, S. B. Tor and W. Y. Yeong, "Metallic powder-bed based 3D printing of cellular scaffolds for orthopaedic implants: A state-of-the-art review on manufacturing, topological design, mechanical properties and biocompatibility," *Materials Science and Engineering C*, vol. 76, p. 1328-1343, 2017.
- [51] P. Trueba Muñoz, Desarrollo de titanio con porosidad gradiente radial y longitudinal para aplicaciones biomédicas, Sevilla: Universidad de Sevilla, 2016.
- [52] Y. Torres, J. J. Pavón and J. A. Rodríguez, "Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder," *J. of Materials Processing Technology*, vol. 212, no. 5, pp. 1061-1069, 2012.
- [53] Y. Torres, J. A. Rodríguez, S. Arias, M. Echeverry, S. Robledo, V. Amigo and J. J. Pavón, "Processing, characterization and biological testing of porous titanium obtained by space-holder technique," *J. of Materials Science*, vol. 47, no. 18, pp. 6565-6576, 2012.
- [54] J. Jia, A. R. Siddiq and A. R. Kennedy, "Porous titanium manufactured by a novel powder tapping method using spherical salt bead space holders: characterisation and mechanical properties," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 48, pp. 229-2240, 2015.
- [55] S. Muñoz, J. Pavón, J. A. Rodríguez-Ortiz, A. Civantos, J. P. Allain and Y. Torres, "On the influence of space holder in the development of porous titanium implants: Mechanical, computational and biological evaluation," *Materials Characterization*, vol. 108, pp. 68-78, 2015.
- [56] I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh and K. A. Khalid, "Porous hydroxyapatite for artificial bone applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 8, no. 1-2, pp. 116-123, 2007.

Referencias

- [57] X. Liu, M. N. Rahaman, Q. Fu and A. P. Tomsia, "Porous and strong bioactive glass (13-93) scaffolds prepared by unidirectional freezing of camphene-based suspensions," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 415-423, 2012.
- [58] Y. Torres, S. Lascano, J. Bris, J. Pavón and J. A. Rodríguez, "Development of porous titanium for biomedical applications: A comparison between loose sintering and space-holder techniques," *Materials Science and Engineering C*, vol. 37, pp. 148-155, 2014.
- [59] O. Andersen, U. Waag, L. Schneider, G. Stephani and B. Kieback, "Novel Metallic Hollow Sphere Structures," *Advanced Engineering Materials*, vol. 2, no. 4, pp. 192-195, 2000.
- [60] L. Tuchinskiy, R. Loutfy and A. International, "Titanium Foams for Medical Applications," *Medical device materials: proceedings from the Materials & Processes for Medical Devices Conference*, pp. 377-381, 2004.
- [61] C. E. Wen, M. Mabuchi, Y. Yamada, K. Shimojima, Y. Chino and T. Asahina, "Processing of biocompatible porous Ti and Mg," *Scripta Materialia*, vol. 45, no. 10, pp. 1147-1153, 2001.
- [62] C. E. Wen, Y. Yamada, K. Shimojima, Y. Chino, H. Hosokawa and M. Mabuchi, "Novel titanium foam for bone tissue engineering," *Journal of Materials Research*, vol. 17, no. 10, pp. 2633-2639, 2002.
- [63] W. Niu, B. Chenguang, Q. GuiBao and W. Qiang, "Processing and properties of porous titanium using space holder technique," *Materials Science and Engineering A*, vol. 506, no. 1-2, pp. 148-151, 2009.
- [64] A. Bansiddhi and D. Dunand, "Shape-memory NiTi foams produced by replication of NaCl space-holders," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 6, pp. 1996-2007, 2008.
- [65] M. Köhl, T. Habijan, M. Bram, H. P. Buchkremer, D. Stöver and M. Köller, "Powder Metallurgical Near-Net-Shape Fabrication of Porous NiTi Shape Memory Alloys for Use as Long-Term Implants by the Combination of the Metal Injection Molding Process with the Space-Holder Technique," *Advanced Engineering Materials*, vol. 11, no. 12, pp. 959-968, 2009.
- [66] B. Lee, T. Lee, Y. Lee, D. J. Lee, J. Jeong, J. Yuh, S. H. Oh, H. S. Kim and C. S. Lee, "Space-holder effect on designing pore structure and determining mechanical properties in porous titanium," *Materials and Design*, vol. 57, p. 712-718, 2014.
- [67] M. Asbhy, "Making metal foams," *Charper book*, 2000.
- [68] G. Lotze, G. Stephani, P. Budach and F. Albracht, "Sintering and Characterisation of Highly Porous Metal Fibre Structures and use as Sound Absorption Material," *Proceeding of the powder metallurgy world congress and exhibition*, vol. 5, pp. 195-200, 1998.
- [69] O. Andersen and G. Stephani, "Metal Powder Report," vol. 54, p. 30, 1999.
- [70] A. Bansiddhi and D. Dunand, "Shape-memory NiTi foams produced by solid-state replication with NaF," *Intermetallics*, vol. 15, pp. 1612-1622, 2007.
- [71] Y. P. Zhang, B. Yuan, M. Q. Zeng, C. Y. Chung and X. P. Zhang, "High porosity and large pore size shape memory alloys fabricated by using poreforming agent (NH₄HCO₃) and capsule-free hot isostatic pressing," *J Mater Proc Tech*, vol. 192, pp. 439-442, 2007.
- [72] S. Chandrika V and S. Kirani KRL, "Bacteriological Spectrum of Post Operative Orthopedic Implant Infections," *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, vol. 5, no. 1, pp. 20-26, 2016.
- [73] B. Kasemo and J. Gold, "Implant surfaces and interface processes.," *Advances in dental research*, vol. 13, pp. 8-20, 1999.
- [74] G. Mendonça, D. B. Mendonça, F. J. Aragao and L. F. Cooper, "Advancing dental implant surface technology –From micron to nanotopography," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 3822-3835, 2008.
- [75] G. Mendonça, D. Mendoná and L. G. Simoes, "The effects of implant surface nanoscale features on osteoblastspecific gene expression," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 4053-4062, 2009.

- [76] R. A. Gittens, T. McLachlan and R. Olivares-Navarrete, "The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation," *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3395-3403, 2011.
- [77] W. D. Müller, U. Gross, T. Fritz, C. Voigt, P. Fischer, G. Berger, S. Rogaschewski and K. P. Lange, "Evaluation of the interface between bone and titanium being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 14, no. 3, pp. 349-356, 2003.
- [78] J. Caeiro, P. González, Guede and D., "Biomechanics and bone (& II): Trials in different hierarchical levels of bone and alternative tools for the determination of bone strength," *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, vol. 5, no. 2, pp. 99-108, 2013.
- [79] M. Kulkarni, A. Mazare, P. Schmuki and A. Igljč, *Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications*, Nanomedicine, One Central Press, 2014.
- [80] J. Allain, O. J. El-Atwani and J. J. Pavon Palacio, "Methods for directed irradiation synthesis with ions and thermal beams". United States Patent US9932664B2, 3 April 2018.
- [81] M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. Wilkinson and R. O. Oreffo, "The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder," *Nature Materials*, vol. 6, pp. 997-1003, 2007.
- [82] B. Ziberi, F. Frost, T. Höche and B. Rauschenbach, "Ripple pattern formation on silicon surfaces by low-energy ion-beam erosion: Experiment and theory," *PHYSICAL REVIEW B*, vol. 72, pp. 235-310, 2005.
- [83] P. Tengvall, H. Elwing, L. Sjöqvist, I. Lundström and L. Bjursten, "Interaction between hydrogen peroxide and titanium: a possible role in the biocompatibility of titanium," *Biomaterials*, vol. 10, no. 2, pp. 118-120, 1989.
- [84] T. Peltola, M. Patsi, H. Rahiala, I. Kangasiemi and A. Yli-Urpo, "Calcium phosphate induction by solgel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 41, no. 3, pp. 504-510, 1998.
- [85] J. Pan, H. Liao, C. Leygraf, D. Thierry and J. Li, "Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H₂O₂ pretreatment," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 40, no. 2, pp. 244-256, 1998.
- [86] X. Wang, S. Hayakawa, K. Tsuru and A. Osaka, "Improvement of bioactivity of H₂O₂/TaCl₅-treated titanium after subsequent heat treatments," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 52, no. 1, pp. 171-176, 2000.
- [87] B.-H. Lee, Y. D. Kim, J. H. Shin and K. H. Lee, "Surface modification by alkali and heat treatments in titanium alloys," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 61, no. 3, pp. 466-473, 2002.
- [88] J. Xiong, Y. Li, X. Wang, P. Hodgson and C. Wen, "Mechanical properties and bioactive surface modification via alkali-heat treatment of a porous Ti-18Nb-4Sn alloy for biomedical applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 3, pp. 1963-1968, 2008.
- [89] E. Takematsu, K. Cho, J. Hieda, M. Nakai, K. Katsumata, K. Okada, M. Niinomi and N. Matsushita, "Adhesive strength of bioactive oxide layers fabricated on TNTZ alloy by three different alkali-solution treatments," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 61, pp. 174-181, 2016.
- [90] P. Klokkevold, P. Johnson, S. Dadgostari, A. Caputo, J. Davies and R. Nishimura, "Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: A torque removal study in the rabbit," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 12, no. 4, pp. 350-357, 2001.
- [91] S.-A. Cho and K.-T. Park, "The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 3611-3617, 2003.
- [92] B. R. Chrcanovica, A. Wennerberga and M. D. Martins, "Influence of Temperature and Acid Etching Time on the Superficial Characteristics of Ti," *Materials Research*, vol. 18, no. 5, pp. 963-970, 2015.

Referencias

- [93] F. Jia, L. Zhou, S. Li, X. Lin, B. Wen, C. Lai and X. Ding, "Phosphoric acid and sodium fluoride: A novel etching combination on titanium," *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 9, no. 3, 2014.
- [94] J. M. Zhao, W. U. Park, K. H. Hwang, J. K. Lee and S. Y. Yoon, "Biomimetic Deposition of Hydroxyapatite by Mixed Acid Treatment of Titanium Surfaces," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 2252-2555, 2015.
- [95] C. Zhao, H. Fan and X. Zhang, "Advances in Biomimetic Apatite Coating on Metal Implants," in *Advances in Biomimetics*, Sichuan, National Engineering Research Center for Biomaterials, 2011.
- [96] X. Liu, P. Chu and C. Ding, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications," *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 47, no. 3-4, pp. 49-121, 2004.
- [97] M. Ohring, "CVD processes and Systems," in *Materials Sciences of Thin Films*, Hoboken (New Jersey), Academic Press Ltd, 1991, p. 177.
- [98] D. Rats, L. Vandenbulcke, R. Herbin, R. Benoit, R. Erre, V. Serin and J. Sevely, "Characterization of diamond films deposited on titanium and its alloys," *Thin Solid Films*, vol. 270, no. 1-2, pp. 177-183, 1995.
- [99] G. Heinrich, T. Grögler, S. Rosiwal and R. Singer, "CVD diamond coated titanium alloys for biomedical and aerospace applications," *Surface and Coatings Technology*, Vols. 94-95, pp. 514-520, 1997.
- [100] P. Strąkowska, R. Beutner, M. Gnyba, A. Zielinski and D. Scharnweber, "Electrochemically assisted deposition of hydroxyapatite on Ti6Al4V substrates covered by CVD diamond films - Coating characterization and first cell biological results," *Materials Science and Engineering C*, vol. 59, pp. 624-635, 2016.
- [101] M. Maru, M. Amaral, S. Rodrigues, R. Santos, C. Gouvea, B. Archanjo, R. Trommer, F. Oliveira, R. Silva and C. Achete, "The High performance of nanocrystalline CVD diamond coated hip joints in wear simulator test," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 49, pp. 175-185, 2015.
- [102] I. Bobrinetskiĭ, A. Seleznev, I. Gaĭduchenko, G. Fedorov, A. Domantovskiĭ, M. Presniakov, R. Podcherniaeva, G. Mikhaĭlova and I. Suetina, "The interaction between nerve cells and carbon nanotube networks made by CVD process investigation," *Biofizika*, vol. 58, no. 3, pp. 524-530, 2013.
- [103] H. Zhou and J. Lee, "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 7, pp. 2769-2781, 2011.
- [104] M. Malakauskaite-Petruleviciene, Z. Stankeviciute, G. Niaura, E. Garskaite, A. Beganskiene and A. Kareiva, "Characterization of sol-gel processing of calcium phosphate thin films on silicon substrate by FTIR spectroscopy," *Vib. Spectrosc.*, vol. 85, pp. 16-21, 2016.
- [105] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications," *Biomatter*, vol. 1, no. 2, pp. 121-164, 2011.
- [106] A. B. Martínez-Valencia, H. E. Esparza-Ponce, G. Carbajal-De La Torre and J. Ortiz-Landeros, "Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis," *Superf. y Vacío*, vol. 21, no. 4, pp. 18-21, 2008.
- [107] V. P. Orlovskii, V. S. Komlev and S. M. Barinov, "Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics," *Inorg. Mater.*, vol. 10, no. 38, pp. 973-984, 2002.
- [108] K. A. Hing, S. M. Best and W. Bonfield, "Characterization of porous hydroxyapatite," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 10, no. 3, pp. 135-145, 1999.
- [109] J. J. Faig-Martí and F. J. Gil-Mur, "Hydroxyapatite coatings in prosthetic joints," *Rev. Española Cirugía Ortopédica y Traumatol. (English Ed.)*, vol. 52, no. 2, pp. 113-120, 2008.
- [110] R. González, M. C. Melo, A. P. Reyes and A. C. Rodríguez, "Hidroxiapatita porosa HAP-200. Principales características físico-químicas," *Química Nova*, vol. 16, no. 6, pp. 509-512, 1993.

- [111] M. Akao, H. Aoki and K. Kato, "Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications," *J. Mater. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 809-812, 1981.
- [112] R. Hernández, R. Palma and M. C. Piña, "Hidroxiapatita y sus aplicaciones," *Rev. Mex. física*, vol. 45, no. 1, pp. 144-147, 1999.
- [113] A. A. Gorustovich, T. Steimetz, R. L. Cabrini and J. M. Porto López, "Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 1, pp. 232-237, 2010.
- [114] K. Yamada, K. Imamura, H. Itoh, H. Iwata and S. Maruno, "Bone bonding behavior of the hydroxyapatite containing glass-titanium composite prepared by the Cullet method," *Biomaterials*, vol. 22, no. 16, pp. 2207-2214, 2001.
- [115] R. Du, S. Zeng and Y. Hu, "Hydroxyapatite and bioactive glass composite coating on Ti-6Al-4V," *key Eng. Mater.*, 2007.
- [116] E. S. T. Oku, K. Suganuma, L. R. Wallenberg, A. P. Tomsia and J. M. Gómez-Vega, "Structural characterization of the metal/glass interface in bioactive glass coatings on Ti-6Al-4V," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, pp. 413-417, 2001.
- [117] S. Heise, M. Höhlinger, Y. Torres Hernández, J. J. Pavón Palacio, J. A. Rodríguez Ortiz, V. Wagener, S. Virtanen and A. R. Boccaccini, "Electrophoretic deposition and characterization of chitosan/bioactive glass composite coatings on Mg alloy substrates," *Electrochim. Acta*, vol. 232, pp. 456-464, 2017.
- [118] L. Besra and M. Liu, "A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD)," *Progress in Materials Science*, vol. 52, no. 1, pp. 1-61, 2007.
- [119] V. Nelea, C. Ristoscu, C. Chiritescu, C. M. I. N. Ghica, H. Pelletier, P. Mille and A. Cornet, "Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti-5Al-2.5Fe substrates with and without buffer layers," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 168, no. 1-4, pp. 127-131, 2000.
- [120] C. S. Yip, P. Cheang and K. A. Khor, "Post-spray hot isostatic pressing of plasma sprayed Ti6Al4V/hydroxyapatite composite coatings," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 71, no. 2, pp. 280-287, 1997.
- [121] M. Catauro, F. Papale, L. Sapio and S. Naviglio, "Biological influence of Ca/P ratio on calcium phosphate coatings by sol-gel processing," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 65, pp. 188-193, 2016.
- [122] R. Li, A. E. Clark and L. L. Hench, "An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing," *J. Appl. Biomater.*, vol. 2, no. 4, pp. 231-239, 1991.
- [123] L. L. Hench, "Challenges for bioceramics in the 21st century," *American Ceramic Society Bulletin*, vol. 84, no. 9, 2005.
- [124] L. Hench and J. Wilson, "Surface-active biomaterials," *Science*, vol. 226, no. 4675, pp. 630-636, 1984.
- [125] R. F. S. Lenza, W. L. Vasconcelos, J. R. Jones and L. L. Hench, "Surface-modified 3D scaffolds for tissue engineering," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, pp. 837-842, 2002.
- [126] R. K. Brow, "Review: the structure of simple phosphate glasses," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 263, pp. 1-28, 2000.
- [127] J. Livage, P. Barboux, M. T. Vandenborre, C. Schmutz and F. Taulelle, "Sol-gel synthesis of phosphates," *J. Non. Cryst. Solids*, Vols. 147-148, no. C, pp. 18-23, 1992.
- [128] J. C. Knowles, "Phosphate based glasses for biomedical applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 13, no. 10, p. 2395, 2003.
- [129] D. Carta, D. M. Pickup, J. C. Knowles, M. E. Smith and R. J. Newport, "Sol-gel synthesis of the P₂O₅-CaO-Na₂O-SiO₂ system as a novel bioresorbable glass," *J. Mater. Chem.*, vol. 15, no. 21, p. 2134, 2005.
- [130] D. D. Carta, J. C. Knowles, M. E. Smith and R. J. Newport, "Synthesis and structural characterization of P₂O₅-CaO-Na₂O sol-gel materials," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 353, no. 11-12, pp. 1141-1149, 2007.
- [131] L. L. Hench, "Third-Generation Biomedical Materials," *Science*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014-1017, 2002.

Referencias

- [132] M. Navarro, M. P. Ginebra and P. J. A., "Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, no. 3, pp. 1009-1015, 2003.
- [133] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst and R. N. Muller, "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064-2110, 2008.
- [134] R. K. Singh, T. H. Kim, K. D. Patel, J. C. Knowles and H. W. Kim, "Biocompatible magnetite nanoparticles with varying silica-coating layer for use in biomedicine: Physicochemical and magnetic properties, and cellular compatibility," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 100 A, no. 7, pp. 1734-1742, 2012.
- [135] Z. F. Yin, L. L. Wu, H. G. Yang and Y. Su, "Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 14, p. 4844, 2013.
- [136] F. Foroutan, N. H. de Leeuw, R. A. Martin, G. Palmer, G. J. Owens, H.-W. Kim and J. C. Knowles, "Novel sol-gel preparation of $(P_2O_5)_{0.4}-(CaO)_{0.25}-(Na_2O)_X-(TiO_2)_{(0.35-X)}$ bioresorbable glasses ($X = 0.05, 0.1, \text{ and } 0.15$)," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 73, no. 2, pp. 434-442, 2014.
- [137] V. Ääritalo, V. Meretoja, T. Tirri, S. Areva, T. Jämsä, J. Tuukkanen, A. Rosling and T. Närhi, "Development of a Low Temperature Sol-Gel-Derived Titania-Silica Implant Coating," *Mater. Sci. Appl.*, vol. 1, no. 3, pp. 118-126, 2010.
- [138] P. Judeinstein and C. Sanchez, "Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary," *J. Mater. Chem.*, vol. 6, no. 4, pp. 511-525, 1996.
- [139] D. B. Haddow, P. F. James and R. Van Noort, "Characterization of sol-gel surfaces for biomedical applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 7, no. 5, pp. 255-260, 1996.
- [140] D. B. Haddow, P. James and R. Van Noort, "Sol-gel derived calcium phosphate coatings for biomedical applications," *J. sol-gel Sci. Technol.*, vol. 13, no. 1, pp. 261-265, 1998.
- [141] E. P. Avés, G. F. Estévez, M. S. Sader, J. C. Sierra, J. C. Yurell, I. N. Bastos and G. D. Soares, "Hydroxyapatite coating by sol-gel on Ti-6Al-4V alloy as drug carrier," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 2, pp. 543-547, 2009.
- [142] E. Peón, A. Jiménez Morales, E. Fernández Escalante, M. C. García Alonso, M. L. Escudero and J. C. Galván, "Recubrimientos de hidroxiapatita preparados mediante un proceso sol-gel," *Rev. Metal.*, vol. 41, pp. 479-482, 2005.
- [143] A. A. E. Hadad, V. Barranco, A. Jiménez-Morales, E. Peon and J. C. Galvan, "Multifunctional sol-gel derived thin film based on nanocrystalline hydroxyapatite powders," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 252, no. 1, 2010.
- [144] E. Peón, M. S. Sader, F. d. A. Rodrigues, L. Ágata, J. C. Galván and G. D. de Almeida Soares, "Comparative Study of Hydroxyapatite Coatings Obtained by Sol-Gel and Electrophoresis on Titanium Sheets," *Rev. Matéria*, vol. 12, no. 1, pp. 156-163, 2007.
- [145] U. Mennicke and T. Salditt, "Preparation of solid-supported lipid bilayers by spin-coating," *Langmuir*, vol. 18, no. 21, pp. 8172-8177, 2002.
- [146] H. Aguiar, J. Serra and P. González, "Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales," *An. Química*, vol. 107, pp. 237-242, 2011.
- [147] M. Rizwan, M. Hamdi and W. J. Basirun, "Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, no. 11, pp. 3197-3223, 2017.
- [148] M. N. Rahaman, D. E. Day, B. S. Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald and A. P. Tomsia, "Bioactive glass in tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2355-2373, 2011.
- [149] D. Zhang, O. Leppäranta, E. Munukka, H. Ylänen, M. K. Viljanen, E. Eerola, M. Hupa and L. Hupa, "Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 2, pp. 475-483, 2009.
- [150] Z. Jia, J. Zhang, C. Jia, J. Nie and K. Chu, "Preparation and characterization of mechanical properties of carbon nanotube/45S5Bioglass composites for biologic applications," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 528, no. 3, pp. 1553-1557, 2011.

- [151] B. Lei, X. Chen, Y. Wang, N. Zhao, C. Du and L. Fang, "Surface nanoscale patterning of bioactive glass to support cellular growth and differentiation," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1091-1099, 2010.
- [152] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: from Hench to hybrids," *Acta Biomater.*, vol. 9, pp. 4457-4486, 2012.
- [153] A. Washio, "Physicochemical properties of newly developed bioactive glass cement and its effects on various cells," *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, vol. 103, no. 2, 2015.
- [154] D. Groh, F. Döhler and D. S. Brauer, "Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 10, pp. 4465-4473, 2014.
- [155] D. Bellucci, A. Anesi, R. Salvatori, L. Chiarini and V. Cannillo, "A comparative in vivo evaluation of bioactive glasses and bioactive glass-based composites for bone tissue repair," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 286-295, 2017.
- [156] S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T. Oku, K. Suganuma and A. P. Tomsia, "Bioactive glass coatings for orthopedic metallic implants," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 23, no. 15, pp. 2921-2930, 2003.
- [157] D. Bloyer, J. Gomez-Vega, E. Saiz, J. McNaney, R. Cannon and A. Tomsia, "Fabrication and characterization of a bioactive glass coating on titanium implant alloys," *Acta Mater.*, vol. 47, no. 15-16, pp. 4221-4224, 1999.
- [158] E. Saiz, M. Goldman, J. M. Gomez-Vega, A. P. Tomsia, G. W. Marshall and S. J. Marshall, "In vitro behavior of silicate glass coatings on Ti6Al4V," *Biomaterials*, vol. 23, no. 17, pp. 3749-3756, 2002.
- [159] R. F. Brown, M. N. Rahaman, A. B. Dwilewicz, W. Huang, D. E. Day, Y. Li and B. S. Bal, "Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 88, no. 2, pp. 392-400, 2009.
- [160] E. A. A. Neel, D. M. Pickup, S. Valappil, R. J. Newport and J. C. Knowles, "Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 6, pp. 690-701, 2009.
- [161] D. Bellucci, A. Sola, M. Gazzarri, F. Chiellini and V. Cannillo, "A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1091-1101, 2013.
- [162] [Online]. Available: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
- [163] V. Miguez-Pacheco, L. L. Hench and A. R. Boccaccini, "Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues," *Acta Biomater.*, vol. 13, pp. 1-15, 2015.
- [164] E. Munukka, O. Leppäranta, M. Korkeamäki, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, H. Ylänen, J. I. Salonen, M. K. Viljanen and E. Eerola, "Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 27-32, 2008.
- [165] T. Kokubo, "Bioactive glass ceramics: properties and applications," *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155-163, 1991.
- [166] A. M. Mulligan, M. Wilson and J. C. Knowles, "The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*," *Biomaterials*, vol. 24, no. 10, pp. 1797-1807, 2003.
- [167] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88-95, 2011.
- [168] F. Baino and E. Verné, "Glass-based coatings on biomedical implants: a state-of-the-art review," *Biomed. Glas.*, vol. 3, no. 1, pp. 1-17, 2017.
- [169] S. Lopez-Esteban, C. Gutierrez-Gonzalez, L. Gremillard, E. Saiz and A. Tomsia, "Interfaces in graded coatings on titanium-based implants," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2009.

Referencias

- [170] J. Gomez-Vega, E. Saiz, A. P. O. T. Tomsia, K. Suganuma, G. W. Marshall and S. J. Marshall, "Novel bioactive functionally graded coatings on Ti6Al4V," *Advanced Material*, vol. 12, no. 12, 2000.
- [171] J. L. E. Manrique, "Processing and characterisation of Bioglass ® coating on Ti6Al4V substrates," *Supl. Rev. Latinoam. Metal. Mater. S*, vol. 1, no. 1, pp. 77-90, 2009.
- [172] I. Corni, M. P. M. P. Ryan and A. R. Boccaccini, "Electrophoretic deposition: From traditional ceramics to nanotechnology," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 7, pp. 1353-1367, 2008.
- [173] A. Balamurugan, G. Balossier, J. Michel and J. Ferreira, "Electrochemical and structural evaluation of functionally graded bioglass-apatite composites electrophoretically deposited onto Ti6Al4V alloy," *Electrochim. Acta*, vol. 54, no. 4, pp. 1192-1198, 2009.
- [174] L. D'Alessio, R. Teghil, M. Zaccagnino, I. Zaccardo, D. Ferro and V. Marotta, "Pulsed laser ablation and deposition of bioactive glass as coating material for biomedical applications," *Appl. Surf. Sci.*, Vols. 138-139, pp. 527-532, 1999.
- [175] F. Lusquiños, J. Pou, M. Boutinguiza, F. Quintero, R. Soto, B. León and M. Pérez-Amor, "Main characteristics of calcium phosphate coatings obtained by laser cladding," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 247, no. 1-4, pp. 486-492, 2005.
- [176] R. Comesaña, F. Quintero, F. Lusquiños, M. J. Pascual, M. Boutinguiza, A. Durán and J. Pou, "Laser cladding of bioactive glass coatings," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 953-961, 2010.
- [177] H. Herman and S. M. R. Sampath, "Thermal Spray: Current Status and Future Trends," *MRS Bulletin*, vol. 25 (Thermal Spray coatings), no. 7, pp. 17-25, 2000.
- [178] G. Goller, "The effect of bond coat on mechanical properties of plasma sprayed bioglass-titanium coatings," *Ceram. Int.*, vol. 30, no. 3, pp. 351-355, 2004.
- [179] C. Gabbi, A. Cacchioli, B. Locardi and E. Guadagnino, "Bioactive glass coating: physicochemical aspects and biological findings," *Biomaterials*, vol. 16, no. 7, pp. 515-520, 1995.
- [180] J. Liu and X. Miao, "Sol-gel derived bioglass as a coating material for porous alumina scaffolds," *Ceram. Int.*, vol. 30, no. 7, pp. 1781-1785, 2004.
- [181] Castañeda-Contreras. [Online]. Available: <http://www.smf.mx/boletin/2006/Bol-20-1/Articulos/sol-gel.htm>.
- [182] D. C. Clupper, J. J. Mecholsky Jr., G. P. LaTorre and D. C. Greenspan, "Sintering temperature effects on the in vitro bioactive response of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in Tris buffer," *J. Biomed. Mater.*, pp. 532-540, 2001.
- [183] D. C. Clupper and L. L. Hench, "Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5," *J. Non-Cryst. Solids*, vol. 318, pp. 43-48, 2003.
- [184] Q. Z. Chen, I. Thompson and A. R. Boccaccini, "45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2414-2425, 2006.
- [185] O. P. Filho, G. P. Latorre and L. L. Hench, "Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 30, no. 4, 1996.
- [186] S. Foppiano, S. J. Marshall, E. Saiz, A. P. Tomsia and G. Marshall, "Functionally graded bioactive coatings: Reproducibility and stability of the coating under cell culture conditions," *Acta Biomater.*, vol. 2, no. 2, pp. 133-142, 2006.
- [187] S. Ramesh, A. N. Natasha, C. Y. Tan, L. T. Bang, A. Niakan, J. Purbolaksono, H. Chandran, C. Y. Ching, S. Ramseh and W. D. Temg, "Characteristics and properties of hydroxyapatite derived by sol-gel and wet chemical precipitation methods," *Ceram. Int.*, 2015.
- [188] D. Bellucci, A. Sola, A. Anesi, R. Salvatori, L. Chiarini and V. Cannillo, "Bioactive glass/hydroxyapatite composites: Mechanical properties and biological evaluation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 51, pp. 196-205, 2015.
- [189] K. So, S. Fujibayashi, M. Neo, Y. Anan, T. Ogawa, T. Kokubo and T. Nakamura, "Accelerated degradation and improved bone-bonding ability of hydroxyapatite ceramics by the addition of glass," *Biomaterials*, vol. 27, no. 27, pp. 4738-4744, 2006.

- [190] Z. Li, N. W. Khun, X. Z. Tang, E. Liu and K. A. Khor, "Mechanical, tribological and biological properties of novel 45S5 Bioglass®composites reinforced with in situ reduced graphene oxide," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 65, pp. 77-89, 2017.
- [191] Q. Chen, J. Roether and A. Boccaccini, "Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials," *Top. Tissue Eng.*, vol. 4, no. 6, pp. 1-27, 2008.
- [192] A. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong and J. F. Mano, "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 70, no. 13, pp. 1764-1776, 2010.
- [193] A. R. Boccaccini and V. Maquet, "Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 63, no. 16, pp. 2417-2429, 2003.
- [194] Z. G. Huan, M. A. Leeflang, J. Zhou and J. Duszczuk, "ZK30-bioactive glass composites for orthopedic applications: A comparative study on fabrication method and characteristics," *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 176, no. 20, pp. 1644-1652, 2011.
- [195] Z. Huan, J. Zhou and J. Duszczuk, "Magnesium-based composites with improved in vitro surface biocompatibility," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 12, pp. 3163-3169, 2010.
- [196] P. Ducheyne and L. L. Hench, "The processing and static mechanical-properties of metal fiber reinforced bioglass," *J. Mater. Sci.*, vol. 17, no. 2, pp. 595-606, 1982.
- [197] M. Jurczyk, K. Jurczyk, A. Miklaszewski and M. Jurczyk, "Nanostructured titanium-45S5 Bioglass scaffold composites for medical applications," *Materials and Design*, vol. 32, pp. 4882-4889, 2011.
- [198] K. Jurczyk, M. U. Jurczyk, K. Niespodziana, J. Jakubowicz and M. Jurczyk, "Titanium-10 wt% 45S5 Bioglass nanocomposite for biomedical applications," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 131, no. 1-2, pp. 540-546, 2011.
- [199] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907-2915, 2006.
- [200] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen and T. K. Greenle, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 117-141, 1971.
- [201] D. L. Wheeler, M. J. Montfort and S. W. McLoughlin, "Differential healing response of bone adjacent to porous implants coated with hydroxyapatite and 45S5 bioactive glass," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 4, pp. 603-612, 2001.
- [202] L. Zhao, H. Wang, K. Huo, L. Cui, W. Zhang, H. Ni, Y. Zhang, Z. Wu and P. K. Chu, "Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 24, p. 5706-5716, 2011.
- [203] S. Taheri, A. Cavallaro, S. N. Christo, L. E. Smith, P. Majewski, M. Barton, J. D. Hayball and K. Vasilev, "Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings," *Biomaterials*, vol. 35, no. 16, p. 4601-4609, 2014.
- [204] G. Bhardwaj and T. J. Webster, "Reduced bacterial growth and increased osteoblast proliferation on titanium with a nanophase TiO₂ surface treatment," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, p. 363-369, 2017.
- [205] S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo and T. J. Webster, "The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment," *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, p. 706-713, 2010.
- [206] J. Slots and R. Gibbons, "Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subs. *acaccherolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and odperiodontal pockets," *Infection and Immunity*, vol. 19, pp. 254-264, 1978.
- [207] J. W. Costerton, P. S. Stewart and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, 1999.

Referencias

- [208] H. Wu, X. Zhang, Z. Geng, Y. Yin, R. Hang, X. Huang, X. Yao and B. Tang, "Preparation, antibacterial effects and corrosion resistant of porous Cu-TiO₂ coatings," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 308, pp. 43-49, 2014.
- [209] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro and J. W. Costerton, "Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 5967-5982, 2012.
- [210] W. Zimmerli and C. Moser, "Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 158-168, 2012.
- [211] R. M. Donlan and J. W. Costerton, "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 2, pp. 167-93, 2002.
- [212] D. R. Monteiro, L. F. Gorup, A. S. Takamiya, A. C. Ruvollo-Filho, E. R. de Camargo and D. B. Barbosa, "The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 34, no. 2, pp. 103-110, 2009.
- [213] T.-F. C. M. a. G. A. O'Toole, "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents," *Trends Microbiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 34-39, 2001.
- [214] L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang and Z. Wu, "Antibacterial coatings on titanium implants," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 91B, no. 1, pp. 470-480, 2009.
- [215] J. Hasan, R. J. Crawford and E. P. Ivanova, "Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, pp. 295-304, 2013.
- [216] A. Bassegoda, K. Ivanova, E. Ramon and T. Tzanov, "Strategies to prevent the occurrence of resistance against antibiotics by using advanced materials," pp. 2075-2089, 2018.
- [217] H. G. Schild, "Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application," *Progress in Polymer Science*, vol. 17, no. 2, pp. 163-249, 1992.
- [218] Q. Yu, Z. Wu and H. Chen, "Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 16, no. 1, pp. 1-13, 2015.
- [219] O. Akhavan and E. Ghaderi, "Capping antibacterial Ag nanorods aligned on Ti interlayer by mesoporous TiO₂ layer," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 203, no. 20-21, pp. 3123-3128, 2009.
- [220] Z. Jia, M. Li, P. Xiu, X. Xu, Y. Cheng, Y. Zheng, T. Xi, S. Wei and Z. Liu, "A novel cytocompatible, hierarchical porous Ti6Al4V scaffold with immobilized silver nanoparticles," *Materials Letters*, vol. 157, pp. 143-146, 2015.
- [221] R. Arunachalam, S. Dhanasingh, B. Kalimuthu, M. Uthirappan, C. Rose and A. B. Mandal, "Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Coccinia grandis* leaf extract and its application in the photocatalytic degradation," *Colloid and Surfaces B*, vol. 94, no. 1, pp. 226-230, 2012.
- [222] J. Luo, S. Jiang, H. Zhang, J. Jiang and X. Liu, "A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode," *Analytica Chimica Acta*, vol. 709, pp. 47-53, 2012.
- [223] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel and C. A. Mirkin, "Gold Nanoparticles for Biology and Medicine," *Angewandte Chemie International Ed.*, vol. 49, no. 19, p. 3280-3294, 2010.
- [224] J. R. S. Ping, K. Fan, J. Wu and Y. Ying, "Copper oxide nanoparticles and ionic liquid modified carbon electrode for the non-enzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide," *Microchimica Acta*, vol. 171, no. 1-2, p. 117-123, 2010.
- [225] X. Zhao and L. Qi, "Rapid microwave-assisted synthesis of hierarchical ZnO hollow spheres and their application in Cr(VI) removal," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 23, 2012.
- [226] S. Rtimi, O. Baghriche, C. Pulgarin, A. Ehasarian, R. Bendorf and J. Kiwi, "Comparison of HIPIMS sputtered Ag- and Cu-surfaces leading to accelerated bacterial inactivation in the dark," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 250, pp. 14-20, 2014.
- [227] L. Nan, J. Cheng and K. Yang, "Antibacterial Behavior of a Cu-bearing Type 200 Stainless Steel," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1067-1070, 2012.

- [228] K. Pałka and R. Pokrowiecki, "Porous Titanium Implants: A Review," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 20, no. 5, pp. 1-18, 2018.
- [229] M. C. Lawson, R. Shoemaker, K. B. Hoth, C. N. Bowman and K. S. Anseth, "Polymerizable Vancomycin Derivatives for Bactericidal Biomaterial Surface Modification: Structure–Function Evaluation," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 8, pp. 2221-2234, 2009.
- [230] B. J. Nablo, A. R. Rothrock and M. H. Schoenfisch, "Nitric oxide-releasing sol–gels as antibacterial coatings for orthopedic implants," *Biomaterials*, vol. 26, no. 8, pp. 917-924, 2005.
- [231] M. Moritz and M. Geszke-Moritz, "The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles," *Chem. Eng. J.*, vol. 228, pp. 596-613, 2013.
- [232] R. G. Chapman, E. Ostuni, M. N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, P. Gerald, H. Shaw Warren and G. M. Whitesides, "Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria," *Langmuir*, vol. 17, no. 4, pp. 1225-1233, 2001.
- [233] J. B. Schlenoff, "Zwitteration: Coating Surfaces with Zwitterionic Functionality to Reduce Nonspecific Adsorption," *Langmuir*, vol. 30, no. 32, pp. 9625-9636, 2014.
- [234] K. McGilvray, E. I. Waldorff, J. Easley, H. B. Seim, N. Zhang, R. J. Linovitz, J. T. Ryaby and C. M. Puttlitz, "Evaluation of a polyetheretherketone (PEEK) titanium composite interbody spacer in an ovine lumbar interbody fusion model: biomechanical, microcomputed tomographic, and histologic analyses," *Spine J.*, vol. 17, no. 12, pp. 1907-1916, 2017.
- [235] H. K. Tsou, M. H. Chi, Y. W. Hung, C. J. Chung and J. L. He, "In Vivo Osseointegration Performance of Titanium Dioxide Coating Modified Polyetheretherketone Using Arc Ion Plating for Spinal Implant Application," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [236] C. Shuai, C. Shuai, P. Feng, C. Gao, S. Peng and Y. Yang, "Antibacterial capability, physicochemical properties, and biocompatibility of nTiO₂ incorporated polymeric scaffolds," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 3, p. 328, 2018.
- [237] J. Li, X. Liu, Y. Qiao, H. Zhu, J. Li, T. Cui and C. Ding, "Enhanced bioactivity and bacteriostasis effect of TiO₂ nanofilms with favorable biomimetic architectures on titanium surface," *RSC Advances*, vol. 3, no. 28, p. 1124, 2013.
- [238] S. Foppiano, S. J. Marshall, G. W. Marshall, E. Saiz and A. P. Tomsia, "Bioactive glass coatings affect the behavior of osteoblast-like cells," *Acta Biomater.*, vol. 3, p. 765–771, 2007.
- [239] ASTM, C373-14, 2014.
- [240] J. Banhart, *Advanced Tomographic Methods in Materials Research and Engineering*, First ed, New York: Oxford University Press, 2008.
- [241] F. Garcia-Moreno, M. Fromme and J. Banhart, "Real-time X-ray Radioscopy on Metallic Foams Using a Compact Micro-Focus Source," *Adv.Eng.Mater.*, vol. 6, no. 6, pp. 416-420, 2004.
- [242] ASM-International, *Nondestructive Evaluation and Quality Control*, 9th ed., 1989.
- [243] J. Müller-Rochholz, "Determination of the elastic properties of lightweight aggregate by ultrasonic pulse velocity measurement," *Int. J. Cem. Compos. Light. Concr.*, vol. 1, pp. 87-90, 1979.
- [244] ASTM, E9-09.
- [245] C. Díaz, M. C. Cortizo, P. L. Schilardi, S. G. Gómez de Saravia and M. A. Fernández Lorenzo de Mele, "Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion," *Mater. Res.*, vol. 10, pp. 11-14, 2007.
- [246] ISO, 25178.
- [247] W. C. Oliver and G. M. Pharr, "An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments," *J. Mater. Res.*, vol. 7, p. 1564–1583, 1992.
- [248] M. Mata and J. Alcalá, "The role of friction on sharp indentation," *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 52, pp. 145-165, 2004.

Referencias

- [249] W. C. Oliver and G. M. Pharr, "Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: advances in understanding and refinements to methodology," *J. Mater. Res.*, vol. 19, pp. 3-20, 2004.
- [250] M. R. Vanlandingham, "Review of instrumented indentation," *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 108, pp. 249-265, 2003.
- [251] J. A. Rodríguez-Ortiz, A. Coronel, J. J. Pavón, L. Cordero, A. R. Boccaccini, C. Romero and Y. Torres, "Surface modification of porous titanium for bone repair: Controlled etching by chemical and electrochemical treatments," in *9th International Conference on Porous Metals and Metallic Foams (MetFoam)*, Barcelona, 2015.
- [252] A. International, *ASM Handbook, Volume 7: Powder Metallurgy*, 2015.
- [253] X.-Z. Yin, T.-Q. Xiao, A. Nangia, S. Yang, X.-L. Lu, H.-Y. Li, Q. Shao, Y. He, P. York and J.-W. Zhang, "In situ 3D topographic and shape analysis by synchrotron radiation X-ray microtomography for crystal form identification in polymorphic mixtures," *Scientific Reports*, vol. 6, p. 24763, 2016.
- [254] S. Morris, R. J. K. Wood, T. J. Harvey and H. E. G. Powrie, "Electrostatic charge monitoring of unlubricated sliding wear of a bearing steel," *Wear*, vol. 255, pp. 430-443, 2003.
- [255] R. G. Bayer, *Mechanical Wear Fundamentals and Testing*, Second edition, revised and expanded, CRC Press, 2004.
- [256] T. B. Kim, S. Yue, Z. Zhang, E. Jones, J. R. Jones and P. D. Lee, "Additive manufactured porous titanium structures: Through-process quantification of pore and strut networks," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 214, pp. 2706-2715, 2014.
- [257] G. Pyka, G. Kerckhofs, I. Papantoniou, M. Speirs, J. Schrooten and M. Wevers, "Surface Roughness and Morphology Customization of Additive Manufactured Open Porous Ti6Al4V Structures," *Materials*, vol. 6, pp. 4737-4757, 2013.
- [258] C. Aparicio, F. J. Gil, U. Thams, F. Muñoz, A. Padrós and J. A. Planell, "Osseointegration of grit-blasted and bioactive titanium implants: Histomorphometry in minipigs," *Key Eng Mater.*, pp. 254-256: 737-740, 2004.
- [259] L. L. Guehennec, E. Goyenvalle, M. A. Lopez- Heredia, P. Weiss, Y. Amouriq and P. Layrolle, "Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 19, pp. 1103-1110, 2008.
- [260] C. Aparicio, F. Gil, J. Planell and E. Engel, "Human-osteoblast proliferation and differentiation on gritblasted and bioactive titanium for dental application," *J Mater Sci Mater Med.*, vol. 13, p. 1105-1111, 2003.
- [261] Y. Chen, J. E. Frith, A. Dehghan- Manshadi, D. Kent, M. Bermingham and M. Dargusch, "Biocompatible porous titanium scaffolds produced using a novel space holder technique," *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 106, pp. 2796-2806, 2018.
- [262] B. Chang, W. Song, T. Han, J. Yan, F. Li, L. Zhao, H. Kou and Y. Zhang, "Influence of pore size of porous titanium fabricated by vacuum diffusion bonding of titanium meshes on cell penetration and bone ingrowth," *Acta Biomater.*, vol. 33, pp. 311-321, 2016.
- [263] M. Herrero-Climent, P. Lázaro, J. Vicente Rios, S. Lluch, M. Marqués, J. GuillemMartí and F. J. Gil, "Influence of acid-etching after grit-blasted on osseointegration of titanium dental implants: in vitro and in vivo studies," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, pp. 2047-2055, 2013.
- [264] T. S. Jang, H. D. Jung, S. Kim, B. S. Moon, J. Baek, C. Park, J. Song and H. E. Kim, "Multiscale porous titanium surfaces via a two-step etching process for improved mechanical and biological performance," *Biomed. Mater.*, vol. 12, no. 2, 2017.
- [265] B. Chang, W. Song, T. Han, J. Yan, F. Li, L. Zhao, H. Kou and Y. Zhang, "Influence of pore size of porous titanium fabricated by vacuum diffusion bonding of titanium meshes on cell penetration and bone ingrowth," *Acta Biomater.*, vol. 33, pp. 311-321, 2016.
- [266] F. O. Fowler, "Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution," *Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 194-207, 1974.

- [267] F. O. Fowler, "Infrared studies of apatites. II. Preparation of normal and isotopically substituted calcium, strontium, and barium hydroxyapatites and spectra-structure-composition correlations," *Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 207-214, 1974.
- [268] N. Pleshko, A. Boskey and R. Mendelsohn, "Novel Infrared Spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals," *Biophys. J.*, vol. 60, pp. 786-793, 1991.
- [269] A. Bigi, E. Boanini and K. Rubini, "Hydroxyapatite gels and nanocrystals prepared through a sol-gel process," *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 177, no. 9, pp. 3092-3098, 2004.
- [270] A. Antonakosa, E. Liarakapisa and T. Leventouri, "Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 3043-3054, 2007.
- [271] R. Z. Legeros, "Apatites in biological systems," *Progress in crystal growth and characterization*, vol. 4, no. 1-2, pp. 1-45, 1981.
- [272] A. Stoch, b. W. Jastrze, E. Długoń, W. Lejda, B. Trybalska, G. J. Stoch and A. Adamczyk, "Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V," *Journal of Molecular Structure*, Vols. 744-747, pp. 633-640, 2005.
- [273] L. El Hammari, H. Merroun, T. Coradin, S. Cassaignon, A. Laghzizil and A. Saoiabi, "Mesoporous hydroxyapatites prepared in ethanol-water media: Structure and surface properties," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 104, no. 2-3, pp. 448-453, 2007.
- [274] E. Peón Avés, J. C. Galván, I. R. Lima, J. Mauro Granjeiro, I. Napoleau Bastos and G. D. Soares, "Recobrimento da liga Ti-6Al-4V com hidroxiapatita pelo método sol-gel e sua aplicação a hastes femorais não-cimentadas," *Cerâmica*, vol. 54, pp. 476-479, 2008.
- [275] D. M. Liu, T. Troczynski and W. Tseng, "Water basec sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development," *Biomaterials*, vol. 22, pp. 1721-1730, 2001.
- [276] D. M. Liu, Q. Yang and T. Troczynski, "Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrate," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 691-698, 2002.
- [277] M. H. Fathi and A. Hanifi, "Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method," *Mater. Lett.*, vol. 61, p. 3978-3983, 2007.
- [278] E. Peón Avés, J. C. Galván, I. R. Lima, J. Mauro Granjeiro, I. Napoleau Bastos and G. D. Soares, "Recobrimento da liga Ti-6Al-4V com hidroxiapatita pelo método sol-gel e sua aplicação a hastes femorais não-cimentadas," *Cerâmica*, vol. 54, pp. 476-479, 2008.
- [279] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti and S. Sprio, "Densification Behaviour and Mechanisms of Synthetic Hydroxyapatites," *Journal European Ceramic Society*, vol. 20, pp. 2377-2387, 2000.
- [280] D. C. Clupper Jr., J. J. Mecholsky, G. P. LaTorre and D. C. Greenspan, "Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid," *Biomaterials*, vol. 23, p. 2599-2606, 2002.
- [281] Z. Mladenović, A. Johansson, B. Willman, K. Shahabi, E. Björn and M. Ransjö, "Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro," *Acta Biomater.*, vol. 10, p. 406-418, 2014.
- [282] R. J. Friederichs, R. A. Brooks, M. Ueda and S. M. Best, "In vitro osteoclast formation and resorption of silicon-substituted hydroxyapatite ceramics," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, pp. 3312-3322, 2015.
- [283] S. Ferraris, A. Venturello, M. Miola, A. Cochis, L. Rimondini and S. Spriano, "Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 311, pp. 279-291, 2014.
- [284] G. Ciobanu and O. Ciobanu, "Investigation of the effect of collagen and vitamins on biomimetic hydroxyapatite coating formation on titanium surfaces," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, pp. 1683-1688, 2013.
- [285] Ö. H. Andersson, G. Liu, K. H. Karlsson, L. Niem, J. Miettine and J. Juhanaja, "In vivo behaviour of glasses in the SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅-Al₂O₃-B₂O₃ system," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 1, pp. 219-227, 1990.

Referencias

- [286] M. R. Azenha, O. Peitl and V. M. Barros, "Bone response to biosilicates with different crystal phases," *Braz. Dent. J.*, vol. 21, pp. 383-389, 2010.
- [287] K. Jurczyk, K. Niespodziana, M. U. Jurczyk and M. Jurczyk, "Synthesis and characterization of titanium-45S5 Bioglass nanocomposites," *Mater. Des.*, vol. 32, pp. 2554-2560, 2011.
- [288] A. Scislowska-Czarnecka, E. Menaszek, B. Szaraniec and E. Kolaczowska, "Ceramic modifications of porous titanium: effects on macrophage activation," *Tissue Cell*, vol. 44, pp. 391-400, 2012.
- [289] P. Sarria, Y. Torres, F. J. Gotor, E. Gutiérrez, M. Rodríguez, R. González, L. Hernández, E. Peon, H. Guerra and J. González, "Processing and characterization of Ti-6Al-4V samples manufactured by selective laser melting," *Key Eng. Mater.*, vol. 704, pp. 260-268, 2016.
- [290] S. Clavijo, F. Membrived, G. Quiroga, A. R. Boccaccini and M. J. Santillán, "Electrophoretic deposition of chitosan/Bioglass® and chitosan/Bioglass®/TiO₂ composite coatings for bioimplants," *Ceram.Int.*, vol. 42, no. 12, pp. 14206-14213, 2016.
- [291] S. Seuss, M. Heinloth and A. R. Boccaccini, "Development of bioactive composite coatings based on combination of PEEK, bioactive glass and Ag nanoparticles with antibacterial properties," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 301, pp. 100-105, 2016.

COMPENDIO DE TRABAJOS

Deposición sol-gel de hidroxiapatita bioactiva sobre titanio poroso

Sol-gel deposition of bioactive hydroxyapatite on porous titanium

Eduardo Peón,^I Cristina Domínguez,^{II} Helen Pérez,^I Juan Carlos Galván,^{III} José Antonio Rodríguez Ortiz,^{II} Juan José Pavón,^{IV} Yadir Torres^{II}

^I Centro de Biomateriales. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{II} Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

^{III} Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.

^{IV} Grupo de Biomateriales Avanzados y Medicina Regenerativa. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: el titanio y algunas de sus aleaciones son considerados la mejor opción para fabricar implantes permanentes, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión en el ambiente fisiológico, además de su buena biocompatibilidad y osteointegración.

Objetivo: solucionar algunas de las limitaciones más significativas de los implantes de titanio: fenómenos de fatiga y falla de la biointerfase.

Métodos: muestras de titanio grado IV con porosidad de 250-355 μm , fueron obtenidas por la técnica de space-holder (50 % vol. NH_4HCO_3 , 800 MPa y 1250 $^\circ\text{C}$ durante 2 h en alto vacío), produciéndose buen balance entre rigidez y resistencia mecánica del material. Detrás los sustratos de titanio poroso fueron recubiertos con hidroxiapatita obtenida vía sol-gel, por inmersión, secadas a 80 $^\circ\text{C}$ y tratadas térmicamente a 450 $^\circ\text{C}$ durante 5 h en vacío. La formación de fase, morfología de la superficie, microestructura interfacial, capacidad de infiltración y sección transversal de los recubrimientos, fue investigada por diferentes métodos de análisis químico-físico.

Resultados: los análisis de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier y difracción de rayos X mostraron la cristalinidad de la fase y la homogeneidad en la composición química del recubrimiento. La evaluación micromecánica y adherencia del recubrimiento (curvas de P-h y resistencia al rayado) demostraron una buena adherencia del recubrimiento al sustrato metálico. El recubrimiento fue poroso sin evidencia de formación de grietas. Estos poros aparecen interconectados formando una red continua, característica morfológica que es una ventaja para permitir la circulación de fluido fisiológico, cuando se utiliza el sistema para aplicaciones biomédicas.

Conclusiones: la cristalinidad satisfactoria y adhesión entre el recubrimiento y el sustrato sugieren el sistema como promisorio para aplicaciones en el desarrollo de implantes ortopédicos.

Palabras clave: Hidroxiapatita; titanio; sol-gel; tamaño de poro.

ABSTRACT

Introduction: Titanium and some titanium alloys are considered to be the best materials for permanent implants, due to their excellent mechanical properties and resistance to corrosion in physiological environments, as well as their good biocompatibility and osseointegration. **Objective:** Solve some of the most significant limitations of titanium implants: fatigue phenomena and biointerface failure.

Methods: Samples of cp titanium grade 4 with a porosity of 250-355 μm were obtained by space-holder technique (50 % vol. NH_4HCO_3 , 800 MPa and 1250 $^\circ\text{C}$ for 2 h in high vacuum), achieving a good balance between rigidity and mechanical resistance of the material. The porous titanium substrates were then covered with hydroxyapatite obtained via sol-gel immersion, dried at 80 $^\circ\text{C}$ and thermally treated at 450 $^\circ\text{C}$ for 5 h in a vacuum. Phase formation, surface morphology, interfacial microstructure, infiltration capacity and cross-section of coatings, were assessed with various physicochemical analysis methods.

Results: Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction analysis showed the crystallinity of the phase and the homogeneity in the chemical composition of the coating. Micromechanical evaluation and coating adherence (P-h curves and scratch resistance) revealed good adherence of the coating to the metallic substrate. The coating was found to be porous without any evidence of crack formation. The pores seem to be interconnected into a continuous network, a morphological characteristic enabling circulation of physiological fluid when the system is used for biomedical applications.

Conclusions: Satisfactory crystallinity and adhesion between the coating and the substrate suggest that the system is promising for application in the development of orthopedic implants.

Key words: hydroxyapatite; titanium; sol-gel; pore size.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de implantes ortopédicos se enfoca en lograr una mejor calidad y una mayor durabilidad. La funcionalidad del implante es afectada por varios factores: las propiedades intrínsecas de los materiales utilizados en su fabricación y sus componentes (forma y geometría que ofrece); la calidad y cantidad de tejido óseo y la bioquímica y energía de la superficie de la biointerfase entre el hueso y el implante. La meta para un implante ideal es lograr el equilibrio bioquímico y mecánico.¹

El titanio y algunas de sus aleaciones son considerados la mejor opción para fabricar implantes permanentes, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión en el ambiente fisiológico, además de su buena biocompatibilidad y osteointegración.² Una solución recurrente es el uso de la técnica de space-holder para aproximar ambos módulos elásticos (hueso-implante), por su buena efectividad y viabilidad. Es posible producir un material con un módulo elástico similar al hueso cortical, con una porosidad entre 40-50 %. Además de obtener un material poroso que resuelve el problema de la protección contra la tensión, el tamaño de poro conseguido asegura un crecimiento óseo óptimo hacia el implante y la rugosidad de poro mejora la osteointegración.

Los implantes metálicos porosos recubiertos con materiales bioactivos, como la hidroxiapatita (HA), puede acelerar la formación del hueso en la fase inicial de oseointegración, mejorándose la fijación del injerto.³ La alta resistencia mecánica y tenacidad del titanio y sus aleaciones son las ventajas más importantes sobre la cerámica de HA. Por lo tanto, un sistema que unen ambos materiales tiene las ventajas mecánicas del sustrato subyacente (metálico) y la afinidad biológica de la HA.^{3,4} Capas finas de HA sobre sustratos de titanio (Ti) poroso puede prepararse utilizándose la técnica de sol-gel. Los métodos sol-gel son capaces de mejorar la homogeneidad química de la HA resultante que recubre en una magnitud significante, cuando se compara con otros métodos.⁵⁻⁸ Estos métodos también son simples y menos caros que el método de rociado por plasma, empleado en la actualidad para las aplicaciones biomédicas.⁹⁻¹¹ Estudios previos relacionados con la obtención de polvos de HA nanoestructurada por la ruta sol-gel, demostraron la dependencia de tamaño del cristalitas así como el grado del cristalinidad en las capas de HA, en dependencia del tratamiento térmico aplicado.^{12,13}

El objetivo de este trabajo consiste en solucionar algunas limitaciones importantes de los implantes de

titanio. Por un lado, el fenómeno de tensiones en el material, desarrollándose un sustrato de titanio poroso con buen equilibrio entre rigidez y resistencia mecánica. Por otro lado, las fallas de la biointerfase, mediante recubrimientos de HA bioactiva, utilizándose la técnica sol-gel, sobre el sustrato metálico.

MÉTODOS

Los materiales empleados en la preparación de los sustratos porosos (figura 1 a y b), consistió en titanio c.p. grado IV (SEJONG Materials Co. Ltd. Seoul, Korea) y bicarbonato de amonio (Cymit Química S.L. España) para crear el sustrato poroso de Ti mediante el uso de la técnica de space-holder. El NH_4HCO_3 debe ser tamizado de manera previa para obtener el rango de tamaño de poro empleado en este trabajo, correspondiente al tamaño de partícula de 250 a 355 μm .

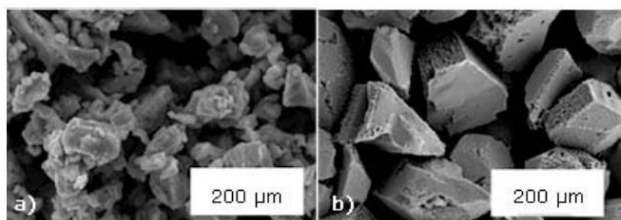


Fig. 1. a) Polvo de Ti c.p. grade IV, b) Polvo de NH_4HCO_3 .

La mezcla de Ti en polvo y partículas de NH_4HCO_3 se preparó con una concentración de 50 % vol., mediante un mezclador Turbula T2C durante 40 min, para lograr un buen grado de homogeneización. El contenido y el tamaño del NH_4HCO_3 fueron elegidos de acuerdo con los trabajos previos de otros autores,¹⁴⁻¹⁶ basados en la porosidad óptima para igualar las propiedades mecánicas del hueso cortical (módulo de Young de 20 GPa y resistencia mecánica de 150-180 MPa). Detrás, se aplicó una presión de compactación de 800 MPa, utilizándose una prensa Instron 5505. Los compactos se colocaron primero en estufa a 60 °C y después a 110 °C bajo vacío ($\sim 10^{-2}$ mbar), durante 12 h. El proceso de sinterización se realizó en mufla Carbolyte STF 15/75/450 con tubo horizontal a 1250 °C durante 2 h utilizándose alto vacío ($\sim 10^{-5}$ mbar).

El recubrimiento de HA cristalina, fue preparado aplicándose una variante del proceso sol-gel descrito por D. M. Liu.^{17,18} Los soles se obtuvieron utilizando como reactivos trietil fosfito y nitrato cálcico tetrahidratado. La hidrólisis del precursor del fósforo se realiza bajo agitación vigorosa, utilizando una relación molar agua/fosfito igual a 4. Tras 24 h de hidrólisis, se añade al medio el precursor salino de Ca, para que se obtenga el gel de HA. Luego de 24 h de hidrólisis, se añade al medio la cantidad estequiométrica (relación Ca/P = 1,64) de disolución 4 M de nitrato de calcio. Se mantiene la agitación durante 30 min y a continuación se deja reposar a temperatura ambiente otras 24 h. Cuando el gel alcanza la viscosidad adecuada, se deposita sobre la superficie metálica mediante inmersión, a una velocidad de 5 cm/min. Los recubrimientos producidos se sometieron a tratamiento térmico de 450 °C durante 5 h en vacío.

El recubrimiento resultante de hidroxiapatita se ha caracterizado mediante espectroscopia infrarroja (FTIR, Nicolet Magna 550), difracción de rayos X (DRX, Rigaku-Miniflex), microscopía electrónica de barrido (MEB/EDX, JEOL JSM-6460LV con analizador Noran System Six 200).

Además, se estudió el comportamiento de contacto deslizante de las superficies mediante ensayos de micro-rayado, en un dispositivo comercial MICROTTEST (MTR3/50-50/NI) utilizándose punta de diamante Rockwell con un diámetro de 200 μm y cargas constantes de 1 N y 30 N a una velocidad de 0,5 mm/min durante 6 mm de longitud, respectivamente según lo establecido por la norma ASTM C1624-05. La carga normal se registra continuamente durante el rayado. La respuesta de contacto deslizante se dio en términos de curvas de penetración-carga de rayado.

RESULTADOS

En teoría, existen cuatro modos de vibración para iones fosfato $\nu_1(961\text{ cm}^{-1})$, $\nu_2(475\text{-}440\text{ cm}^{-1})$, $\nu_3(190\text{-}976\text{ cm}^{-1})$ y $\nu_4(660\text{-}520\text{ cm}^{-1})$. El ion fosfato es el principal grupo funcional empleado en la caracterización estructural de HA. Las bandas entre $500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ son típicas de la vibración antisimétrica P-O-P y definen la HA cristalina por dos bandas al menos.^{19,20}

En la [figura 2](#) se muestra los detalles del espectro IR de las muestras estudiadas. Se observan las bandas características de las vibraciones $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ sobre los 560 y 600 cm^{-1} , $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ sobre los 960 cm^{-1} y $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ entre los 1040 y 1090 cm^{-1} . La vibración $\nu(\text{OH}^-)$ se observa a 3572 cm^{-1} , atribuible a los grupos OH^- , además a 632 cm^{-1} atribuible también a los grupos OH^- .²¹

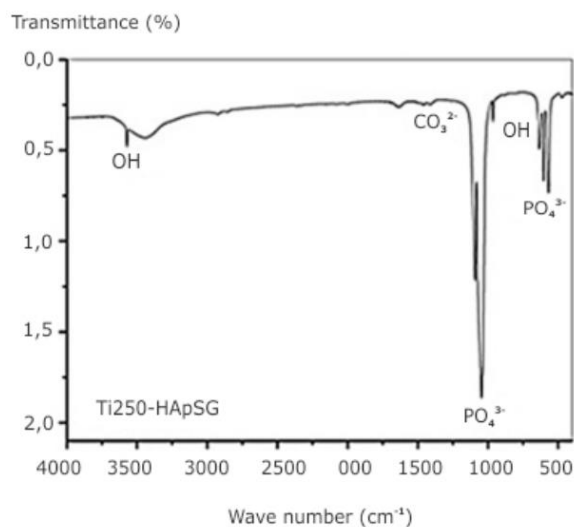


Fig. 2. Espectros FTIR de los recubrimientos de HA sobre titanio poroso.

Los patrones de DRX para las muestras de titanio poroso recubiertas con HA se detalla en la [figura 3](#). Se observan los picos que aparecen en $25,93^\circ$ (002), $31,82^\circ$ (211), $32,27^\circ$ (112), $32,99^\circ$ (300) y $49,58^\circ$ (213), son característicos de la fase HA, según la cartoteca PCPDFWIN v. 2,4 # 09-0432.

Deposición sol-gel de hidroxiapatita bioactiva sobre titanio poroso

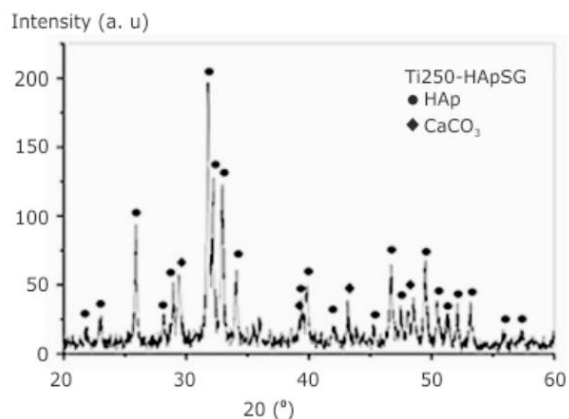


Fig. 3. Patrones de DRX de los recubrimientos sobre Ti poroso.

Según Landi y colaboradores,²² la fracción de fase cristalina en HA (X_c) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$X_c = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}}$$

Dónde: $V_{112/300}$ es la intensidad del valle entre los picos de los planos (112) y (300) de la HA. I_{300} es la intensidad del pico de difracción del plano cristalográfico (300) para la HA.

Cuando se aplica la expresión anterior, a partir de los datos que se obtienen del patrón de difracción de la figura 3, que se amplía en el intervalo de 32 a 33,2°; se obtiene que el grado de cristalinidad de los recubrimientos de HA que se prepararon por vía sol-gel sobre la aleación de Ti6Al4V.⁵

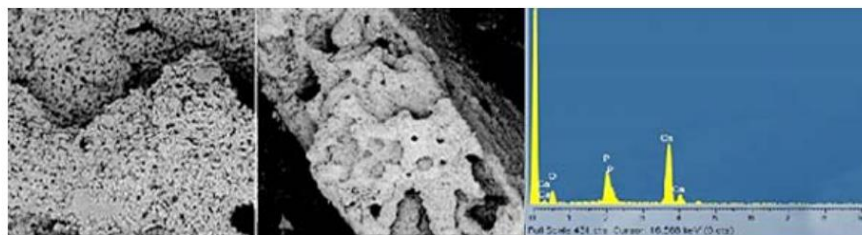


Fig. 4. Micrografías MEB del material obtenido, y análisis metalográfico del corte central y análisis EDX (derecha).

Los resultados MEB (Fig. 4) mostraron la formación de cristales en forma de racimos, estructura típica de apatita. Se observa una morfología homogénea del recubrimiento, sin grietas y sin la presencia de discontinuidad sobre el sustrato metálico.

El análisis de recubrimiento global realizado por EDX (Fig. 4 derecha) mostró que el Ca y P estaban presentes en la HA. No hubo picos comunes relacionados con el sustrato metálico u otros elementos contaminantes, lo que demostró la continuidad del recubrimiento HA.

En cuanto al comportamiento micromecánico, los resultados obtenidos se muestran en la figura 5 a) y b) y los parámetros de rugosidad se detallan en la tabla.

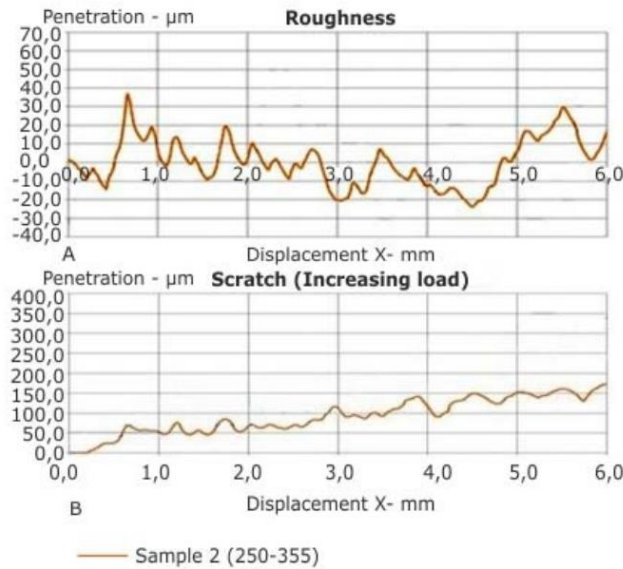


Fig. 5. Comportamiento tribológico del Ti poroso recubierto con HA.

Tabla. Parámetros de rugosidad del Ti poroso recubierto con HA

Tamaño de poro	Parámetros de rugosidad			Máxima penetración (µm)
	Ra	Rq	Rz	
250-355 µm	10,12	12,66	2,97	174,04

DISCUSIÓN

Los espectros FTIR de los materiales obtenidos, mostraron las vibraciones $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (a 563, 600 y 942 cm^{-1}), $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (a 1000 cm^{-1}) y $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ (a 1100 cm^{-1}). Estas reflexiones indican el reordenamiento de los poliedros de PO_4^{3-} en la estructura del cristal, confirmándose la transformación de la HA de fase amorfa a cristalina a solo 450 °C. La banda a 631 cm^{-1} y la banda fina a 3570 cm^{-1} son características de la estructura apatita y se atribuyen a la vibración de grupos OH^- . La banda ancha que oscila entre 3300 y 3600 cm^{-1} puede explicarse debido a la vibración de estiramiento del grupo O-H del agua absorbida. Todas las bandas observadas concuerdan con lo que se reporta en la literatura para la HA.¹⁷⁻²⁰

La HA estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ en su forma más común presenta estructura hexagonal, mientras que la apatita de los tejidos biológicos es carbonato sustituida entre un 5 y 6 % en peso que corresponde a los iones CO_3^{2-} y suelen sustituir cualquiera de los grupos PO_4^{3-} u OH^- en la HA.²¹ Durante el proceso de obtención del sol-gel de HA, una pequeña incorporación de CO_3^{2-} se detecta por la presencia de las bandas del ión CO_3^{2-} a 1 468 cm^{-1} ; atribuida a la formación de HA carbonatada o CaCO_3 . La formación CO_3^{2-} es la consecuencia de dos procesos:

Deposición sol-gel de hidroxiapatita bioactiva sobre titanio poroso

- Por un lado, la presencia de radicales etilo en el gel de HA que forman carbonato de calcio durante la pirólisis.
- La segunda razón es la combinación de calcio y CO₂ de la pirólisis durante el proceso de cristalización.

No obstante, no se consideran como impurezas para la aplicación futura del material, debido a su presencia implica una mayor similitud con el hueso.^{13,22}

Los patrones de DRX de las muestras analizadas, confirmaron que las capas de HA evolucionaron de amorfo a cristalino. La fase de CaCO₃ encontrada (correspondiente a la Calcita según la cartoteca PCPDFWIN v. 2.4 # 86-2343), y su formación ya se discutió cuando se analizaron los espectros FTIR. No se detectan picos correspondientes a otras fases de fosfatos de calcio por lo que se afirma que el sol-gel evolucionó completamente a la fase de HA.

Al aplicar la expresión de *Landi*, utilizándose los datos obtenidos del patrón de difracción de la [figura 3](#); se obtuvo que el grado de cristalinidad de los recubrimientos de HA sobre Ti poroso, que osciló entre 83 y 87 %.

La morfología superficial, áspera y porosa, observada por MEB y estudiada en los ensayos micromecánicos, proporciona una gran superficie y sitios de nucleación para la precipitación de la apatita una vez que se expone a los fluidos biológicos. La rugosidad superficial de los materiales de implante constituye un punto crítico para el crecimiento óseo en la interfaz hueso-implante. La actividad funcional de las células en contacto con los biomateriales se define por las características superficiales, especialmente por la rugosidad superficial. La última muestra una influencia importante en términos de adsorción de partículas de apatita del plasma sanguíneo. Esto promueve la transformación del enlace mecánico, lo que resulta en una mayor fuerza de unión entre el hueso y el implante.²³

CONSIDERACIONES FINALES

El trabajo realizado ha ilustrado que es posible depositar capas de HA, firmemente adheridas sobre sustratos de Ti poroso por la vía sol-gel, y tratamiento térmico a solo 450 °C. Tanto la espectroscopia FTIR como la DRX mostraron que las capas exhiben una estructura apatítica cristalina. Los recubrimientos de HA están de manera firme unidos al sustrato de Ti, a través de un enlace mecánico y posiblemente cierto grado de unión química. La presencia de recubrimientos HA juega un doble papel en la prevención de la liberación de iones metálicos (haciéndolo más resistente a la corrosión) y en hacer la superficie más bioactiva. Lo expuesto hace promisorio el sistema recubrimiento HA/Ti poroso para posibles aplicaciones biomédicas como prótesis ortopédicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo cuenta con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación y la Junta de Andalucía-FEDER (España), financiada en parte por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

APOYO FINANCIERO

Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ponsonnet K, Reybier N, Jaffrezic V, Comte C, Lagneau M, Lissac C, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* 2003;23:551-60.
2. Ferraris S, Vitale A, Bertone E, Guastella S, Cassinelli C, Pan J, et al. Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* 2016;60:384-93.
3. Goodman Stuart B, Yao Z, Keeney M, Yang F. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials.* 2013;34:3174-83.
4. Dorozhkin Sergey V. Calcium orthophosphate coatings, films and layers. *Progress in Biomaterials.* 2012;1:1-40.
5. El hadad AA, Barranco V, Jiménez-Morales A, Peón E, Galván JC. Multifunctional sol-gel derived thin film based on nanocrystalline hydroxyapatite powders. *J. Phys.: Conf. Ser. IOP Publishing Ltd.* 2010;252:012007.
6. Liu DM, Troczynski T, Tseng W. Water basec sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials.* 2001;22:1721-30.
7. Liu DM, Yang Q, Troczynski T. Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrate. *Biomaterials.* 2002;23:691-8.
8. Choudhury Pritha, Agrawal DC. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. *Surf. Coat. Tech.* 2011;206:360-5.
9. Candidato R, Sokolowski P, Pawłowski L, Denoirjean Al. Preliminary study of hydroxyapatite coatings synthesis using solution precursor plasma spraying. *Surf. Coat. Tech.* 2015;277:242-50.
10. Roy M, Krishna Balla V, Bandyopadhyay A, Bose S. Compositionally graded hydroxyapatite/tricalcium phosphate coating on Ti by laser and induction plasma. *Acta Biomater.* 2011;7:866-73.
11. Melero H, Fernández J, Dosta S, Guileman JM. Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 2011;50(2):59-64.
12. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate coatings, films and layers. *Progress in Biomaterials.* 2012;1:1-66.
13. Peón Avés E, Galván JC, Lima IR, Mauro Granjeiro J, Napoleau Bastos I, Soares GD. Recobrimento da liga Ti-6Al-4V com hidroxiapatita pelo método sol-gel e sua aplicação a hastas femorais não-cimentadas. *Cerâmica.* 2008;54:476-9.
14. Kotan G, Bor AS. Production and characterization of high porosity Ti-6Al-4V foam by space holder technique. *Powder Metallurgy.* 2007;3:82-94.
15. Esen Z, Bor S. Processing of titanium foams using magnesium spacer particles. *Scripta Mater.* 2007;56(5):341-4.
16. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T, et al. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials.* 2005;26:6014-23.
17. Liu DM, Troczynski T, Tseng W. Water basec sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials.* 2001;22:1721-30.

Deposición sol-gel de hidroxiapatita bioactiva sobre titanio poroso

Deposición sol-gel de hidroxiapatita bioactiva sobre titanio poroso

http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol36_1_17/ibi07117.htm

18. Liu DM, Yang Q, Troczynski T. Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrate. *Biomaterials*. 2002;23:691-8.
19. Fowler BO. Infrared Studies of Apatites I. *Inorganic Chemistry*. 1974;13:194-206.
20. Fowler BO. Infrared Studies of Apatites II. *Inorganic Chemistry*. 1974;13:207-14.
21. Pleshko N, Boskey A, Mendelsohn R. Novel Infrared Spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys. J.* 1991;60:786-93.
22. Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S. Densification Behaviour and Mechanisms of Synthetic Hydroxyapatites. *Journal European Ceramic Society*. 2000;20:2377-87.
23. Bagno A, Bello DD. Surface treatment and roughness properties of Ti based biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004;15(9):935-49.

Recibido: 4 de octubre de 2016.

Aprobado: 4 de noviembre de 2016.

Eduardo Peón. Centro de Biomateriales. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.
Correo electrónico: epeon@biomat.uh.cu

Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications

Surface & Coatings Technology 333 (2018) 158–162



Contents lists available at ScienceDirect

Surface & Coatings Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/surfcoat



Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications



C. Domínguez-Trujillo^a, E. Peón^b, E. Chicardi^{a,*}, H. Pérez^b, J.A. Rodríguez-Ortiz^a, J.J. Pavón^c, J. García-Couce^b, J.C. Galván^d, F. García-Moreno^e, Y. Torres^a

^a Department of Engineering and Materials Science and Transportation, Polytechnic School of Seville (EPS), University of Seville (US), Virgen de Africa 7, 41011 Seville, Spain

^b Biomaterials Center (BIOMAT), University of La Habana (UH), La Habana 10600, Cuba

^c Group of Advanced Biomaterials and Regenerative Medicine, BAMR, Bioengineering Program, University of Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia

^d National Centre for Metallurgical Research, CENIM-CSIC, Gregorio del Amo Avenue 8, 28040 Madrid, Spain

^e Helmholtz Zentrum Berlin, Institute of Applied Materials, Hahn-Meitner-Platz 1, 14109 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Space-holder
Hydroxyapatite
Porous titanium
Sol-gel
Stress-shielding
Osseointegration

ABSTRACT

The stress shielding and the poor osseointegration in titanium implants are still problems to be resolved. In this context, this work proposes a balanced solution. Titanium samples were fabricated, with a porosity of 100–200 μm of pore size employing space-holder technique (50 vol% NH₄HCO₃, 800 MPa at 1250 °C during 2 h under high vacuum conditions), obtaining a good equilibrium between stiffness and mechanical resistance. The porous titanium substrates were coated with hydroxyapatite, obtained by sol-gel technique: immersion, dried at 80 °C and heat treatment at 450 °C during 5 h under vacuum conditions. Phases, surface morphology and interfacial microstructure of the transverse section were analyzed by Micro-Computed Tomography, SEM and confocal laser, as well as the infiltration capability of the coating into the metallic substrate pores. The FTIR and XRD showed the crystallinity of the phases and the chemical composition homogeneity of the coating. The size and interconnected pores obtained allow the infiltration of hydroxyapatite (HA), possible bone ingrowth and osseointegration. The scratch resistance of the coating corroborated a good adherence to the porous metallic substrate. The coated titanium samples have a biomechanical and biofunctional equilibrium, as well as a potential use in biomedical applications (partial substitution of bone tissue).

1. Introduction

Bone tissues are affected by the aging of people and diseases. Commercial pure Titanium (c.p. Ti) and the alloy Ti₆Al₄V are well known biomaterials and clinically accepted thanks to their good mechanical properties and corrosion resistance in physiological fluids [1,2]. Nevertheless, they still exhibit some problems which have to be resolved: the biomechanical (stress-shielding phenomenon) [3] and the biofunctional (poor osseointegration) [4]. The stiffness discrepancy between the implant and the bone tissue can be addressed by making porous materials. In addition, the generated pores could improve bone ingrowth towards the interior of the implant (with an optimal pore size) [2,5] and the enhancement of the osseointegration thanks to the roughness [6] within the pore [7]. On the other hand, the surface of the implant must be modified to improve the osseointegration capacity and avoid the micro movements at the implant-bone interface [2]. The use of bioactive HA coatings promotes the bone formation, the adhesion

and the fixation of the metallic substrates [2,8]. In the literature, different deposition techniques are reported not only for bioactive HA, but also for other coatings: sol-gel, electrochemical, electrophoretic, micro-arc, plasma spraying, sputter, hot isostatic pressing, pulsed laser, magnetron sputtering, chemical vapor deposition (CVD), biomimetic, among others [9–13]. The sol-gel technique allows a thin HA film on porous Ti substrates to be obtained [14–16], achieving a good chemical homogeneity. Within this framework, this work proposes the production of porous titanium substrates coated with HA as a potential solution for obtaining the desired biomechanical and biofunctional balance.

2. Materials and experimental procedure

Porous titanium substrates (grade IV) were fabricated by space-holder technique [17,18], employing ammonium hydrogen carbonate, NH₄HCO₃ as space-holder (50 vol% and a particle size range of 100–200 μm). The content employed was chosen according to the

* Corresponding author.

E-mail address: echicardi@us.es (E. Chicardi).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.10.079>

Received 17 August 2017; Received in revised form 2 October 2017; Accepted 31 October 2017

Available online 02 November 2017

0257-8972/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

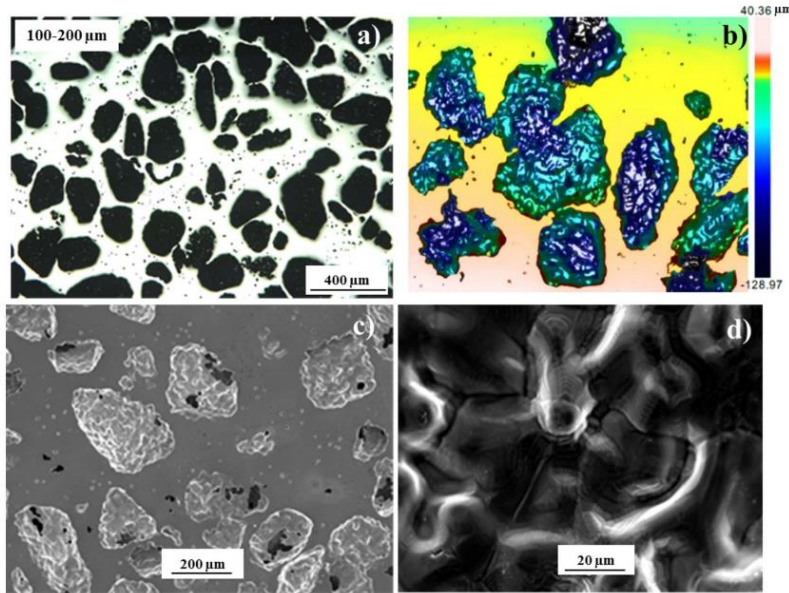


Fig. 1. a) Optical microscopy image of the porous substrate. The 100–200 μm exposed value corresponds to the size range of the NH_4HCO_3 (ammonium hydrogen carbonate) spacer used; b) Confocal image; c) SEM micrographs of the porous titanium substrate; d) pore surface micro-roughness.

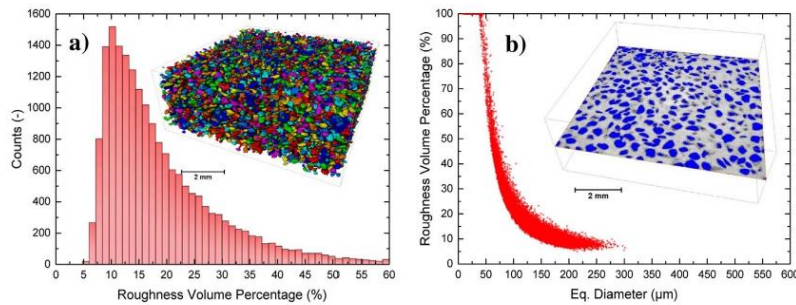


Fig. 2. a) Microtomography 3D reconstruction image and distribution of porous roughness of titanium substrates for 100–200 μm NH_4HCO_3 particle size. Different colors show the segmented and separated pores. The Ti matrix is transparent. b) Distribution of roughness volume percentage in function of the porosity size, quantified as equivalent porosity diameter. An individual porous Ti disc substrate obtained by tomography is shown in the inset. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

previous works of the authors [19]. The powders were mixed by using a Turbula® T2C for 40 mins to achieve a good homogenization. The blend was pressed to 800 MPa using an Instron 5505 universal testing machine. The space holder was then removed in a furnace in two steps of 12 h each (at 60 °C and 110 °C, both under low vacuum conditions of 10^{-2} mbar). Finally, the green compacts were sintered in a Carbolite® STF 15/75/450 ceramic furnace, with a horizontal tube at 1250 °C for 2 h using high vacuum (10^{-5} mbar). The protocol used for the HA coating is a variant of one procedure shown in the literature [20–23]. The precursor was triethyl phosphite, hydrolyzed during 24 h with distilled water under vigorous stirring. The required stoichiometric amount of calcium nitrate (Aldrich) solution was then added to the hydrolyzed solution. The mixture was additionally stirred and allowed to rest for 24 h. The metallic substrate was then coated by dip-coating

and drying at 80 °C overnight. The coating adherence was improved by submitting the substrates to a thermal treatment at 450 °C for 5 h under vacuum conditions.

The interconnected (P_i) and total porosity (P_T) of porous titanium substrate were obtained by Archimedes' method (ASTM C373-14). Image analysis (IA) was employed to determine the equivalent diameter of the pores, using a Nikon Epiphot optical microscope coupled with a Jenoptik Progres C3 camera and Image-Pro Plus 6.2 analysis software [24].

Also, X-ray computed tomography (M-CT) was used to compare the porosity values and the equivalent porous diameter obtained by Archimedes' and Image Analysis, respectively. For this purpose, a micro focus X-ray source 18121-01, operating at 100 kV, 100 mA, 5 mm of spot size and a flat panel detector C7943 (120 mm \times 120 mm, 2400

Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 333 (2018) 158–162

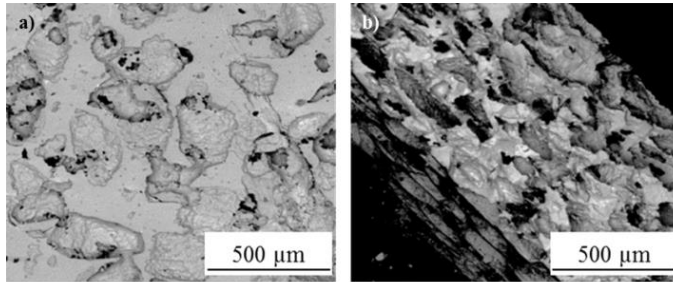


Fig. 3. SEM micrographs of the obtained coating. Surface (a) and cross-sectional (b) views for 100–200 μm NH_4HCO_3 particle size used.

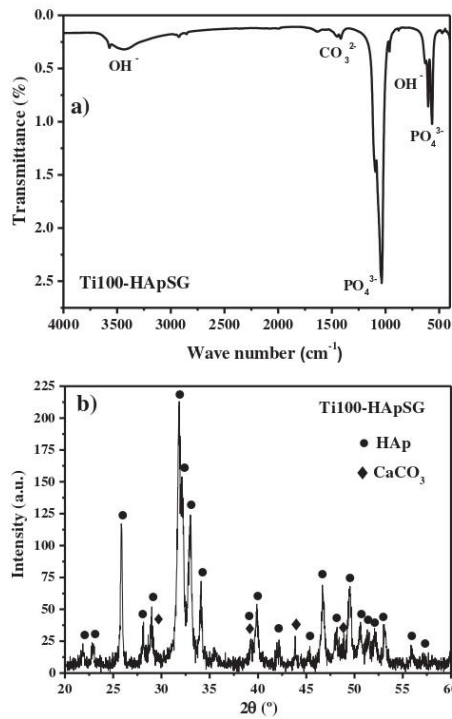


Fig. 4. a) FTIR spectrum and b) XRD pattern of HA coating on porous titanium substrates for 100–200 μm NH_4HCO_3 particle size.

2240 × 2400 2368 pixel), both from Hamamatsu Photonics K.K. (Japan), were employed. Through this methodology, a qualitative and quantitative study was carried out of the interior structure of the porous Ti sample used as substrate before HA deposition. A maximum spatial resolution of 6.4 μm per pixel was reached at 7.8 × magnification. Concretely, a porous Ti disc substrate was studied and a 3D image for this specimen was obtained by the acquisitions of a high number of X-ray projections during 360° sample rotation in 1000 steps. The reconstructed complete volume of the porous Ti disc was subjected to image analysis, including a series of filtering, separation and segmentation steps. After reconstruction, the commercial software VGStudioMax 1.2.1 (Volume Graphics, Heidelberg, Germany) was used

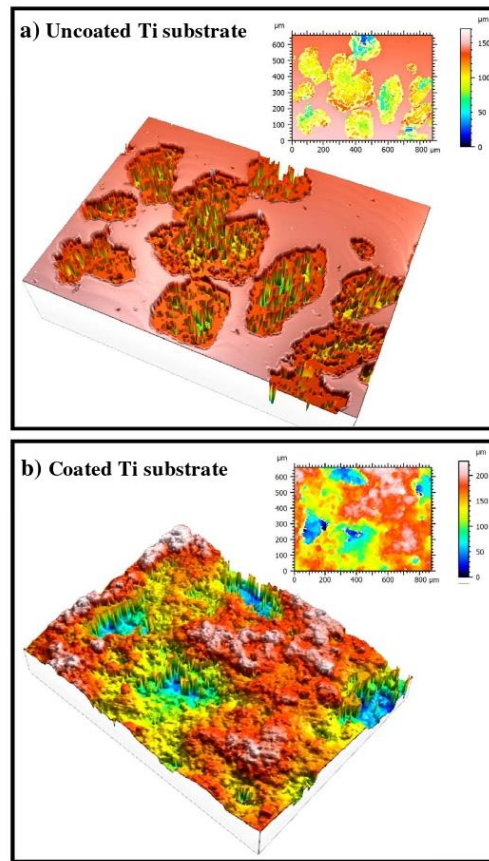


Fig. 5. Confocal images for uncoated (a) and coated (b) titanium substrates.

to extract 2D and 3D sections of the foam. Also, the software MAVI 1.3.1 (Fraunhofer ITWM, Kaiserslautern, Germany) was used for volume image analysis of the tomographic data sets [25].

The mechanical behavior was measured by ultrasound technique (dynamic Young's modulus employing a KRAUTKRAMER USM 35 equipment) [26,27] and uniaxial compression testing (stiffness and

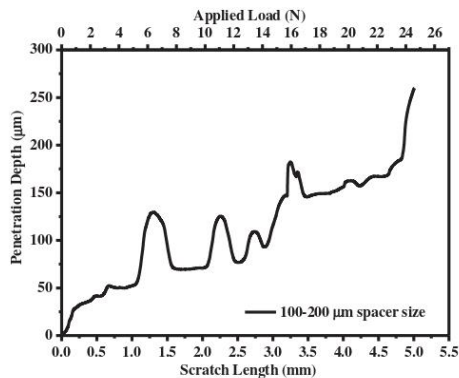


Fig. 6. Scratch test with increasing load in HA coating on porous titanium substrates for 100–200 µm NH_4HCO_3 particle size.

yield strength, performed by Instron 5505 universal testing machine [28,29]. Confocal microscopy (MC, Sensofar S Neox) and scanning electron microscopy (SEM, Tescan Vega TS 5130SB) were employed to analyze the topography roughness of the coating surface [30], and associated energy dispersive spectroscopy (EDS-Oxford Inca) was used to determine the elemental composition of the HA coating. Furthermore, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ABB Bomem Inc., MB series) with a reflectance stage, recorded in the range of 400–4000 cm^{-1} , and X-ray diffraction (XRD - D8, Focus, Bruker), performed with $\text{CuK}\alpha$ radiation (30 kV, 50 mA) were employed to characterize the HA coating. Finally, the scratch test was performed by a MICROTTEST commercial device (MTR3/50-50/NI, Rockwell diamond tip with a diameter of 200 µm, applied load from 0 to 25 N, speed 0.5 mm/min and 5 mm of groove, according to ASTM C1624-05).

3. Results and discussion

The interconnected porosity value obtained (43%) was close to that of the total porosity (45%). The equivalent diameter by IA (161 µm) is in the size range of the chosen spacer particles (100–200 µm), as expected (Fig. 1a). Total pore fraction, mean size and the high degree of interconnectivity ensure the bone ingrowth and the infiltration of HA [31].

The dynamic Young's modulus ($E_d = 20.8$ GPa) and compression test behavior ($E_c = 26.0$ GPa and $\sigma_y = 127$ MPa) of porous titanium substrate ensure a reduction of the mismatch between the properties of cortical bone (20–25 GPa and 150–180 MPa) and the implant. The micro-hardness values after Vickers micro indentation of $\text{HV}_{0.3}$ and HV_1 were 401 and 167 respectively. In addition, the roughness within the pores (Fig. 1) improves the osseointegration, as cellular adhesion was demonstrated in previous works of the authors [19,32].

A total volumetric porosity value of 49.8%, and an equivalent porous diameter (D_{eq}) of 173 µm, were obtained by X-ray computed tomography (M-CT). Both characteristic parameters are in the range of the expected nominal values (50% volume fraction and D_{eq} of spacer particle size between 100 and 200 µm). Thus, the spacer-holder technique was successfully employed to maintain the designed porosity parameters. These values were very close to those obtained by Archimedes' (45% of total volumetric porosity and 161 µm of D_{eq}). Therefore, both techniques are valid to adequately determine both microstructural parameters.

Fig. 2a shows the distribution of roughness volume percentage (relative roughness, forward), determined as described by Yin et al. [33,34], based on the relation of the pore volume to the eroded,

smoothed volume of the same pore analyzed quantitatively from the tomographies in the reconstructed 3D image of the studied porous Ti disc substrate. Common values for the roughness volume percentage between 10 and 15% can be observed. However, the dispersion detected in this Fig. 2a is much higher, finding particles with roughness volume percentage from 5% to more than 60%. This could be due to high porosity dispersion. The higher values could even be attributable to micropores, inherent to the sintering process.

In turn, Fig. 2b shows the corresponding roughness volume percentage with the equivalent diameter pore size. The relative volume roughness increases with decreasing equivalent diameter. Obviously, the smaller pores show a much larger surface roughness and, consequently, higher relative roughness. However, the exponential behavior suggests another effect, based on the more reactive sintering of samples with smaller pores, and thus, higher relative roughness.

Finally, it is important to note that the higher pore equivalent diameter, the larger is the scattering of the roughness volume percentage. This fact again suggests the more reactive sintering of smaller pores, giving a higher but narrow relative roughness.

Fig. 3 shows the morphology of the HA coating by SEM. The formation of polycrystalline aggregates of hydroxyapatite nanoparticles (HA nanocrystallites) was observed [35]. The coating presents homogeneous morphology, with no presence of cracks and/or discontinuities. Apparently, the surface area shows potential nucleation sites for the precipitation of apatite in the presence of biologic fluids, due to its morphology, roughness and the existence of pores. This implies a greater bonding adherence between the bone and the implant [36].

By other hand, it was detected and quantified by EDX the three majority elements expected in HA, i.e., Ca (43 ± 3), P (11 ± 2) and O (46 ± 3), determined all of them in weight %. In addition, the absence of peaks in the EDXs corresponding to waste elements or to metallic substrates confirms the coating homogeneity and continuity.

By other hand, regarding the FTIR spectra (Fig. 4a), the reflections of $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ and $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ show the polyhedrons of PO_4^{3-} reordering in the crystal structure, as a result of the HA transformation from an amorphous to a crystalline phase. Also, the XRD pattern is shown in Fig. 4b. A high crystallinity is achieved after heat treatment at 450 °C, being lower in the results reported in the literature at lower temperatures [7]. The peaks found are characteristic of the HA phase (according to the map library PCPDFWIN v. 2.4 # 09-0432 o JCPDS 9-432); calcium phosphate peaks are not detected. Again, it is observable that the HA coating changes from an amorphous to a crystalline state [37]. In addition, good HA infiltration into the pores and adhesion of the coating is very important in achieving the osseointegration.

Fig. 5 shows the surface topography by laser confocal microscopy. The roughness increases once the substrate is coated as a result of heterogeneity coating (thickness variation of HA layer, presence of a micro porous coating and small amounts of debris associated with chipping in some areas).

The penetration resistance during scratching of HA-coated titanium substrates is shown in Fig. 6. This behavior depends on applied load and coating-substrate system (coating adhesion grade, micro-hardness and micro-porosity of the coating, as well as the pore size and stiffness of the substrate).

4. Conclusions

The feasibility of the fabrication of porous titanium substrates by the space-holder technique was validated. The sol-gel route in HA formation was verified, it being possible to obtain HA porous thin films on porous titanium substrates employing a new heat treatment at 450 °C. The crystalline structure of HA was confirmed by XRD and FTIR. A good attachment between the HA coatings and Ti substrates was observed, thanks to mechanical interlocking and possible chemical bonding. The HA coatings imply the prevention of the release of metal ions (more resistance to corrosion) and the metal surface being made bioactive.

Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 333 (2018) 158–162

The proposed coating-porous substrate system allows a biofunctional (formation and growth of bone tissue over the surface and within the pores) and biomechanical (porous substrate properties: $E_d = 21$ GPa and $\sigma_y = 127$ MPa, close to those of cortical bone) balance.

Acknowledgments

This work was supported by the Junta de Andalucía-FEDER (Spain) through the Project Ref. P12-TEP-1401 and by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the Grant No. MAT2015-71284-P. The authors would also like to thank the Technician, J. Pinto, for assistance in the scratch tests.

References

- [1] L. Kunčičká, R. Kocich, T.C. Lowe, Advances in metals and alloys for joint replacement, *Prog. Mater. Sci.* 88 (2017) 232–280.
- [2] E.J. Tobin, Recent coating developments for combination devices in orthopedic and dental applications: a literature review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 112 (2017) 88–100.
- [3] Y. Li, C. Yang, H. Zhao, S. Qu, X. Li, Y. Li, New developments of Ti-based alloys for biomedical applications, *Materials* 7 (2014) 1709.
- [4] L.T. Kuhn, Chapter 5 - biomaterials A2 - Enderle, John D, in: J.D. Bronzino (Ed.), *Introduction to Biomedical Engineering*, Third Edition, Academic Press, Boston, 2012, pp. 219–271.
- [5] X.P. Tan, Y.J. Tan, C.S.L. Chow, S.B. Tor, W.Y. Yeong, Metallic powder-bed based 3D printing of cellular scaffolds for orthopaedic implants: a state-of-the-art review on manufacturing, topological design, mechanical properties and biocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C* 76 (2017) 1328–1343.
- [6] S.H. Chen, S.C. Ho, C.H. Chang, C.C. Chen, W.C. Say, Influence of roughness on in-vivo properties of titanium implant surface and their electrochemical behavior, *Surf. Coat. Technol.* 302 (2016) 215–226.
- [7] M. Khodaei, A. Valanzhad, I. Watanabe, R. Yousefi, Surface and mechanical properties of modified porous titanium scaffold, *Surf. Coat. Technol.* 315 (2017) 61–66.
- [8] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphate coatings, films and layers, *Prog. Biomater.* 1 (2012) 1.
- [9] C.J. Li, W.Y. Li, Deposition characteristics of titanium coating in cold spraying, *Surf. Coat. Technol.* 167 (2003) 278–283.
- [10] X. Nie, A. Leyland, A. Matthews, Deposition of layered bioceramic hydroxyapatite/TiO₂ coatings on titanium alloys using a hybrid technique of micro-arc oxidation and electrophoresis, *Surf. Coat. Technol.* 125 (2000) 407–414.
- [11] V.F. Pichugin, R.A. Surmenev, E.V. Shesterikov, M.A. Ryabtseva, E.V. Eshenko, S.I. Tverdokhlebov, O. Prymak, M. Epple, The preparation of calcium phosphate coatings on titanium and nickel-titanium by rf-magnetron-sputtered deposition: composition, structure and micromechanical properties, *Surf. Coat. Technol.* 202 (2008) 3913–3920.
- [12] A.A. Abdeltawab, M.A. Shoeib, S.G. Mohamed, Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on titanium from dimethylformamide suspensions, *Surf. Coat. Technol.* 206 (2011) 43–50.
- [13] G.D. Byrne, L. O'Neill, B. Twomey, D.P. Dowling, Comparison between shot peening and abrasive blasting processes as deposition methods for hydroxyapatite coatings onto a titanium alloy, *Surf. Coat. Technol.* 216 (2013) 224–231.
- [14] W. Xu, W. Hu, M. Li, C.E. Wen, Sol-gel derived hydroxyapatite/titania bio-coatings on titanium substrate, *Mater. Lett.* 60 (2006) 1575–1578.
- [15] A.A.E. Hadad, V. Barranco, A. Jiménez-Morales, E. Peón, J.C. Galván, Multifunctional sol-gel derived thin film based on nanocrystalline hydroxyapatite powders, *J. Phys. Conf. Ser.* 252 (2010) 012007.
- [16] P. Usinskas, Z. Stankeviciute, A. Beganskiene, A. Kareiva, Sol-gel derived porous and hydrophilic calcium hydroxyapatite coating on modified titanium substrate, *Surf. Coat. Technol.* 307 (2016) 935–940.
- [17] Y. Torres, J.J. Pavon, J.A. Rodriguez, Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder, *J. Mater. Process. Technol.* 212 (2012) 1061–1069.
- [18] W.J. Niu, C.G. Bai, G.B. Qiu, Q. Wang, Processing and properties of porous titanium using space holder technique, *Mater. Sci. Eng. A-Struct. Mater. Prop. Microstruct. Process.* 506 (2009) 148–151.
- [19] Y. Torres, J.A. Rodriguez, S. Arias, M. Echeverry, S. Robledo, V. Amigo, J.J. Pavon, Processing, characterization and biological testing of porous titanium obtained by space-holder technique, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 6565–6576.
- [20] D.-M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, W.J. Tseng, Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite, *Biomaterials* 23 (2002) 1679–1687.
- [21] A. El-Hadad, E. Peón, F.R. García-Galván, V. Barranco, J. Parra, A. Jiménez-Morales, J.C. Galván, Biocompatibility and corrosion protection behaviour of hydroxyapatite sol-gel derived coatings on Ti6Al4V alloy, *Materials* 10 (2) (2017) 94, <http://dx.doi.org/10.3390/ma10020094> (OPEN ACCESS).
- [22] E. Peón, A. El-Hadad, F.R. García-Galván, A. Jiménez-Morales, J.C. Galván, Controlled Rate Thermal Analysis (CRTA) as new method to control the specific surface of hydroxyapatite thin coatings, in: Nikolay N. Nikitenkov (Ed.), *Modern Technologies for Creating the Thin-film Systems and Coatings*, InTech Open Access Publisher, Año de Publicación, 2017 Book edited by: Pág. inicial: 193 Pág. final: 212, ISBN 978-953-51-3004-8, Print ISBN 978-953-51-3003-1 <https://doi.org/10.5772/66468> (OPEN ACCESS).
- [23] A.A. El Hadad, V. Barranco, A. Jiménez-Morales, E. Peón, G.J. Hickman, C.C. Perry, J.C. Galván, Enhancing in vitro biocompatibility and corrosion protection of organic-inorganic hybrid sol-gel films with nanocrystalline hydroxyapatite, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 3886–3896, <http://dx.doi.org/10.1039/C4TB00173G> (OPEN ACCESS).
- [24] Y. Torres, J.J. Pavon, I. Nieto, J.A. Rodriguez, Conventional powder metallurgy process and characterization of porous titanium for biomedical applications, *Metall. Mater. Trans. B Process Metall. Mater. Process. Sci.* 42 (4) (2011) 891–900.
- [25] J. Banhart, *Advanced Tomographic Methods in Materials Research and Engineering*, First ed, Oxford University Press, New York, 2008.
- [26] ASM-International, *Nondestructive Evaluation and Quality Control*, 9th Ed., (1989).
- [27] J. Müller-Rochholz, Determination of the elastic properties of lightweight aggregate by ultrasonic pulse velocity measurement, *Int. J. Cem. Compos. Light. Concr.* 1 (2) (1979) 87–90.
- [28] ISO 13314, *Mechanical Testing of Metals Ductility Testing Compression Test for Porous and Cellular Metals*, (2011).
- [29] W.E. Luecke, L. Ma, S.M. Graham, M.A. Adler, Repeatability and reproducibility of compression strength measurements conducted according to ASTM E9, NIST Technical Note, 1679 2009.
- [30] K. Mader, R. Mokso, C. Raufaste, B. Dollet, S. Santucci, J. Lambert, M. Stampanton, Quantitative 3D characterization of cellular materials: segmentation and morphology of foam, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 415 (2012) 230–238.
- [31] Y. Torres, C. Romero, Q. Chen, G. Pérez, J.A. Rodríguez-Ortiz, J. Pavón, L. Álvarez, C. Arévalo, A. Bocaccini, Electrophoretic deposition of PEEK/45SS bioactive glass coating on porous titanium substrate: influence of processing conditions and porosity parameters, *Key Eng. Mater.* 704 (2016) 343–350.
- [32] S. Muñoz, J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A. Civantos, J.P. Allain, Y. Torres, On the influence of space holder in the development of porous titanium implants: mechanical, computational and biological evaluation, *Mater. Charact.* 108 (2015) 68–78.
- [33] X.-Z. Yin, T.-Q. Xiao, A. Nangia, S. Yang, X.-L. Lu, H.-Y. Li, Q. Shao, Y. He, P. York, J.-W. Zhang, In situ 3D topographic and shape analysis by synchrotron radiation X-ray microtomography for crystal form identification in polymorphic mixtures, *Sci Rep* 6 (2016) 24763.
- [34] E. Maire, P.J. Withers, Quantitative X-ray tomography, *Int. Mater. Rev.* 59 (1) (2014).
- [35] J. Tao, H. Pan, Y. Zeng, X. Xu, R. Tang, Roles of amorphous calcium phosphate and biological additives in the assembly of hydroxyapatite nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 13410–13418.
- [36] E.P. Avés, G.F. Estévez, M.S. Sader, J.C.G. Sierra, J.C.L. Yurell, I.N. Bastos, G.D.A. Soares, Hydroxyapatite coating by sol-gel on Ti-6Al-4V alloy as drug carrier, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 543–547.
- [37] M.H. Fathi, A. Hanifi, Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method, *Mater. Lett.* 61 (2007) 3978–3983.



Improvement of the balance between a reduced stress shielding and bone ingrowth by bioactive coatings onto porous titanium substrates



Cristina Domínguez-Trujillo^a, Fátima Temero^a, José Antonio Rodríguez-Ortiz^a, Juan José Pavón^b, Isabel Montealegre-Meléndez^a, Cristina Arévalo^a, Francisco García-Moreno^c, Yadir Torres^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte, Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

^b Group of Advanced Biomaterials and Regenerative Medicine, Universidad de Antioquia, Bioengineering Program, Medellín, Colombia

^c Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Porous titanium
Stress shielding
Bioglass® coating
Hydroxyapatite
In vitro bioactivity

ABSTRACT

Commercial pure titanium is known as good substitute for cortical bone tissue. Nevertheless, stress-shielding and the lack of osseointegration are still some limitations to solve. In this study, porous titanium substrates were manufactured by space-holder technique (50 vol% of NH_4HCO_3 with particle size between 250 and 355 μm). The obtained stiffness and yield strength of specimens were compatible with cortical bone tissue. The substrates were coated with three layers of Bioglass® 45S5 (BG) by dripping sedimentation, a new and economic technique. The porosity and surface characterization were performed by Archimedes' method, image analysis, X-ray micro computed tomography and confocal laser microscopy, while the mechanical behavior was analyzed by ultrasound technique, uniaxial compression and micro-mechanical testing. Homogeneity, infiltration efficiency and coating integrity were evaluated. The adhesion of the coating was better on porous titanium substrates than on full dense ones. Finally, the bioactivity of the BG coating was determined via immersion in Simulated Body Fluid. The formation and growth of hydroxyapatite on the substrate were studied by scanning electron microscopy and X-ray diffraction analysis. The results showed hydroxyapatite formation in both coated full dense and porous samples. These features indicate the improvement of osseointegration for this sort of load bearing Ti implants.

1. Introduction

Tissue degradation is considered one of the most important public health problems. Bone replacement via implants is a common solution to improve the life quality of patients. Its good functionality depends on intrinsic properties of the employed materials, quality and quantity of host tissue and the biointerface between implant and bone (surface energy, biochemistry and topography) [1]. Also, the related mechanical stimulation, the effects of some drugs and the systemic immunological influence are other important physical factors in implant behavior. Although titanium and Ti6Al4V alloy are frequently employed in bone replacement [2], they still present two problems to be solved: stress-shielding and poor osseointegration [3]. The fabrication of porous materials can reduce the difference of the Young's modulus between implant and bone [4]; and the osseointegration can be improved using bioactive coatings [5,6]. Bioactive glasses present adequate osteoconductivity and promote bone regeneration, controlling their biodegradability and forming bone mineral-like phases (hydroxyapatite, HA

[7]. Sol-gel, electrophoretic deposition, enameling, laser cladding, thermal spraying or thin film technologies are the most common techniques used to prepare bioactive glass coatings [2]. Nevertheless, their employment implies a high cost and an accurate control of several process parameters, as well as a detailed study of the coating bioactivity.

The micromechanical characterization, as well as biocompatibility of porous coatings on full dense titanium substrates have been studied by the scientific community [8,9]. However, no studies of porous titanium substrates have been reported. In these terms, the micro-computational tomography (micro-CT) is a useful tool for the microstructural substrates characterization [10]. It is a non-destructive method and allows obtaining very reliable quantitative and qualitative information [7–9]. This technique was proposed to study the trabecular bone architecture [11,12] and in bone tissue engineering applications [7,9]. In addition, it is widely used in bone growth through the porous implant [4,13]. The main objective of this work is to manufacture BG-coated porous titanium substrates, which guarantee a better biomechanical

* Corresponding author at: Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Camino de los descubrimientos s/n, 41092 Sevilla, Spain.
E-mail address: ytorres@us.es (Y. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.01.019>

Received 3 October 2017; Received in revised form 5 December 2017; Accepted 8 January 2018

Available online 11 January 2018

0257-8972/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

and biofunctional balance.

2. Materials and experimental procedure

Commercial pure (c.p.) porous titanium substrates were fabricated by the space-holder technique. Titanium grade IV powder was mixed with ammonium bicarbonate particles (NH_4HCO_3 , 50 vol% and particle size of 250–355 μm) in a turbula for 40 min. The blend was pressed at 800 MPa using an Instron 5505 universal testing machine. The space holder was removed in a furnace in 2 steps: 12 h (60 °C) and 12 h (110 °C). Both stages were performed in low vacuum conditions ($\sim 10^{-2}$ mbar). Then, the compacts were sintered in a Carbolite® STF furnace (1250 °C, 2 h at $\sim 10^{-5}$ mbar) and the substrates (full dense and porous Titanium) were coated with tri-layers of Bioglass® 45S5 (SCHOTT Vitryxx®) by using a new and economic deposition technique (sedimentation by dripping). The BG suspension was 10 mg/ml in ethanol [11]. Once the suspension was well stirred, 1 ml was distributed drop by drop onto the substrates, to be deposited in a homogeneous way. Finally, the samples were dried to evaporate the ethanol (one day per coating layer) before the final thermal treatment (TT), performed in a molybdenum furnace (820 °C, during 5 s at $\sim 10^{-5}$ mbar).

The microstructural characterization (total and interconnected porosity, P_T and P_i , respectively) of substrates was performed by Archimedes' method [14], measuring five values of Archimedes' density in titanium substrates. Optical microscope (from Nikon Epiphot, Japan) coupled with a Jenoptik Progres C3 camera and analysis software Image-Pro Plus 6.2 was employed [15]. The tomography study was carried out by a custom-made X-ray scanner composed by micro focus X-ray source L8121-01 (with a W-target) operated at 100 kV and 100 μA , 5 μm , and a flat panel detector C7943 (120 mm \times 120 mm, 2240 \times 2368 pixel) (both equipment from Hamamatsu, Japan). 3D volume of the specimen can be obtained acquiring a certain number of X-ray projections during sample rotation over 360°. Then, software reconstruction of these projections was used. This method allows the qualitative and quantitative evaluation of the inner structure of the porous Ti specimens. It has a spatial resolution down to 6.4 μm pixel size at a 7.8-fold magnification, in terms of pore size distributions, porosity, pore surface roughness, etc. [16].

The mechanical behavior was evaluated via: uniaxial compression test (stiffness and yield strength, E_c and σ_y , respectively) according to ASTM E9-09 using an Instron 5505 universal testing machine [17,18]; ultrasound technique (dynamic Young's modulus, E_d), performed with a KRAUTKRAMER USM 35 equipment [19,20]; and Vickers micro-indentation (HV0.3 and HV1), ten measures per load and substrate.

Furthermore, surface roughness, structural integrity, homogeneity, infiltration grade and bioactivity of the coatings were studied. For that purpose, confocal laser microscopy, scanning electron microscopy (SEM) [21] and instrumented micro-indentation (P-h curves at 1 N load; Oliver and Pharr analysis) were used [22–24]. Two P-h curves were obtained for each BG-titanium system. Finally, the coated substrates were immersed in 50 ml of Simulated Body Fluid (SBF) at 37 °C in an incubator for 21 days, refreshing the solution every 14 days. The samples were rinsed (distilled water and absolute ethanol) and dried at 45 °C during 10 min. The bioactivity (formation and growth of HA) of the coated titanium substrates was analyzed by X-ray diffraction (XRD - Cu $K\alpha$ radiation to evaluate the crystalline phases formed), SEM (morphological features [9]) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX - chemical composition). Five measures of Ca/P relation were carried out.

3. Results and discussion

The microstructural parameters and the micro-mechanical behavior of dense and porous titanium substrates are shown in Table 1. Two different porosities are evaluated: the micro-porosity inherent to the sintering process (dense titanium) and the macro-porosity associated to

the space holder. In terms of total porosity, the values obtained by all the analysis are lower than expected. The reasons could be: a) a small spacer amount could remain into the substrates, and/or b) a contraction of pores during the sintering process. The equivalent diameter (Deq) of pores obtained via Image Analysis (IA) and micro-CT, agrees with the range of the particle sizes of NH_4HCO_3 . Comparing values, micro-CT total porosity and equivalent diameter are slightly smaller than the values measured by IA and Archimedes' method. The mechanical behavior in porous substrates depends on the obtained macro-porosity (greater size and pore fraction). Manufactured porous titanium substrates reduce the mismatch between the properties of cortical bone ($E = 20\text{--}25$ GPa and $\sigma_y = 150\text{--}180$ MPa) and the implant (see in Table 1). The results of the micro-hardness depend on the applied indentation load. Otherwise, micro-hardness values for full dense substrate show higher values for HV0.3 (377 ± 39) than for HV1 (342 ± 16). This fact could be related to localized plasticity phenomena and the indentation size effects. The micro-hardness of porous substrate decreases due to the influence of the pores compared to full dense specimens. However, in both substrates (dense and porous) the values are similar for HV0.3, due to matrix remaining between the pores is "sufficiently large" to have a similar behavior to full dense substrate.

Fig. 1 shows the pores size and morphology by different analysis techniques. Fig. 1a) presents the different types of porosities explained above. The image of the micro-CT, Fig. 1b), reveals the homogeneity of the pores distribution and different colours show the segmented and separated pores, being the Ti matrix transparent [25]. Moreover, the SEM images display, Fig. 1c) and d), exhibit the roughness inside the pores. This topography enhances the osseointegration, promoting the cells adhesion according to previous works of the authors [4,13]. The distribution of equivalent pore diameters and the corresponding Gauss fit is observed in Fig. 2a) [26]. The mean equivalent pore diameter is 240 μm , which is in agreement with the range of the spacer particle size (250–355 μm). The Full Width at Half Maximum (FWHM) is 97.7 μm . A narrow distribution is observed. Fig. 2b) depicts the distribution of the roughness volume percentage based on the relation of the pore volume to the eroded, smoothed volume of the same pore analyzed quantitatively from the tomographies as reported by Yin et al. [25]. It is observed that the relative roughness of the specimens decreases with increasing equivalent radius.

Fig. 3 presents the macroscopic aspect of the substrates surfaces, before and after thermal treatment of the coating. The adhesion of the BG is clearly better for porous titanium than for dense substrate, since the anchoring effect is more effective due to interconnected pores and roughness in their walls [13]. The presence of chipping (poor adhesion) in some areas of dense substrate explains the increase of its surface roughness comparing to porous one. The presence of BG in the pores could promote the growth of HA inside them.

Fig. 4 shows the 3D topography of un-coated and coated substrates. The images confirm the integrity of the coating and the infiltration of the BG into the pores (Fig. 4d), as well as the morphology (porous) and the roughness on the coating.

The P-h curves are presented in Fig. 5 [22–24], comparing the different coating-substrate systems with the pressed BG pellet. Coated porous titanium substrate presents a greater penetration depth (40 μm) than coated dense titanium substrate (37 μm) and sintered BG sample (12 μm). The presence of microporosity in the coating with BG, as well as the effect of the interface and the porosity of the substrate, could explain the lower rigidity and the hardness of the coating/substrate system. Regarding coated dense titanium substrate curve, a small fall or saw tooth is observed, that can be attributed to a lower adhesion of the coating to the substrate. In addition, a pseudo-creep behavior is observed. The presence of micro pores in the BG may be the cause. XRD patterns confirmed that 45S5 Bioglass® powder is amorphous (state of supply), but once the powders were heat treated at 820 °C (for 5 s), $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ crystalline phase appeared (see Fig. 6). Both angular

Bioactive coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 338 (2018) 32–37

Table 1
Microstructural and mechanical characterization of titanium substrates.

Substrate	Archimedes' method		Image analysis		Micro-CT		Ultrasound test	Uniaxial compression		Micro-hardness	
	P _T (%)	P _I (%)	P _T (%)	D _{eq} (μm)	P _T (%)	D _{eq} (μm)	E _d (GPa)	E _c (GPa)	Yield Strength (MPa)	HV0.3	HV1
Dense	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2	5.5 ± 0.2	–	–	101.2 ± 0.3	95 ± 1	628 ± 5	377 ± 39	342 ± 16
Porous	45.9 ± 0.2	41.0 ± 0.1	48.7 ± 1.9	261.5 ± 9.0	40.8 ± 11.4	240.3 ± 6.4	22.8 ± 0.2	23.1 ± 1.0	118 ± 14	356 ± 25	152 ± 28

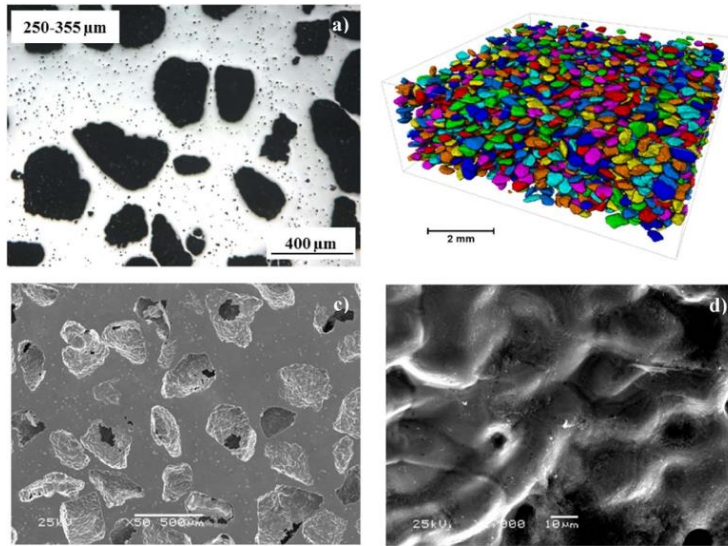


Fig. 1. Porous substrate microstructural images: a) OM of the porous substrate, b) micro-CT, c) SEM image of the specimen's surface and d) high resolution SEM image inside the pore.

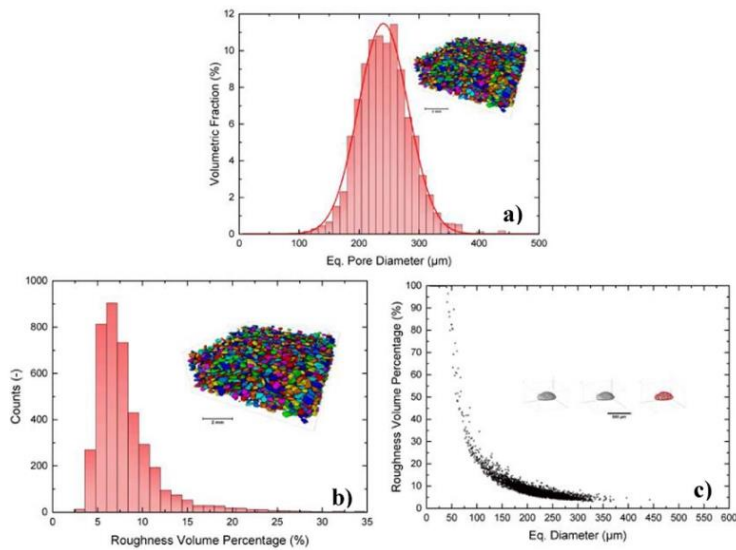


Fig. 2. Morphology of the porous: a) volumetric fraction (%) vs equivalent pore diameter (μm), b) roughness volume percentage (%), c) roughness volume percentage (%) vs equivalent pore diameter (μm).

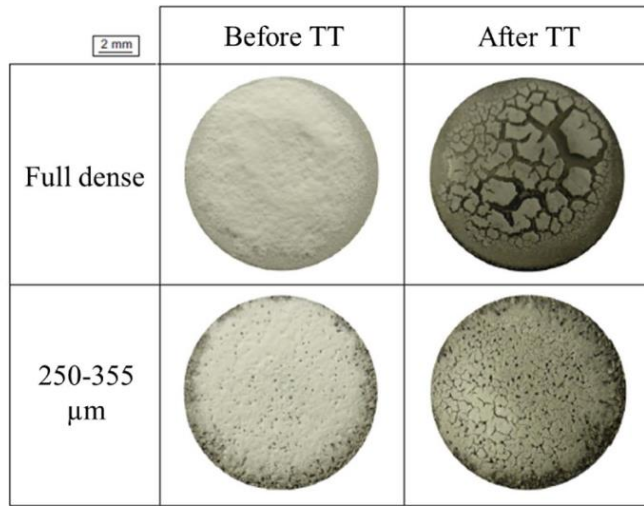


Fig. 3. 3D macrographs of the substrates surfaces: a) full dense before TT, b) porous titanium before TT, c) full dense after TT and d) porous titanium after TT.

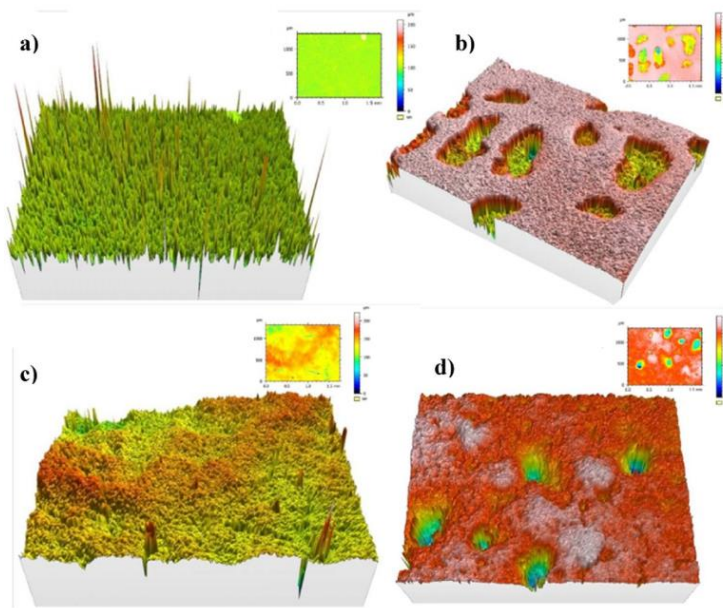


Fig. 4. 3D topography of the substrates surfaces: a) full dense before coating, b) porous titanium before coating, c) full dense after coating and d) porous titanium after coating.

location and peak intensities match the standard PDF 22.1455. Previous studies on sintered bioactive glasses have confirmed the apparition of the same crystalline phase [27, 28]. Clupper and Hench [29] studied the crystallinity effect in the apatite formation for bioactive glasses surfaces and they revealed that the kinetic for apatite formation decreased slightly with crystal phase of $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, but there was apatite formation in any case [30]. In vitro bioactivity was investigated by BG-coated titanium substrates by immersion in SBF for 21 days. SEM

micrographs and XRD results are shown in Fig. 6. After the SBF test, $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ phase disappeared, forming HA particles on both coating-substrate systems. The morphological characteristics, diffraction pattern peaks and Ca/P atomic ratio obtained, confirmed the HA formation, similar to Ca/P atomic ratio of HA in bone (1.66). Three measurements of Ca/P ratio were carried out (relative error were between 1 and 3%).

Bioactive coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 338 (2018) 32–37

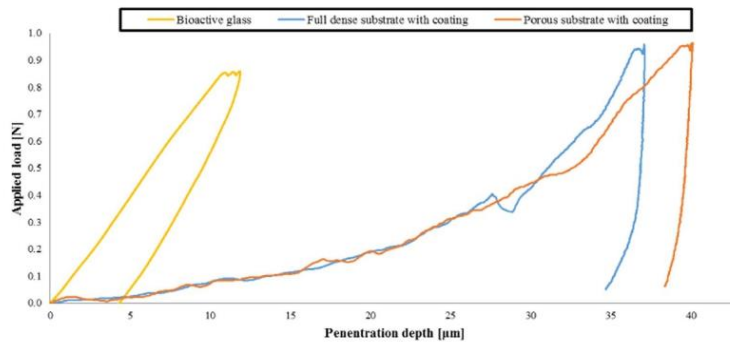


Fig. 5. P-h curves for a dense BG pellet and BG-coated titanium substrates.

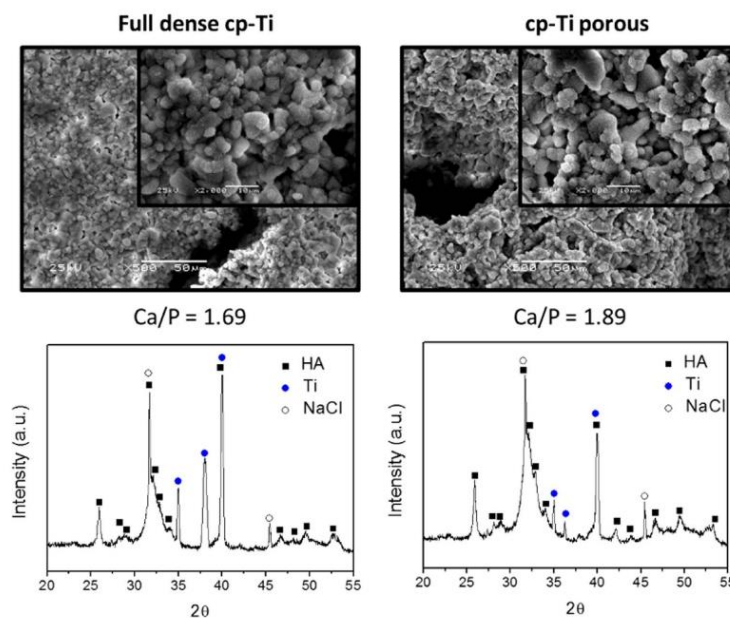


Fig. 6. BG-coated titanium substrates: SEM and XRD analyses after 21 days in SBF.

4. Conclusions

Porous c.p. Ti substrates obtained by space holder technique solves the stress shielding and ensure the mechanical requirements of cortical bone tissue. The micro-CT is an appropriate technique for evaluating the content, size and roughness of the pores. The size of the pores allows the BG infiltration and the roughness in pores walls enhances the possible osteoblast attachment. Otherwise, a new bioactive glass deposition technique has been implemented to improve the osseointegration on titanium substrates. After in vitro studies, HA formation is confirmed despite the BG coating crystallization. In summary, the coated titanium samples show a biomechanical (stiffness and yield strength) and biofunctional (ingrowth and osseointegration) equilibrium, as well as a potential use in biomedical applications (partial substitution of bone tissue).

Acknowledgments

This work was supported by the Junta de Andalucía-FEDER (Spain) through the Project Ref. P12-TEP-1401 and by the Ministry of Economy and Competitiveness of the State General Administration of Spain under the grant MAT2015-71284-P. The authors would like to thank Aldo Boccaccini and Svenja Heise for their collaboration in the review and discussion of the article, as well as to the technician J. Pinto for assistance in the micromechanical tests and Dr. Paul H. Kamm for analysis support in Figs. 1 and 2.

References

- [1] J.P. Allain, M. Echeverry, J.J. Pavón, S. Arias, K. Iniewski, S. Selimovic, Nanostructured biointerfaces, chapter 2, in: CRC Press, Taylor and Francis Group (Eds.), Nanopatterning and Nanoscale Devices for Biological Applications, 2014 (ISBN 9781466586314, Cat# K2028).

- [2] L. Kunčický, R. Kocich, T.C. Lowe, *Prog. Mater. Sci.* **88** (2017) 232–280.
- [3] J.D. Enderle, J.D. Bronzino (Eds.), *Introduction to Biomedical Engineering*, 3rd ed., Elsevier Ltd, Academic Press, Amsterdam, Boston, 2012.
- [4] Y. Torres, J.A. Rodríguez, S. Arias, M. Echeverry, S. Robledo, V. Amigo, J.J. Pavón, *J. Mater. Sci.* **47** (18) (2012) 6565–6576.
- [5] S. Borjas, E.J. Gil, L. Cordero, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A.R. Boccaccini, Y. Torres, *Key Eng. Mater.* **654** (2015) 189–194.
- [6] E.J. Tobin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **112** (2017) 88–100.
- [7] J.R. Jones, *Acta Biomater.* **23** (2015) S53–S82.
- [8] C. García, S. Ceré, A. Durán, *J. Non-Cryst. Solids* **352** (2006) 3488–3495.
- [9] A. Sola, D. Bellucci, V. Cannillo, *Biotechnol. Adv.* **34** (2016) 504–531.
- [10] B. Arifvianto, M.A. Leeftang, J. Zhou, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **68** (2017) 144–154.
- [11] S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T. Oku, K. Sugauma, A.P. Tomsia, J. Eur. Ceram. Soc. **23** (2003) 2921–2930.
- [12] Ö.H. Andersson, G. Liu, K.H. Karlsson, L. Niemi, J. Miettinen, J. Juhanaja, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1** (1990) 219–227.
- [13] S. Muñoz, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A. Civantos, J.P. Allain, Y. Torres, *Mater. Character.* **108** (2015) 68–78.
- [14] ASTM C373-14, Standard Test Method for Water Absorption Bulk Density, Apparent Porosity and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products. (2014).
- [15] Y. Torres, J.J. Pavón, I. Nieto, J.A. Rodríguez, *Metall. Mater. Trans. B Process Metall. Mater. Process. Sci.* **42** (4) (2011) 891–900.
- [16] J. Banhart, *Advanced Tomographic Methods in Materials Research and Engineering*, First ed., Oxford University Press, New York, 2008.
- [17] ISO 13314:2011, Standard for Mechanical Testing of Metals — Ductility Testing — Compression Test for Porous and Cellular Metals, (2011).
- [18] W.E. Luecke, L. Ma, S.M. Graham, M.A. Adler, *Repeatability and Reproducibility of Compression Strength Measurements Conducted According to ASTM E9, NIST Technical Note 1679*, (2009).
- [19] ASM-International, *Nondestructive Evaluation and Quality Control*, 9th ed., (1989).
- [20] J. Müller-Rochholz, *Int. J. Cem. Compos. Light. Concr.* **1** (2) (1979) 87–90.
- [21] K. Mader, R. Mokso, C. Raufaste, B. Dollet, S. Santucci, J. Lambert, M. Stamparoni, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **415** (2012) 230–238.
- [22] M. Mata, J. Alcalá, *J. Mech. Phys. Solids* **52** (2004) 145–165.
- [23] W.C. Oliver, G.M. Pharr, *J. Mater. Res.* **19** (1) (2004) 3–20.
- [24] M.R. VanLandingham, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **108** (2003) 249–265.
- [25] X.Z. Yin, T.Q. Xiao, A. Nangia, S. Yang, X.L. Lu, H.Y. Li, Q. Shao, Y. He, P. York, J.W. Zhang, *Sci. Rep.* (2016) 1–10.
- [26] E. Maire, P.J. Withers, *Quantitative X-ray tomography*, *Int. Mater. Rev.* **59** (1) (2014).
- [27] D.C. Clupper, J.J. Mecholsky Jr, G.P. LaTorre, D.C. Greenspan, *Biomaterials* **23** (2002) 2599–2606.
- [28] L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin, *Acta Mater.* **55** (2007) 3305–3513.
- [29] D.C. Clupper, L.L. Hench, *J. Non-Cryst. Solids* **318-43** (2003) 8.
- [30] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini, *Biomaterials* **27** (2006) 2414–2425.



Bioactive coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo^a, F. Ternero^a, J.A. Rodríguez-Ortiz^a, S. Heise^b, A.R. Boccaccini^b, J. Lebrato^c, Y. Torres^{a,*}



^a Department of Engineering and Materials Science and Transportation, University of Seville, Seville, Spain

^b Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg, Institute of Biomaterials, Erlangen, Germany

^c Grupo TAR, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Porous titanium
Stress-shielding
Osseointegration
Bioactive glass coating
Hydroxyapatite
In vitro bioactivity

ABSTRACT

Commercial pure titanium is a recognized and accepted material for cortical bone tissue substitution. However, stress-shielding phenomena and lack of osseointegration result in significant limitations. This work is focused on the achievement of an effective solution for both problems via fabrication of porous titanium substrates coated with bioactive glass. Substrates were obtained through the space holder technique giving values of stiffness and yield strength compatible with cortical bone tissue to reduce the stress-shielding phenomenon. Titanium substrates were coated with different number of layers of bioactive glass 45S5 by dripping sedimentation. The substrates porosity was characterized by different techniques. Ultrasound, compression and micro-mechanical testing were used for mechanical properties evaluation. After substrates coating, the infiltration ability, coating homogeneity and structural integrity (chipping and cracking) were evaluated for each coating layer. The chemical composition of coating and phases were studied before and after in vitro tests in Simulated Body Fluid. The results showed more homogenous coating, adherence and greater hydroxyapatite growth for the tri-layer system in both dense and porous samples. Besides, the relation of Ca/P was closed to that of stoichiometric hydroxyapatite in the human body. The coated porous titanium could be potentially used in load bearing partial implants with improved osseointegration.

1. Introduction

Diseases and aging influence the bone tissue quality, making a total or partial bone replacement by implants or prosthesis necessary. The implant functionality is affected by several factors: intrinsic properties of materials and components (shape and geometry features); host bone tissue (quality and quantity); and topography, biochemistry and surface energy of the biointerface between the bone and the implant [1]. Additionally, other factors related to the environmental stimulation also affect prostheses behavior, e.g. mechanical stimulation (local and remote), the systemic immunological response (natural and modulated), and/or some medicine, drugs and systemic effects [1]. The biointerfacial properties are the main elements for the correct performance of the system. The goal of implant design is to reach a biofunctional (bone ingrowth and osseointegration) and biomechanical (stiffness and yield strength) equilibrium [2]. Although commercial pure titanium (c.p. Ti) and its alloys are commonly used as bone implants [3], they exhibit some unsolved issues: stress shielding phenomenon and lack of osseointegration [2,4]. The reduction of the implant Young's modulus can be addressed by fabricating porous materials [5–9]. Regarding the

improvement of osseointegration, implant surface modifications have been widely performed [2,4–8], by implementing a variety of techniques that involve physical and chemical changes, e.g. controlling the surface roughness or obtaining bioactive surfaces [10].

The success of implants depends on material properties including mechanical behavior, microstructure and surface characteristics [11]. The surface plays an important role in the response of artificial devices in a biological environment making surface modification one of the most common approaches to improve the biocompatibility. Among bioceramics, hydroxyapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (HA) is known for its biocompatibility because of its similar chemical crystallographic structure to the mineral phase of living bone [12]. Hydroxyapatite is an osteoinductive, nontoxic, non-immunogenic agent and has the ability to form strong chemical bonds with natural bone [13,14]. According to its chemical formula, HA has a Ca/P molar ratio of 1.67 (5:3) which is close to the Ca/P ratio in bone minerals (between 1.37 and 1.87) [15].

Bioactive glasses (BGs) are being increasingly investigated as promising scaffold materials for bone regeneration since the discovery of 45S5 BG by Larry Hench in 1969 [13]. BGs have a well-recognized superior osteoconductivity, controlled biodegradability, the capability

* Corresponding author.

E-mail address: ytorres@us.es (Y. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.037>

Received 9 April 2018; Received in revised form 28 May 2018; Accepted 20 June 2018

Available online 21 June 2018

0257-8972/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

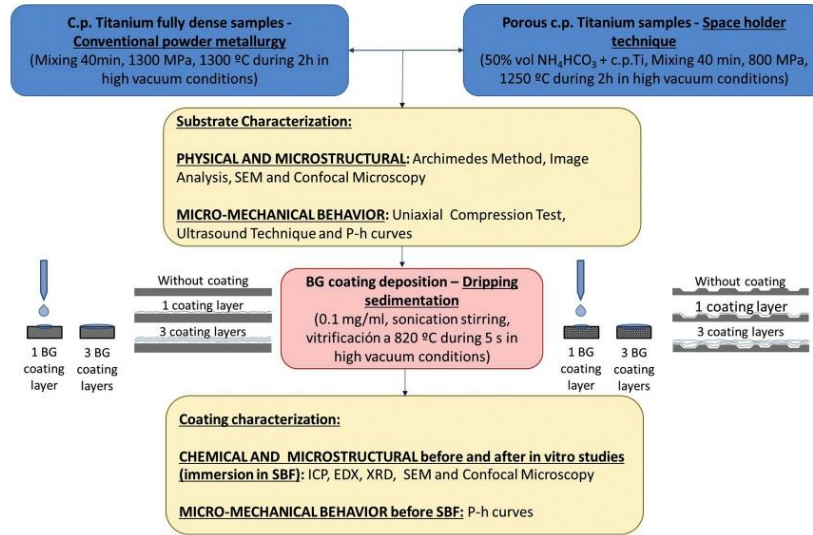


Fig. 1. Experimental procedure: Fabrication and characterization of BG coated titanium substrates.

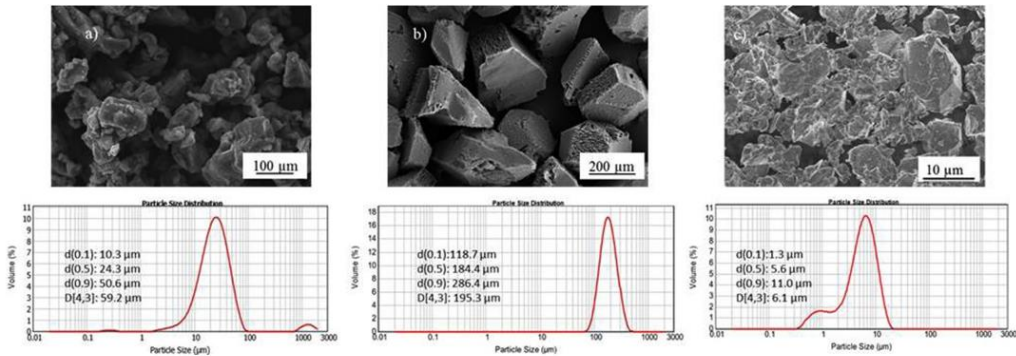


Fig. 2. Particle size distribution of a) Titanium c.p., b) ammonium bicarbonate, c) BG particles.

Table 1
Density and microstructural parameters of titanium substrates.

Substrate	Archimedes' method		Image analysis			
	ρ [g/cm^3]	Porosity (%)		Total porosity (%)	D_{eq} (μm)	F_f
		Total	Interconnected			
Fully dense	4.5	2.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.2	5.5 ± 0.2	~ 1
Porous	2.4 ± 0.1	47.0 ± 1.0	44.3 ± 1.3	51.8 ± 1.3	161 ± 29	0.7

of activating osteogenic gene expression, angiogenic potential [16], they promote the formation of bone mineral-like phases (including HA) and have drug delivery abilities [14,17]. Bioactive glasses exhibit high bioactivity through the release of dissolution ions such as Ca, P and Si, which may also affect gene expression in osteogenic cells and bone vascularisation, and could lead to the subsequent promotion of a high

rate of bone formation [16]. A. Scislowska-Czarnecka et al. [18] tested the effect on macrophage activation after coating porous titanium substrates with BG by sol-gel technique, and compared it to different ceramic coatings. It was found that more cells were adhered to BG-Ti system than to other combinations, as well as to Ti substrate with no covering. The BG coating on porous titanium showed also good

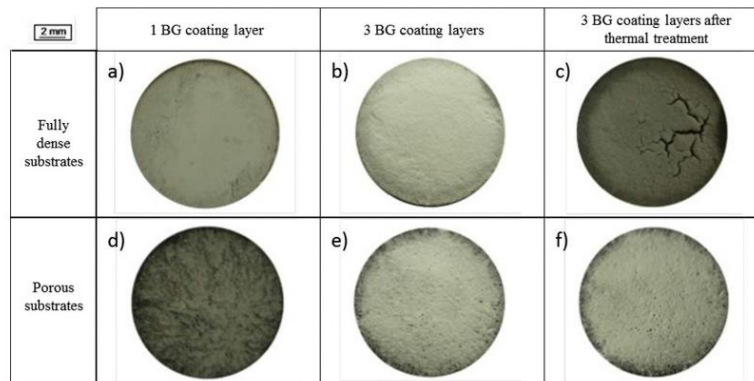


Fig. 3. Macroscopic appearance of the coated titanium substrates before and after thermal treatment, influence of the number of coating layers (sample diameter: 12 mm).

biocompatibility, not stimulating macrophages to an inflammatory response.

The use of bioactive glasses is limited for load-bearing applications due to their brittleness. There are two processing methods to fabricate a glass: traditional melt-quenching (commercial bioactive glasses) and the sol-gel route (assembled nanoparticles – intrinsic nanoporosity). The implementation of most of the techniques for glass fabrication requires the control of a high number of parameters and a high cost. In terms of types, the main glasses are conventional silicate (similar to Bioglass® 45S5), phosphate-based and borate-based glasses. The interest of borate-based and phosphate-based glasses in soft tissue response is related to their fast dissolution compared to silicate-based glasses [19]. Nevertheless, BonAlive® (S53P4) has been highlighted in many clinical trials. In this context, although there are more available data for S53P4 than for 45S5, the degradation rate of S53P4 in the human body is lower [19]. In addition, 45S5 and S53P4 cannot be produced as amorphous bioactive glass scaffolds due to their crystallization during the sintering. For this reason, they are mostly employed as bioactive coatings on inert metallic substrates. In terms of fabrication, the temperatures should be chosen carefully in order to avoid glass crystallization and substrate degradation [20].

Fully dense commercial pure Ti substrates coated with BG (bioactive glass 45S5) have been widely investigated [21]. However there has been only limited work focusing on BG coatings onto porous titanium substrates [22]. The aim of this work is the fabrication of porous titanium substrates coated with BG by implementing a simple, repetitive and economical deposition technique, consisting on sedimentation by dripping. The materials combination offers a potential biomechanical (stiffness and yield strength) and biofunctional (ingrowth and osseointegration) equilibrium, recommended for partial cortical bone tissue substitution.

2. Materials and experimental procedure

Fig. 1 summarizes the complete fabrication and characterization process of commercial pure (c.p.) titanium substrates (full dense and porous) before and after being coated with BG of 45S5 composition (wt %: 45SiO₂–24.5CaO–24.5Na₂O–6P₂O₅). In addition, Fig. 2 shows the size distribution of the starting powders: c.p. grade IV titanium powder particles (SEJONG Materials Co. Ltd. - Seoul, Korea), ammonium bicarbonate, AB (NH₄HCO₃, Cymit Química S.L. - Spain), and BG (SCHOTT Vitryxx® 45S5). The spacer content (50 vol% of NH₄HCO₃) and its range particle size (100–200 μm) were chosen according to

previous works of the authors [8,23,24]. The mixed powders (c.p. Ti + NH₄HCO₃) are pressed at 800 MPa in an Instron 5505 machine. Afterwards, the spacer is removed in a furnace in two steps: firstly at 60 °C, and then at 110 °C under low vacuum conditions (~10⁻² mbar) for 12 h each. Finally, the green porous samples are sintered in a ceramic tubular furnace at 1250 °C during 2 h in high vacuum conditions (~10⁻⁵ mbar).

The study of basic physical properties, microstructural characterization and uniaxial compression behavior of fully dense and porous substrates was performed. Density, total and interconnected porosity measurements were carried out by Archimedes' method (ASTM C373-14), the equivalent diameter and shape factor of the pores was determined by Image Analysis (Image-Pro Plus 6.2 software). Young's modulus (conventional, E_c and dynamic, E_d) and yield strength were measured by ultrasound technique [25,26] and uniaxial compression test (ASTM E9-09). The details of the performed protocols for the Archimedes' technique, image analysis and ultrasound technique have been widely reported previously for different types of porous c.p. titanium [6,8,27–30].

BG deposition was performed by the sedimentation technique, a simple coating technique. The suspension consists of 200 mg of SCHOTT Vitryxx® bioactive glass powder in 20 ml of ethanol [31]. The use of ethanol avoids the formation of bubbles in the coating during the thermal treatment [32]. The suspension was prepared just before using it and stirred in a sonication bath for 15 min. Then, the solution was taken by a pipette and distributed drop by drop on all samples until the total of the surface was covered. The samples were allowed to rest for 24 h in order to evaporate the ethanol. The process was repeated as many times as the desired number of coating layers was reached. Finally, the coated substrates were thermally treated in a molybdenum furnace at 820 °C for 5 s in high vacuum conditions (~10⁻⁵ mbar) to perform the coating sintering.

A detailed study of the coating was carried out by confocal laser, SEM (JEOL 6460LV), X-ray diffraction (XRD) and instrumented micro-indentation. The confocal laser microscope model was Sensofar S Neox (green light, 530 nm), and the data acquisition and processing software were SensoScan and SensoMap respectively. The phase analysis was performed by a powder diffractometer (model D8 Advance brand A25 of BRUKER) employing Cu Kα radiation (λ = 0.154 nm) with voltage and current settings of 40 kV and 30 mA, respectively. Data were collected over the range of 2θ = 10–70° using a step size of 0.03° and a counting time 0.1 s per step. Micro-hardness tests were performed in a MICROTTEST device (MTR3/50-50/NI). The Vickers pyramid diamond

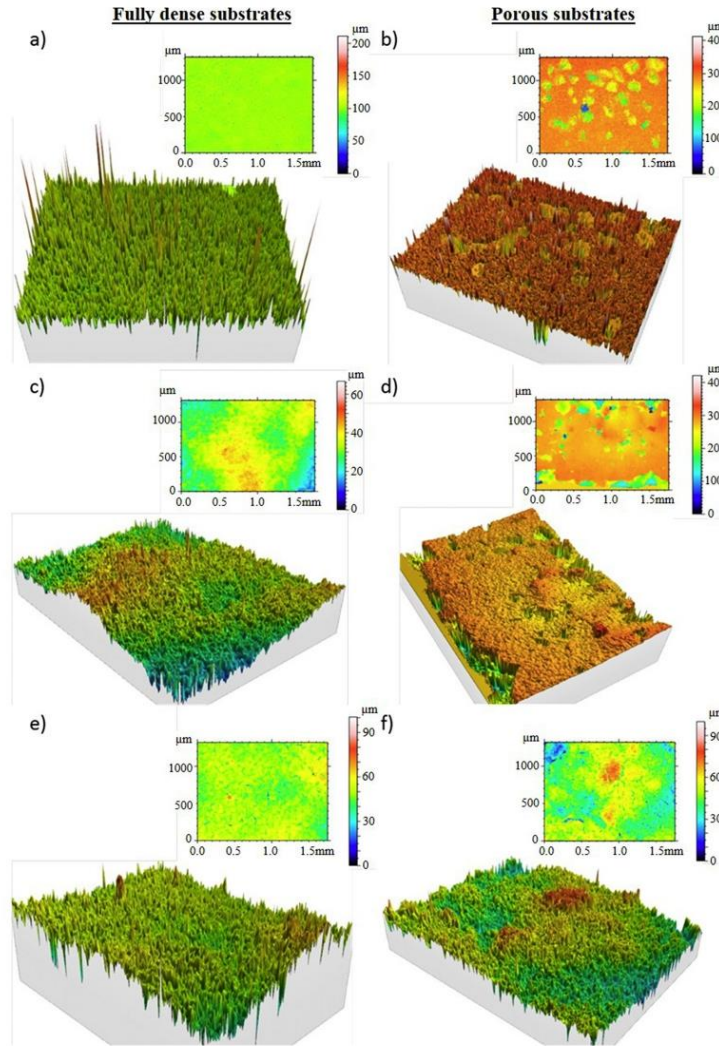


Fig. 4. Confocal Images. Fully dense and porous substrate images for no coating (a, b), one BG coating layer after thermal treatment (c, d) and three BG coating layer after thermal treatment (e, f).

tip was used in the simple loading/unloading regime. The resulting load–penetration ($P-h$) curves (1 N and 40 s of dwell time) were evaluated using the Oliver and Pharr analysis [33–36]. The surface roughness and layer homogeneity, as well as the sinterability (porosity and BG particles union) and structural integrity (adhesion to the substrate and presence of cracks) were the employed parameters to evaluate the coating.

The hydroxyapatite precipitation in Simulated Body Fluid (SBF) was used to evaluate the coating bioactivity [37]. The SBF solution was prepared according to Kokubo's protocol [38]. Each coated substrate was immersed in 50 ml of SBF at 37 °C up to 21 days. The SBF solution

was changed after 14 days because the cation concentration decreased due to the chemical changes on the surface. Then the samples were rinsed in distilled water and absolute ethanol. Finally, they were dried at 45 °C for 10 min. The chemical composition of the samples surface after immersion in SBF was determined by energy dispersive X-ray (EDX). Spectra were collected at 30 kV with a field emission gun. They were processed using an INCA (Oxford instruments) program. At least four measurements were taken from each evaluated condition. The SBF solutions (5 ml) before and after the immersion of porous titanium substrates were analyzed (concentration of Ca, P, Na, Si and Ti) by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES)

Bioactive coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 349 (2018) 584–592

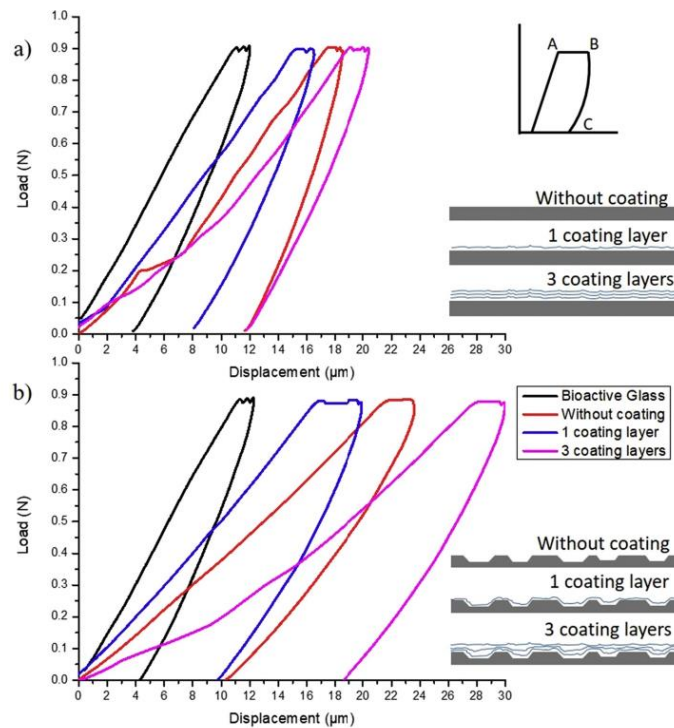


Fig. 5. Applied load vs penetration depth curves for several substrate-coating systems investigated. The number of BG coating layers influences the P-h graphics for a) fully dense and b) porous samples.

Table 2
Micro-indentation (P-h) parameters of the substrates and coating.

		A	B	C	(B-A)	(B-C)/B	
Bioactive glass Fully dense substrate	Coating layers	Without	11.3	12.2	4.3	0.9	
	1	17.5	18.3	11.7	0.9	36.3	
	3	15.0	16.2	8.1	1.2	50.3	
Porous substrate	Coating layers	Without	19.1	20.4	11.8	1.2	42.2
	1	21.7	23.1	10.3	1.4	55.5	
	3	16.8	19.9	9.7	3.1	51.2	
		3	27.4	30.0	18.6	2.5	38.0

using an equipment (Horiba Jobin Yvon, model ultima 2). To determine the concentrations of Ca, P, Na, Si and Ti, a solid-state generator of 40.68 MHz, a monochromator Czerny-Turner and a photomultiplier tube detector were employed. The detection limits of ICP-AES are 0.009 mg/l for Ca and 0.002 mg/l for Na, P, Si and Ti.

3. Results and discussion

3.1. Physical and microstructural characterization

The density values and the microstructural parameters of the full dense and porous titanium substrates are shown in Table 1. Two different types of porosity were observed: On the one hand, a quasi-spherical micro-porosity (shape factor $F_i \sim 1$) inherent to the sintering process for both substrates. On the other hand, an additional macro-

porosity associated to the NH_4HCO_3 porogen for porous titanium. The obtained volume fraction and equivalent diameter (D_{eq}) of the macropores agree with the content and the average size of the employed spacer, respectively. The obtained pores size and interconnectivity grade should guarantee bone in-growth and they will potentially improve BG infiltration.

Figs. 3 and 4 present the macroscopic and 3D aspects of the coating surfaces. These results allow to evaluate the influence of both substrate types and the number of coating layers: 1) a greater homogeneity is achieved as the number of coating layers increased (Figs. 3b, e and 4e, f), 2) the coating adhesion is better in porous substrates after thermal treatment (no presence of cracks and chipping in Fig. 3f vs Fig. 3c), due to the anchoring effect (pores interconnectivity and inner walls roughness) [6,27,28], 3) the surface roughness decreased when the number of coating layers increased, showing a greater effect for the porous substrates (the pores were filled of BG, Fig. 4f) where the remaining BG amount was greater than in fully dense specimens. This fact could promote a higher formation of HA (see discussion on the results of the SBF study).

3.2. Macro and micromechanical characterization

The macro-mechanical behavior of the fabricated porous substrates ($E_d = 20.8$ GPa by Ultrasound technique, $E_c = 26$ GPa and $\sigma_y = 127$ MPa by Uniaxial compression test) shows a good match to cortical bone (Young's modulus of 20–25 GPa and mechanical strength of 150–180 MPa) [39]. The mechanical results for full dense substrates

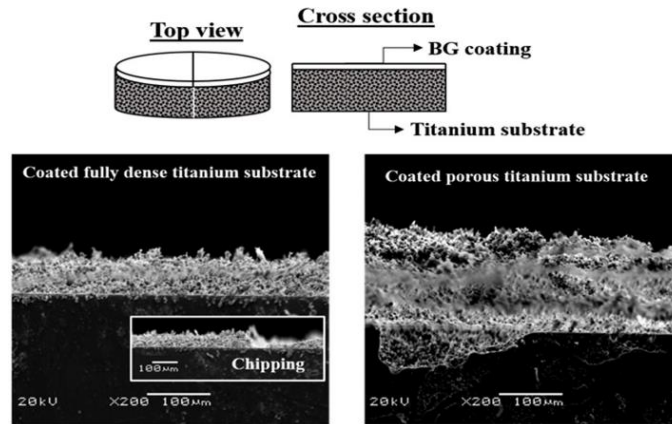


Fig. 6. Schematic view of the top and cross section of coated porous substrate and SEM images of the cross sectional view of coated fully dense and porous substrates. Inset: detailed view of the chipping of the coating in the fully dense substrate.

are consistent with the obtained micro-porosity values ($E_0 = 92$ GPa, $E_c = 85$ GPa and $\sigma_y = 621$ MPa) [10,27,28]. In Fig. 5 the P-h curves for the different coating-substrate systems are presented. Additionally, in Table 2, the penetration depth values at the critical and specific points are listed: A (maximum load), B (holding time of the load), and C (after elastic recovery). Measurements showed the following results (Fig. 5 and Table 2). The relationship between the Vickers micro-hardness and the penetration depth is inversely proportional: 1) BG-fully sample (yellow curve) has the greatest hardness, since it was pressed and sintered, while the BG coating was micro-porous (it was not pressed and also it was likely not fully sintered) [40,41]. The Vickers hardness decreased in porous titanium substrates (effect of the loss of stiffness associated with macro-pores of the substrate). The micro-hardness in the coatings of one layer (blue curves) is greater than its corresponding substrate. However, the micro-hardness value decreases as the number of BG layers increases (effect of the interfaces layer/layer and coating/substrate). On the other hand, a typical pseudo-creep behavior is observed in all systems (coatings/substrates) studied; suggesting a collapse of the BG coating layer by layer (at constant applied load).

Fig. 6 displays SEM images of the cross section view of coated substrates. The thickness of BG coating for three layers for both types of substrates has been determined from them, resulting 75.7 ± 35.1 for the coated fully dense substrate and 167.9 ± 20.1 for the porous one. In the case of the coated fully dense titanium substrate, it is less homogenous (it is remarkable the presence of chipping), due to poor the adhesion of the coating. Otherwise, the infiltration of BG into the pores is observed for coated porous substrates, potentially enhancing the osseointegration. Supplementary data includes the EDX analysis.

3.3. In vitro studies in SBF

Fig. 7A and B show the differences between the amorphous and crystalline states before and after BG particles sintering respectively. Angular location and peak intensities match the standard PDF 22.1455 in the XRD pattern (Fig. 7B), confirming that the crystalline phase is $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$. The same crystalline phase has been formed and identified in previous studies on sintered 45S5 bioactive glasses [40,42,43]. Quantitative in-vitro studies about the crystallinity effect on the apatite formation on 45S5 BG surfaces are found in literature [40,42]. Crystallization of 45S5 BG depends on the glass particle size and thermal treatment conditions. The $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ phase is predominant for high

temperatures, usually above 800–1000 °C. It has been found that the $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ crystal phase slightly decreased the kinetics of apatite layer formation on 45S5 BGs, but the HA formation is not inhibited in any case [40], due to there were no differences in crystallinity or phases in DRX spectra at this range of temperatures in heat treatment. The most important factor to inhibit the HA formation was the micro-structure of intermediate porosity, related to the densification of the BG [40,42].

The XRD and SEM results on porous cp-Ti specimen with one BG coating layer (Fig. 7C) after immersion for 21 days in SBF, show no peaks and no morphological features of an HA phase respectively. However, formation of rutile and anatase TiO_2 phases is observed, with rutile phase being predominant. Both phases present a positive effect in terms of improved osseointegration [44]. It was also observed that after sample immersion in SBF for 21 days, the $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ crystalline phase completely disappeared, which has been also shown in previous studies [41].

The XRD and SEM results on titanium substrates coated with three coating layers of BG after 21 days in SBF (porous-Fig. 7D and fully dense-Fig. 8) reveal the formation of HA particles exhibiting the typical morphology, similar to results in literature [40,41,45,46]. The reason for this behavior could be that the deposited BG amount was higher. It is thus confirmed that HA precipitation does not depend on the presence of a crystalline phase before the immersion in SBF [37,47]. This fact suggests the potential improvement of osseointegration in future in-vivo applications. As expected, the presence of $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ phase is not detected. Indeed, confirming the osseointegration ability of the present materials by in-vivo studies goes beyond the scope of this paper, however in vitro and in vivo evidence in literature on BG coatings and implants suggests that osseointegration properties can be imparted to metallic materials by layers of BGs [14,18].

ICP analysis of the SBF solution before and after samples immersion was performed (Fig. 9). No variation in Ca and P concentrations for porous cp-Ti sample with one BG coating layer after immersion in SBF was observed (Fig. 9a). This fact corroborates that HA was not formed. However, both porous (Fig. 9b) and fully dense (Fig. 9c) cp-Ti samples with three coating layers present a decrease of Ca and P content in the solution, indicating the HA formation on the samples surface, as discussed above. The consumption of Ca and P occurred in a Ca/P relation of 1.6, a value closed to that of stoichiometric HA in the human body. Both systems present quantitatively considered similar amount of HA

Bioactive coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 349 (2018) 584–592

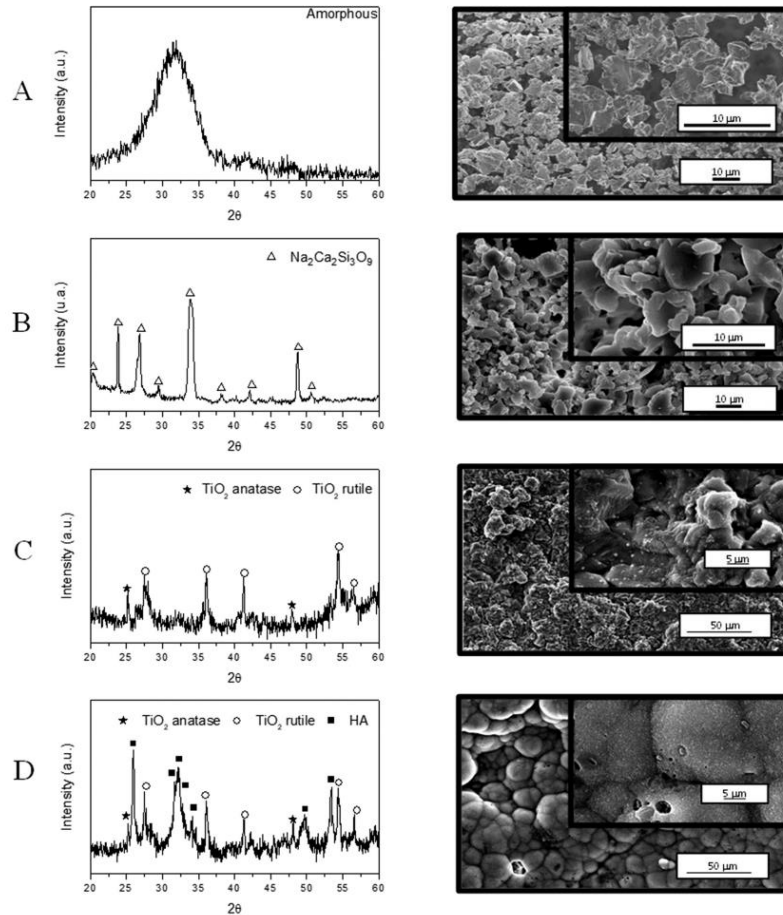


Fig. 7. XRD patterns (left) and SEM images (right) for 45S5 BG particles and coated samples: A. 45S5 BG particles before sintering, B. 45S5 BG sintered sample. C. Porous cp-Ti substrate with one coating layer of 45S5 BG after 21 days in SBF and D. Porous cp-Ti substrate with three coating layers of 45S5 BG after 21 days in SBF.

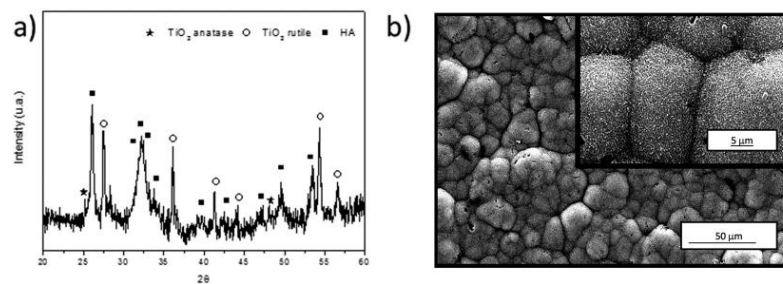


Fig. 8. a) XRD patterns and b) SEM micrographs of fully dense cp-Ti sample with three BG coating layers showing massive formation of HA after 21 days in SBF.

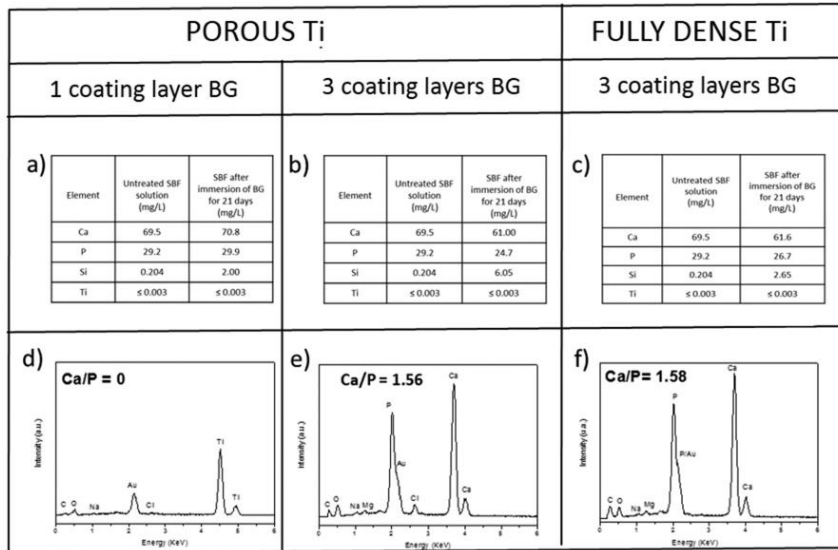


Fig. 9. ICP data of: a) porous cp-Ti with one coating layer of BG, b) porous cp-Ti with three coating layer of BG and c) full dense cp-Ti with three coating layer of BG after 21 days in SBF. EDX spectra of: d) porous cp-Ti with one coating layer of BG, e) porous cp-Ti with three coating layer of BG and f) full dense cp-Ti with three coating layer of BG after 21 days in SBF.

on the substrates surface.

Silicon (Si) concentration was also studied by ICP analysis. It is well known that ion exchange takes place between the BG surface and SBF, varying the presence of Si in the solution [48]. The chemical and physical properties of bioactive glasses (e.g surface area, surface roughness and chemical composition among others) have important influence on the Si concentration and the BG bioactivity. Some authors have reported that Si has a dual influence on bone: On the one hand, Si presence promotes osteoblast formation and proliferation. On the other hand, it inhibits osteoclast induction process and growth [48]. Osteoclasts are specialized cells whose biological activity is related to bone matrix resorption and they take part in the natural bone remodelling. In these terms, a cellular homeostasis is required. When Ti substrates are coated with proteins, the macrophages react with Ti firstly, generating a phenotype M1. M1 polarize into M2, a typical phenotype in the tissue regeneration process. If osteoclasts disappear radically, toxic effects by different components could take place [49]. This fact shows the importance of controlling the Si release from the BG coating.

Fig. 9 shows the variation of Si concentration for each sample after 21 days in SBF. It increased up to 2 mg/ml in porous cp-Ti specimen with one BG coating layer (Fig. 9a), while for three coating layers it was 6 mg/ml (Fig. 9b), showing a direct relation between the Si concentration and the number of BG coating layers. Otherwise, the Si concentration of fully dense cp Ti sample with three coating layers is similar to that of porous substrates with one coating layer (2.65 mg/ml, Fig. 9c). Thus Si release is a parameter to be taken into account. For example, Si release could be positive, reducing the activity of the macrophages and not differentiating osteoclasts to a large extent: However, a balance is always required, allowing osteoblasts to adhere to the specimens while Ca and P are released and contribute to the formation of HA layer as discussed above.

The content of Ti in the SBF solutions was negligible for all coated samples, confirming the structural integrity of the porous titanium matrix during the study (Fig. 9a–c). The EDX results show no presence

of P and Ca for porous cp-Ti with one coating layer of BG (Fig. 9d). In contrast, the concentration of both increased significantly for porous and dense substrates with three coating layers of BG, reaching an atomic Ca/P ratio of 1.56 (porous-Fig. 9e) and 1.58 (fully dense-Fig. 9f), respectively.

4. Conclusions

The study of the porous titanium substrates coated with 45S5 bioactive glass allows to conclude the following:

- 1- A novel sedimentation technique was introduced to coat Ti substrates with 45S5 BG powder. The parameters to control are BG particle size, concentration, number of coating layers and thermal treatment. Using porous titanium substrates, combined with dripping sedimentation, involves the possibility of an economically and commercially viable alternative to obtain BG coatings for implants and scaffolds.
- 2- The coated porous substrate has a better adherence than that of full dense titanium. This can be attributed to the roughness of the pore walls and the anchoring associated with the infiltration of BG particles into the pores. The size and content of the pores of the titanium substrates studied in this work as well as the mechanical properties (E and yield strength) meet the requirements of the cortical bone. However, fatigue behavior (static and cyclic) and the presence of corrosion phenomena should also be considered.
- 3- To obtain a homogeneous BG coating three layers were required (more layers compromises the integrity and adhesion of the coating). Nevertheless, it is important to control the rates, temperature and atmosphere of the thermal treatment in terms of BG crystallization and micro-mechanical properties of the coating (presence of micro-porosity, as well as quality of union between the BG particles and the coating/substrate interface).
- 4- The results suggests better osseointegration employing three BG

Bioactive coatings on porous titanium for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 349 (2018) 584–592

coating layers on the substrates, due to greater formation of HA in contact with SBF. Nevertheless, the compromise between the thermal expansion coefficient (coating adherence to the substrate) and the bioactivity must be considered to choose the bioactive glass.

Acknowledgements

The authors dedicate this paper to the memory of Prof. Juan José Pavón Palacio (University of Antioquia, Colombia). This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of the State General Administration of Spain under the grant MAT2015-71284-P. The authors would like to thank technician J. Pinto for the assistance in mechanical characterization.

Data availability

The raw/processed data required to reproduce these findings cannot be shared at this time as the data also forms part of an ongoing study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.037>.

References

- [1] J.P. Allain, M. Echeverry, J. Pavón, S. Arias, Nanostructured biointerfaces, in: K. Iniewski, S. Selimovic (Eds.), *Nanostructured Biointerfaces*, CRC Press, 2014, pp. 42–67.
- [2] L.L. Hench, J.R. Jones, *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, Woodhead Pub. Ltd., Cambridge, England, 2005.
- [3] J.D. Enderle, J.D. Bronzino (Eds.), *Introduction to Biomedical Engineering*, third ed., Elsevier Ltd, Academic Press, Amsterdam, Boston, 2012.
- [4] A. Stamboulis, A. Boccaccini, L. Hench, Novel biodegradable polymer/bioactive glass composites for tissue engineering applications, *Adv. Eng. Mater.* 24 (2002) 105–109.
- [5] S. Borjas, E.J. Gil, L. Cordero, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A.R. Boccaccini, Y. Torres, Electrophoretic deposition and characterization of chitosan/45S5 bioactive glass composite coatings on porous titanium for biomedical applications, *Key Eng. Mater.* 654 (2015) 189–194.
- [6] Y. Torres, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez, Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder, *J. Mater. Process. Technol.* 212 (2012) 1061–1069.
- [7] J. Jia, A.R. Siddiq, A.R. Kennedy, Porous titanium manufactured by a novel powder tapping method using spherical salt bead space holders: characterisation and mechanical properties, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 48 (2015) 229–240.
- [8] Y. Torres, J.A. Rodríguez, S. Arias, M. Echeverry, S. Robledo, V. Amigo, J.J. Pavón, Processing, characterization and biological testing of porous titanium obtained by space-holder technique, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 6565–6576.
- [9] L.L. Hench, *Biomaterials: a forecast for the future*, *Biomaterials* 19 (1998) 1419–1423.
- [10] L.L. Hench, The story of Bioglass, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967–978.
- [11] T. Albrektsson, P.I. Brånemark, H.A. Hansson, J. Lindström, Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man, *Acta Orthop. Scand.* 52 (1981) 155–170.
- [12] T. Kokubo, H. Kim, M. Kawashita, T. Nakamura, Bioactive metals: preparation and properties, *J. Mater. Sci.* 15 (2004) 99–107 (REVIEW).
- [13] L.L. Hench, S.M. Best, *Ceramics, glasses and glass-ceramics*, in: B.D. Ratner, F.J. Schoen, A.S. Hoffman, J.E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, pp. 153–170.
- [14] K. Jurczyk, K. Niespodziana, M.U. Jurczyk, M. Jurczyk, Synthesis and characterization of titanium-45S5 Bioglass nanocomposites, *Mater. Des.* 32 (2011) 2554–2560.
- [15] S. Wu, X. Liu, K.W.K. Yeung, C. Liu, X. Yang, Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. R* 80 (2014) 1–36.
- [16] A.A. Gorustovich, T. Steimetz, R.L. Cabrini, J.M. Porto López, Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: a histomorphometric study in rats, *J. Biomed. Mater. Res. A* 92 (2010) 32–37.
- [17] A. Hoppe, N.S. Guldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32 (2011) 2757–2774.
- [18] A. Scisłowska-Czarnecka, E. Menaszek, B. Szaraniec, E. Kolaczowska, Ceramic modifications of porous titanium: effects on macrophage activation, *Tissue Cell* 44 (2012) 391–400.
- [19] J.R. Jones, Reprint of: review of bioactive glass: from Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) 53–82.
- [20] C.Y. Tang, C.P. Tsui, D.J. Janackovic, P.S. Uskokovic, Nanomechanical properties evaluation of bioactive glass coatings on titanium alloy substrate, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 8 (2006) 1194–1199.
- [21] H. Farnoush, F. Muhaffelb, H. Cimenoglu, Fabrication and characterization of nano-HA-45S5 bioglass composite coatings on calcium-phosphate containing micro-arc oxidized CP-Ti substrates, *Appl. Surf. Sci.* 324 (2015) 765–774.
- [22] C. Domínguez-Trujillo, F. Ternero, J.A. Rodríguez-Ortiz, J.J. Pavón, I. Montealegre-Meléndez, C. Arévalo, F. García-Moreno, Y. Torres, Improvement of the balance between a reduced stress shielding and bone ingrowth by bioactive coatings onto porous titanium substrates, *Surf. Coat. Technol.* 338 (2018) 32–37.
- [23] ASTM F67-13, Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700), ASTM International, 2013.
- [24] S. Muñoz, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A. Civantos, J.P. Allain, Y. Torres, On the influence of space holder in the development of porous titanium implants: mechanical, computational and biological evaluation, *Mater. Charact.* 108 (2015) 68–78.
- [25] ASM-International, *Nondestructive Evaluation and Quality Control*, 9th ed., (1989).
- [26] J. Müller-Rochholz, Determination of the elastic properties of lightweight aggregate by ultrasonic pulse velocity measurement, *Int. J. Cem. Compos. Light. Concr.* 1 (1979) 87–90.
- [27] Y. Torres, J.J. Pavón, I. Nieto, J.A. Rodríguez, Conventional powder metallurgy process and characterization of porous titanium for biomedical applications, metallurgical and materials transactions B-process metallurgy and materials processing, *Science* 42 (2011) 891–900.
- [28] Y. Torres, S. Lascano, J. Bris, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez, Development of porous titanium for biomedical applications: a comparison between loose sintering and space-holder techniques, *Mater. Sci. Eng. C* 37 (2014) 148–155.
- [29] ASTM B962-15, Standard Test Methods for Density of Compacted or Sintered Powder Metallurgy (PM) Products Using Archimedes' Principle, ASTM International, 2015.
- [30] ASTM E9-09, Standard Test Methods of Compression Testing of Metallic Materials at Room Temperature, ASTM International, 2009.
- [31] S. Foppiano, S.J. Marshall, G.W. Marshall, E. Saiz, A.P. Tomsia, Bioactive glass coatings affect the behavior of osteoblast-like cells, *Acta Biomater.* 3 (2007) 765–771.
- [32] S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T.O. Ku, K. Sugauna, A.P. Tomsia, Bioactive glass coatings for orthopedic metallic implants, *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 2921–2930.
- [33] W.C. Oliver, G.M. Pharr, An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *J. Mater. Res.* 7 (1992) 1564–1583.
- [34] M. Mata, J. Alcalá, The role of friction on sharp indentation, *J. Mech. Phys. Solids* 52 (2004) 145–165.
- [35] W.C. Oliver, G.M. Pharr, Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: advances in understanding and refinements to methodology, *J. Mater. Res.* 19 (2004) 3–20.
- [36] M.R. Vanlandingham, Review of instrumented indentation, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 108 (2003) 249–265.
- [37] Ö.H. Andersson, G. Liu, K.H. Karlsson, L. Niem, J. Miettinen, J. Juhanoja, In vivo behaviour of glasses in the SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅-Al₂O₃-B₂O₃ system, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1 (1990) 219–227.
- [38] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity, *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915.
- [39] J. Currey, J. Black, H. Garth (Eds.), *Handbook of Biomaterials Properties*, Springer, Verlag, London, 1998.
- [40] D.C. Clupper, L.L. Hench, Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5, *J. Non-Cryst. Solids* 318 (2003) 43–48.
- [41] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini, 45S5 Bioglass[®]-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 2414–2425.
- [42] D.C. Clupper Jr., J.J. Mecholsky, G.P. La Torre, D.C. Greenspan, Sintering temperature effects on the in vitro bioactive response of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in Tris buffer, *J. Biomed. Mater. Res.* 57 (2001) 532–540.
- [43] D.C. Clupper Jr., J.J. Mecholsky, G.P. La Torre, D.C. Greenspan, Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid, *Biomaterials* 23 (2002) 2599–2606.
- [44] P. Sarria, Y. Torres, F.J. Gotor, E. Gutiérrez, M. Rodríguez, R. González, L. Hernández, E. Peon, H. Guerra, J.E. González, Processing and characterization of Ti-6Al-4V samples manufactured by selective laser melting, *Key Eng. Mater.* 704 (2016) 260–268.
- [45] S. Ferraris, A. Venturello, M. Miola, A. Cochis, L. Rimondini, S. Spriano, Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration, *Appl. Surf. Sci.* 311 (2014) 279–291.
- [46] G. Ciobanu, O. Ciobanu, Investigation of the effect of collagen and vitamins on biomimetic hydroxyapatite coating formation on titanium surfaces, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 1683–1688.
- [47] M.R. Azenha, O. Peit, V.M. Barros, Bone response to bioilicats with different crystal phases, *Braz. Dent. J.* 21 (2010) 383–389.
- [48] Z. Mladenović, A. Johansson, B. Willman, K. Shahabi, E. Björn, M. Ransjö, Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro, *Acta Biomater.* 10 (2014) 406–418.
- [49] R.J. Friederichs, R.A. Brooks, M. Ueda, S.M. Best, In vitro osteoclast formation and resorption of silicon-substituted hydroxyapatite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. A* 103 (2015) 3312–3322.



Bacterial behavior on coated porous titanium substrates for biomedical applications



Cristina Domínguez-Trujillo^a, Ana M. Beltrán^a, María D. Garvi^b, Alba Salazar-Moya^a, Julián Lebrato^b, Daniel J. Hickey^c, Jose A. Rodríguez-Ortiz^a, Paul H. Kamm^d, Clara Lebrato^b, Francisco García-Moreno^d, Thomas J. Webster^c, Yadir Torres^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte, Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

^b Grupo TAR, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

^c Department of Chemical Engineering, Northeastern University, Boston, MA, USA

^d Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Porous titanium
Stress shielding
Bacterial behavior
Novel sulfonated PEEK

ABSTRACT

In this work, bacterial behavior on dense and porous titanium substrates is discussed. Porous titanium was fabricated by a space holder technique (using 50 vol%, NH_4HCO_3 with particle sizes between 250 and 355 μm). These substrates were coated by sulfonated PEEK (termed SPEEK). Characterization of the porous substrate was carried out using the Archimedes Method, Image Analysis, and three-dimensional X-ray Micro-Computed Tomography (including total and interconnected porosity, equivalent diameter, and pore shape factor), as well as mechanical characterization (specifically stiffness and yield strength). A detailed study was performed here to investigate the influence of substrate porosity on the adhesion and proliferation of *E. coli*, *MRSA*, and *P. aeruginosa* (common causes of orthopedic device-associated infections). Bacterial colonization was examined in terms of the initial bacterial concentration, as well as bacterial adherence to and growth on the surface and inside the pores. Results suggest that fully dense titanium supported the least bacterial colonization, while the porous titanium promoted bacterial growth in the medium and inside the cavities. Furthermore, the SPEEK coating deposited onto the samples inhibited bacteria growth inside the porous materials. In this manner, this study showed for the first time that SPEEK could have potential antibacterial properties to offset the increase in bacteria growth commonly observed in porous materials.

1. Introduction

Congenital and degenerative diseases, trauma (accidents), as well as the intrinsic aging of bone tissues are all a global health problem. In this context, implants are needed more now than ever. Only about twenty biomaterials have been clinically successful among hundreds of potential candidates. Titanium c.p. and its alloys, are currently considered the best metallic biomaterials for orthopedic applications in terms of their excellent biocompatibility, corrosion resistance and specific mechanical properties. However, despite their benefits, they have two limitations that often compromise their clinical success: 1) the difference between the Young's Modulus of the implant (100–110 GPa) and cortical bone (20–25 GPa) presents stress-shielding issues [1], which can lead to the reabsorption of the bone tissue around the implants and

even bone fracture; and 2) the micro-movement of the implants has been associated to poor osseointegration of titanium, leading to implant loosening and even failure. As a more recent problem, titanium possesses no inherent antibacterial properties and thus there can be problems at the implant/tissue interface due to the colonization and proliferation of bacteria during surgery and/or even one year after implantation.

Several authors have reported the advantages of using porous materials [2–5] to minimize the above mentioned stress-shielding phenomenon, mainly for Ti and Ti-alloys [3,6]. There are more than thirty techniques for the fabrication of porous substrates. Among them, the space holder technique is very popular because it is cheap, simple and reliable and, at the same time, the porosity can be easily controlled. Introducing porosity into the substrate is a strategy to adapt the

* Corresponding author at: Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte, Escuela Técnica Superior de Ingeniería y Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, Virgen de África 7, 41011 Sevilla, Spain.

E-mail address: ytorres@us.es (Y. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.10.098>

Received 12 September 2018; Received in revised form 29 October 2018; Accepted 30 October 2018

Available online 01 November 2018

0257-8972/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

mechanical properties of the Ti-based alloys to bone, which reduces the Young's modulus (stress-shielding) and, at the same time, it enhances the biofunctionality since it also allows for bone in-growth (for pore sizes > 100 µm). The pore walls associated with the spacer present a micro-scale roughness pattern, which improves osteoblast adhesion [6,7]. However, the surface of the pores could contribute to bacterial adhesion and proliferation due to the positive relationship between bacteria size and micron roughness [8]. Furthermore, pores also affect mechanical (fatigue and fracture) and tribo-corrosion behavior (corrosion, micro-hardness and wear resistance) so it is required to achieve a biomechanical equilibrium. In this context, advanced three-dimensional techniques (for instance, micro-CT [9–13]) are necessary for a full characterization of the substrates and the determination of critical parameters, such as pore distribution, size, and inner roughness, with the aim of establishing a relationship between porosity and mechanical behavior of the implants.

The presence of pathogenic microorganisms in the body, for instance *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, and *Streptococcus mutans*, are responsible for several human infections and are an increasing threat to public health, since they are commonly present in daily environments (such as food, synthetic fabrics, drinking water, and medical supplies) [14,15]. In this context, the single bacterial cells are able to attach to an implant, proliferate rapidly, and colonize the implant surface, thereby limiting the healthy tissue growth required to achieve good fixation of the implant [16]. Although the resulting infections can be treated with antibiotics, it would be far more effective to avoid them, since antibiotic resistance has been increasing in recent years. In fact, the U.S. Centers for Disease Control have predicted more deaths from antibiotic resistant bacteria than all cancers combined by 2050. One strategy to fight against infection and avoid the overuse of antibiotics is based on the design and use of anti-bacterial implant surfaces, which can be anti-biofouling and/or bactericidal [17,18]. Modification of polyetheretherketone (PEEK) [19,20] and/or anti-bacterial nanoparticles are novel approaches currently under investigation to resistant implant infection [21–23]. Although the bioactivity of the SPEEK coating could be considering a problem a recent publication on bulk based polyaryletherketone (PAEK) samples with additional S-content reported that “a sulfonation treatment followed by SBF incubation had a significant positive impact on the osteointegration property of the PAEK materials, especially for PEKK (polyetherketoneketone)” [24].

In this work, we present a comparative study of porous and dense titanium samples fabricated using PM conventional and the space holder technique. The role of porosity on bio-mechanical and bacterial behavior is assessed. Studies have been performed following simple, economical and reliable protocols to analyze three bacterial strains commonly known to infect orthopedic implants: *E. coli*, *MRSA*, and *P. aeruginosa* [4,25,26]. These results were analyzed in terms of the surface morphology (smooth or rough) and the real contact area of titanium samples. Finally, porous and fully-dense samples were coated with a novel and economical antibacterial treatment: a sulfonated polymer polyetheretherketone (SPEEK) which is of interest to some orthopedic companies. The aim was to fabricate and characterize a coated porous substrate with improved bio-mechanical (stiffness and strength) and bio-functional equilibrium (ingrowth and bacterial resistance).

2. Materials and methods

2.1. Substrate preparation and characterization

A space holder technique was employed to obtain porous titanium substrates by mixing commercially pure (c.p.) Ti powder (grade IV), with 50 vol% ammonium bicarbonate, NH_4HCO_3 (250–355 µm particle size). The green compacts were obtained by pressing at 800 MPa using an Instron 5505 universal testing machine. Afterwards, removal of the

spacer was performed by heating the samples in two stages of 12 h (60 °C and 110 °C respectively, both under low vacuum conditions, $\sim 10^{-2}$ mbar). Finally, sintering was carried out in a Carbolite® STF 15/75/450 ceramic furnace for 2 h at 1250 °C under high vacuum conditions ($\sim 10^{-5}$ mbar).

Scanning electron microscopy (SEM, Jeol JSM-6490LV) was carried out to analyze the surface morphology. The Archimedes' method was employed to determine the interconnectivity (P_i) and total porosity (P_T) of the porous titanium substrates [27]. The equivalent diameter (D_{eq}) of the pores was measured by image analysis (IA) using a Nikon Epiphot optical microscope coupled with a Jenoptik Progres C3 camera and Image-Pro Plus 6.2 analysis software. This analysis was compared with the data acquired using X-ray micro-computed tomography, gathered using a custom-made X-ray scanner composed mainly of a micron focused X-ray source L8121-01 (with a W-target) from Hamamatsu, Japan [28]. Scans were performed at 100 kV and 100 µA, with a spot size of 5 µm and were recorded with a flat panel detector C7943 (120 mm × 120 mm, 2240 × 2368 pixel), also from Hamamatsu. A 3D reconstruction of the specimen was obtained by acquiring a certain number of X-ray projections during sample rotation over 360°, followed by software reconstruction of these projections. This method allowed for the qualitative and quantitative exploration of the interior structure of the porous Ti samples, with a pixel size down to 6.4 µm at a 7.8-fold magnification.

The mechanical behavior (stiffness and yield strength) of porous titanium samples were examined by measuring the dynamic Young's modulus (E) using an ultrasound technique, performed with a KRAU-TRAMER USM 35, as well as uniaxial compression tests according to ASTM E9-09 [29] using an Instron 5505 universal testing machine.

2.2. Bacterial experiments

Two different experimental methods were employed to investigate the behavior of bacteria on porous and full-dense substrates. Proliferation data were analyzed on the flat material and in the pores. In terms of bacteria type, three types were analyzed: *E. coli*, *P. aeruginosa* and *MRSA*. In addition, different initial concentrations were studied in order to evaluate the possible influences in proliferation trends (colony-forming units and the kinetics of the proliferation). In the following sections, the details associated with the employed methods are described.

2.2.1. *Escherichia coli* behavior on c.p. Ti substrates

The bacterium used in the first study was *E. coli*, a lyophilized form from Ielab, Spain (*E. coli*; ATCC 25922). The solution was prepared employing Peptone Water (dehydrated culture media, from Panread AppliChem, Spain) and *E. coli*-Coliforms Chromogenic Medium from Conda Laboratories S.A. To determine the initial concentration in colony-forming units per 100 ml (CFU/100 ml), membrane filtration was performed, followed by incubation of the membrane on a Petri plate containing *E. coli*-Coliforms Chromogenic Medium at 37 °C for 1 h. Three initial concentrations were employed for the *E. coli* study: $7.75 \cdot 10^4$ (Concentration 1), $3.32 \cdot 10^3$ (Concentration 2) and $4.33 \cdot 10^2$ (Concentration 3) CFU/100 ml.

In this work, three 10 ml test tubes per each concentration were prepared. Fully-dense and porous Ti substrates were submerged in the first tube and second tube, respectively. The third tube was used as a reference solution (3rd tube, R). The reference solution represented the normal growth of bacteria, without external influence to their development. All tubes were incubated at 37 °C for 1 h. In this context, after the incubation time, the solution of each tube was filtrated by membrane filtration [30] to quantify the amount of *E. coli* per tube and per initial concentration (Protocol 1, P₁).

Afterwards, the *E. coli* density on the titanium substrate flat surface was analyzed (fully-dense and porous). A very smooth smear was made on the total surface of the titanium samples using a sterile swab. Then,

Bacterial behavior on coated porous titanium substrates for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 357 (2019) 896–902

the swab was applied following a zigzag pattern on a Petri plate containing *E. coli*-Coliforms Chromogenic Medium. The Petri plates were incubated at 37 °C for 24 h to quantify the CFUs on each flat surface (Protocol 2, P₂).

Finally, *E. coli* proliferation inside the pores of the titanium substrates was evaluated (Protocol 3, P₃). After swabbing, the substrates were submerged in test tubes with 10 ml of sterile Peptone water. This solution was mixed using a vortex mixer for 1 min and cooled at 4 °C for 2 h. Tube contents were again mixed with the vortex mixer to detach the bacteria from the cavities and to quantify them using membrane filtration. Due to the interconnected porosity, a particular protocol has to be followed [31] to force the attached bacteria inside the pores to be removed. This process was repeated three times to guarantee the complete detachment of bacteria from the cavities. The total number of CFU for each substrate and concentration was the CFU measured from protocols P₂ + P₃. Several measurements were made for each condition (protocol, substrate and initial concentration). The results are discussed in absolute and normalized (by corresponding contact medium-material surface) values.

2.2.2. MRSA and *P. aeruginosa* behavior in c.p. Ti substrates

The second experimental protocol used in this study employed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA; ATCC 43300) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*; ATCC 27583). A single individual bacterial colony was selected from a starter plate, inoculated into 3% tryptic soy broth (TSB), and cultured into late exponential phase. The resulting bacterial solution was diluted to a concentration of 10⁸ CFU/ml for seeding onto samples (0 dilution). The samples were immersed into 1.5 ml of a bacteria solution in a 24 well plate and cultured for 3 h at 37 °C. After that, the substrates were rinsed with PBS three times, removing the media at each step. Then, they were immersed in centrifuge tubes containing phosphate buffered saline (PBS). The tubes were sonicated for 5 min and vortexed in order to release the bacteria into the surrounding PBS. The PBS solution was diluted 1:10 (–1 dilution) and 1:100 (–2 dilution), and then 5 × 10 μl of each dilution were deposited onto agar plates. The plates were incubated overnight, and then colonies were counted manually. The bacteria culture was performed 3 times in total, and every time by duplicate.

2.3. SPEEK coating

A SPEEK solution was prepared by dissolving 1 g of poly-ether-ether-ketone (PEEK; Sigma Aldrich) in 25 ml of concentrated sulfuric acid (H₂SO₄ at 95–98%) with vigorous agitation at room temperature for 4 h at 300 rpm. Then, the temperature was raised to 50 °C and the solution was stirred overnight. The polymer solution was decanted slowly into 500 ml of ice-cold deionized water under continuous mechanical agitation to stop the sulfonating reaction. Once the polymer precipitate was formed, it was filtered and washed several times with distilled water until a neutral pH was reached. The polymer was dried under vacuum conditions at room temperature for 24 h, and at 65 °C in the furnace for an additional 24 h. The SPEEK fibers were then dissolved in a dimethylformamide (DMF) solution at 4% w/w.

Porous and fully-dense c.p. Ti substrates were dipped into the prepared SPEEK solution using a controlled immersion speed to create uniform surface coatings. Once the samples were coated, they were dried in an oven for 3–4 h at 200–250 °C. Coated samples were then challenged with MRSA using the above protocol.

3. Results and discussion

3.1. Substrate characterization: microstructural and mechanical

The microstructural and mechanical characterization of porous c.p. Ti substrates were performed using several techniques. For example, Fig. 1 shows micro-optical (a), confocal (b), and SEM (c, d) images of

the samples, where the porosity can be observed. The substrates presented two different ranges of pore sizes (Fig. 1a): microporosity generated during the sintering process, and macro-pores, which correspond to the former spacer particles. From the analysis of these images, the total and interconnected porosity was measured to be 46% and 41%, respectively. Calculation of the equivalent diameter revealed an expected mean pore size of 261.5 ± 9.0 μm, which lies within the range shown to promote good bone ingrowth [2]. Confocal and SEM images (Fig. 1b and c and d) corroborated the presence of a micro-scale roughness pattern within the pores. Such roughness is desired for osseointegration, as improved cellular adhesion has been demonstrated in previous research [6,7].

The study of the porosity was completed by M-CT, revealing a P_T of 40.8 ± 11.4% and D_{eq} of 240.3 ± 6.4 μm. These results could be compared to those obtained by other techniques, such as IA and Archimedes' Method, showing similar values (P_T of 48.7 ± 1.9%, D_{eq} of 261.5 ± 9.0 μm and P_T of 45.9 ± 0.2%, respectively) [32]. The total porosity obtained by the different methods was slightly lower than the employed spacer fraction, due to two possible factors: a) remaining spacer that was not removed, and/or b) contraction of the pores during the sintering process. The absolute porosity values for both (2D and 3D) image analyses were very similar to the nominal values and greater than those from the Archimedes' method. This can be related to the fact that the IA technique does not identify non-interconnected pores while Archimedes' does, even considering not only the internal, but also the total porosity.

The micro-scale roughness pattern found in Fig. 1 can be measured using M-CT analysis. Fig. 2a shows the roughness volume percentage of the eroded pore compared to the virtually smoothed pore in dependence of the pore equivalent diameter extracted from the tomographic analysis as proposed by Yin et al. [33]. This value allows quantification of the inner surface roughness inside the pore surfaces, showing roughness volume percentages of 5–10% in the range of 150–350 μm equivalent diameter, which comprises most of the pores. Furthermore, the total inner surface of the pores was determined to be 10.7 mm²/mm³ by analyzing local deviations of the gray values perpendicular to the contour line (yellow line) within a search distance of 20 μm as shown in Fig. 2b and Table 1. This data indicates moderate roughness within the pores promoting improved osteoblast adhesion, as the authors have previously reported [6,7]. Such works discuss the relationship between the roughness of the pores and the adhesion of osteoblasts. In this way, aspects related to the roughness and the improvement of cellular adhesion, cicatrization and osseointegration of the implant are considered, since they imply a decrease in infections related to bacteria. Besides, pore roughness allows for better osteoblast attachment. Therefore, for the same reasons, bacteria attach more to rougher pores better than flat and polished surfaces.

Regarding the mechanical behavior of the porous substrate, the ultrasound test measured a dynamic Young's modulus (E_d) of 22.8 ± 0.2 GPa, and the compression test returned a compression Young's modulus (E_c) of 23.1 ± 1.0 GPa, and yield strength (σ_y) of 118 ± 14 MPa. These values align well with the measured values of cortical bone tissue (20–25 GPa and 150–180 MPa, respectively) [34,35]. This fact shows one advantage of using porous substrates compared to fully dense specimens, whose mechanical properties are far from those of cortical bone tissue [32]. Thus, the fabrication of porous substrates using the space holder technique produces titanium substrates with a biomechanical and biofunctional balance. However, the micro-hardness of porous titanium depends on many factors: chemical composition, structure, grain size, presence of defects, etc. The effect of the applied load and its relationship with local phenomena should also be considered. For that purpose, two load levels to evaluate the micro-hardness of the porous substrates were applied. Microhardness values for fully dense substrates showed higher values for HV0.3 (377 ± 39) than for HV1 (342 ± 16). This fact could be related to the localized microplasticity phenomena and indentation size effects.

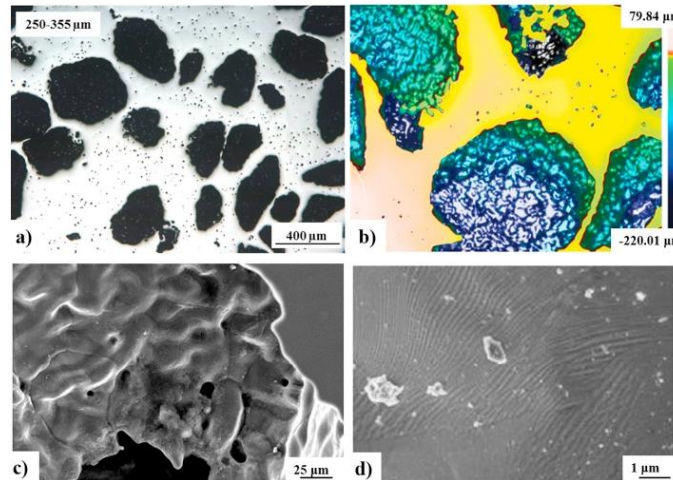


Fig. 1. a) Optical microscopy image of a porous c.p. titanium substrate, b) confocal images of a porous titanium substrate, and c) and d) SEM micrographs of the inside of a pore and micro-roughness pattern of the surface, respectively.

The micro-hardness for low loads is HV0.3 of 356 ± 25 for porous substrates, similar to that of fully dense samples, due to the titanium matrix remaining between the pores being sufficiently large (no porosity influence). However, for higher applied loads (HV1), the values of porous substrates decrease (HV1 of 152 ± 28), showing the effect of the pore presence in micro-mechanical behavior.

3.2. Bacterial adhesion and growth

The bacteria concentration of the medium could influence medium-substrate interactions. Fig. 3 shows the number of CFU in the three solutions (reference, and those containing the titanium discs) and after the incubation period (1 h at 37 °C). This graphic corresponds to Protocol 1 described above (P1), quantifying the number of bacteria in the solution. It can be observed that: 1) in general both types of substrates inhibit the increase of bacteria in the medium, 2) the decrease of CFU in the solution is greater for fully dense titanium substrates and lower concentrations, and 3) the substrate influence is neglected for higher solution concentrations.

The results from the bacteria protocol 2 revealed that there is no adhesion or bacterial growth onto both fully dense and porous titanium substrate flat surfaces. The flat surface corresponds to the polished titanium matrix surface that remains among all the pores.

Fig. 4 summarizes *E. coli* presence inside the pores of the titanium substrate. Fig. 4a) presents experimental data in absolute values,

Table 1
Parameter extracted from the M-CT analysis.

Parameter	Values	
Total porosity (%)	40.8 ± 11.4	
D _{eq} (μm)	240.3 ± 6.4	
Surface/volume (mm ² /mm ³)	10.7 ± 0.8	
Estimated	Flat area (mm ²)	59.9 ± 17.5
	Porous area (mm ²)	260.2 ± 29.6
	Volume (mm ³)	24.3 ± 0.9

whereas Fig. 4b) shows the data normalized by the inner pore surface. In contrast to protocol 2 (no bacteria presence on the polished flat surface), there are bacteria inside the pores. This fact could be related to the roughness pattern of the porous surface. Similar trends have been reported for osteoblasts [6,7]. Furthermore, the probability of bacteria getting inside the pores is larger as there are more bacteria in the medium. Despite the absolute value of bacteria inside the pores being remarkable, once the value is normalized with respect to the inner pore surface, it is relatively insignificant.

In terms of MRSA and *P. aeruginosa*, similar results were obtained, corroborating that the pores present promote bacterial proliferation. The graphics (Fig. 5a and b) show the results obtained for -1 dilution, due to the levels of bacteria proliferation that were non quantifiable for 0 dilution (CFU were non countable).

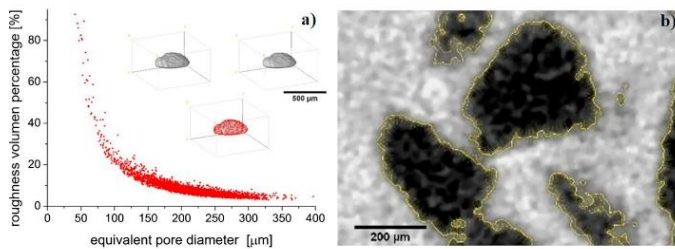


Fig. 2. Micro-tomography analysis showing: a) the roughness volume percentage over the equivalent pore diameter for the porous substrate (inset: a rippled pore, the smoothed one and the volume difference marked in red), and b) a sample slice showing the method for roughness recognition (yellow lines) for extracting the total inner pore surface area. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Bacterial behavior on coated porous titanium substrates for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 357 (2019) 896–902

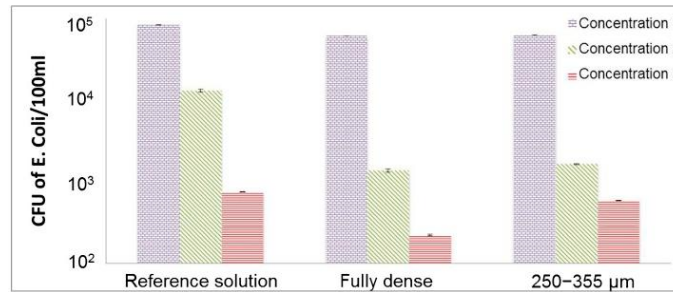


Fig. 3. *E. coli* CFU after membrane filtration (protocol P1).

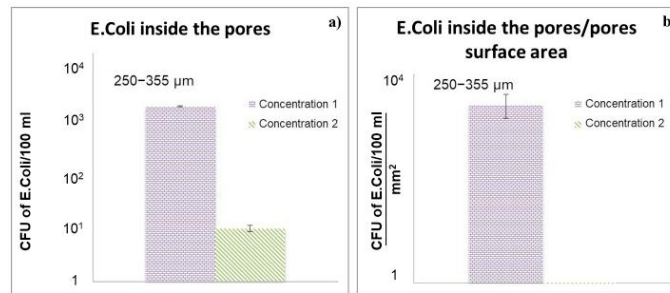


Fig. 4. The total number of *E. coli* inside the pores of titanium substrates (Protocol 3).

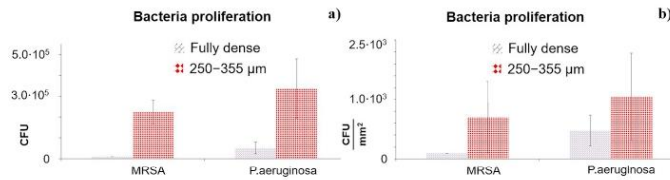


Fig. 5. Bacterial behavior for different *P. aeruginosa* and MRSA bacteria concentrations on titanium substrates: a) total value and b) normalized.

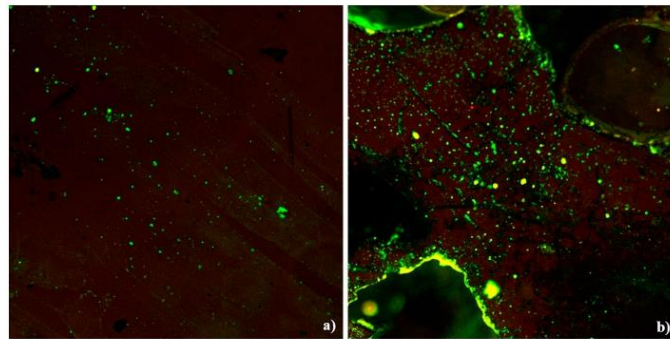


Fig. 6. Live/dead assay for MRSA in: a) full dense and b) porous titanium substrates. SYTO 9 stained live cells green and propidium iodide stained dead cells red. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

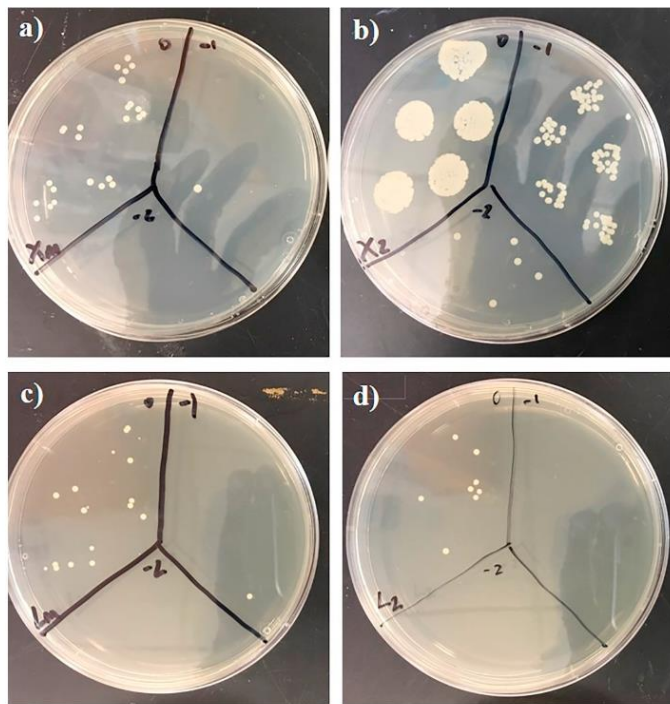


Fig. 7. Agar plates with CFUs of MRSA for: a) non-coated full dense, b) non-coated porous, c) coated full dense and d) coated porous titanium substrates.

Comparing both bacteria types, *P. aeruginosa* presented a higher level of proliferation than MRSA for both substrates (Fig. 5), being that both colonies were always higher on porous substrates. The reason is that the titanium flat surface reduced bacteria growth, but the pore walls present a roughness pattern that enhances bacteria growth [6,7]. In addition, a slight increase in CFU levels at a -1 dilution (10^3) was observed for both bacteria types compared to a -2 dilution (10^2), while for the porous samples, the results were the opposite. This could be explained by two reasons: first, the growth rate is higher for lower bacteria concentrations in the media, achieving a stationary state. Otherwise, higher bacteria concentrations imply that the bacteria crowd the cavities, being more difficult for the penetration inside the pore. The initial concentration (0 dilution, 10^4) presented very high and no quantifiable levels of CFU, so they were not presented in the graphic. In terms of absolute and normalized values, the trend is similar to the *E. coli* results discussed above (see Fig. 4).

Fig. 6 shows the live/dead assay of MRSA for both fully dense and porous substrates, confirming the higher level of attached bacteria in the porous samples in comparison to the full dense sample (green points). The high bacteria density on the surface and pore limits is remarkable (Fig. 6b).

After coating the substrates with SPEEK, the bacteria proliferation slightly decreased on the full dense substrates, while for porous samples the growth was almost inhibited (Fig. 7). The CFUs values for the fully dense and porous substrates at 0 dilution were $2.5 \cdot 10^3$ and $1.5 \cdot 10^3$ respectively, very low compared to substrates without a coating (non-quantifiable levels). Furthermore, no proliferation was observable for a -1 dilution. It is worth mentioning that the thickness of the coating has not been yet measured, but it should be satisfactory due to the

high infiltration ratio of such porous substrates, as it has been already demonstrated for other coatings in similar substrates (PEEK/chitosan, bioglass/chitosan, hydroxyapatite/bioglass, etc.) [36,37]. Future work will be focused on a thorough study to determine the relationship between the thickness of the coating and its antibacterial properties.

These results could be attributed to two main situations and/or the combination of them: On the one hand, the coating covered the pores, avoiding bacteria penetration inside them, so they attach to the walls. In this case, the osseointegration could be decreased, due to the coating also inhibiting bone in-growth. Nevertheless, the biomechanical equilibrium will not be affected in terms of mechanical properties since only the surface pores could be plugged. On the other hand, sulfates could inhibit bacteria showing a sterilizing ability. For future work, it would be interesting to analyze the change in surface energy when using the coating, which could change initial protein adsorption inhibiting bacteria.

4. Conclusions

Here, the fraction and equivalent diameter of the pores solved the biomechanical (stiffness and yield strength) and biofunctional (bone in-growth) equilibrium, being a potential biomaterial for medical applications. Two simple and detailed methods are proposed and validated to study the titanium surface and pores to influence bacterial proliferation. The titanium substrates almost inhibited *E. coli* growth compared to the porous surfaces. The bacterial activity was greater in the porous samples as a consequence of increased surface area provided by the presence of interconnected pores with rough walls (higher contact area). This behavior was observed for three different types of

Bacterial behavior on coated porous titanium substrates for biomedical applications

C. Domínguez-Trujillo et al.

Surface & Coatings Technology 357 (2019) 896–902

more common bacteria (*E. coli*, MRSA, and *P. aeruginosa*). In addition, the implementation of a surface treatment consisting of a sulfonated polymer coating reduced bacteria growth, with the MRSA proliferation inhibited for both types of titanium samples. This is a very economical antibacterial solution. Future work will focus on the study of different bacteria behavior by diverse techniques. In addition, a deeper characterization of the SPEEK coating will be performed to understand its behavior related to bacteria proliferation as well as osteoblast growth, and to optimize the parameters related to this particular coating.

Acknowledgments

The authors dedicate this paper to the memory of Prof. Juan José Pavón Palacio (University of Antioquia, Colombia). This work was supported by the Junta de Andalucía-FEDER (Spain) through the Project Ref. P12-TEP-1401 and of the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain under the grant MAT2015-71284-P. The authors would like to thank technician J. Pinto for assistance in micro-mechanical testing.

References

- [1] J.Y. Rho, R.B. Ashman, C.H. Turner, *J. Biomech.* 26 (1993) 111, [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(93\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0021-9290(93)90042-0).
- [2] Y. Torres, J.J. Pavón, I. Nieto, J.A. Rodríguez, *Metallurgical and materials transactions B—process metallurgy and materials processing, Science* 42 (2011) 891.
- [3] Y. Torres, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez, *J. Mater. Process. Technol.* 212 (2012) 1061.
- [4] B. Arifvianto, J. Zhou, *Materials* 7 (2014) 3588, <https://doi.org/10.3390/ma7053588>.
- [5] K. Palka, R. Pokrowiecki, *Adv. Eng. Mater.* 20 (2018) 1700648, <https://doi.org/10.1002/adem.201700648>.
- [6] Y. Torres, J.A. Rodríguez, S. Arias, M. Echeverry, S. Robledo, V. Amigo, J.J. Pavón, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 6565, <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6586-9>.
- [7] S. Munoz, J.J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A. Civantos, J.P. Allain, Y. Torres, *Mater. Charact.* 108 (2015) 68, <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2015.08.019>.
- [8] C. Díaz, M.C. Cortizo, P.L. Schilardi, S.G. Gómez de Saravia, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, *Mater. Res.* 10 (2007) 11.
- [9] L. Safinia, A. Mantalaris, A. Bismarck, *Langmuir* 22 (2006) 3235, <https://doi.org/10.1021/la051762g>.
- [10] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Kokubo, T. Nakamura, *Biomaterials* 27 (2006) 5892, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.013>.
- [11] A.C. Jones, C.H. Arns, A.P. Sheppard, D.W. Hutmacher, B.K. Milthorpe, M.A. Knackstedt, *Biomaterials* 28 (2007) 2491, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.046>.
- [12] R. Moreno-Atanasio, R.A. Williams, X.D. Jia, *Particology* 8 (2010) 81, <https://doi.org/10.1016/j.partic.2010.01.001>.
- [13] E. Maire, P.J. Withers, *Int. Mater. Rev.* 59 (1) (2014), <https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000023>.
- [14] L. Zhao, H. Wang, L. Cui, W. Zhang, H. Ni, Y. Zhang, Z. Wu, P.K. Chu, *Biomaterials* 32 (2011) 5706, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.040>.
- [15] L. Cheng, M.D. Weir, H.H. Xu, J.M. Antonucci, A.M. Kraigsley, N.J. Lin, S. Lin-Gibson, X. Zhou, *Dent. Mater.* 28 (2012) 561, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.01.005>.
- [16] A.G. Rodríguez-Hernández, E. Engel, F.J. Gil, *Biomecánica* 17 (2009) 36.
- [17] J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 295, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.017>.
- [18] A. Bassegoda, K. Ivanova, E. Ramon, T. Tzanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 2075, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8776-0>.
- [19] K.C. McGivray, E.I. Waldorff, J. Easley, H.B. Seim, N. Zhang, R.J. Linovitz, J.T. Ryaby, C.M. Puttlitz, *Spine J.* 17 (2017) 1907, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2017.06.034>.
- [20] C. Shuai, C. Shuai, P. Feng, C. Gao, S. Peng, Y. Yang, *Polymers* 10 (2018) 328, <https://doi.org/10.3390/polym10030328>.
- [21] L. Zhao, H. Wang, K. Huo, L. Cui, W. Zhang, H. Ni, Y. Zhang, Z. Wu, P.K. Chu, *Biomaterials* 32 (2011) 5706, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.040>.
- [22] M. Moritz, M. Geszke-Mortitz, *Chem. Eng. J.* 228 (2013) 596, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.046>.
- [23] S.A. Yavari, L. Loosen, F.L. Paganelli, S. Bakhshandeh, K. Lietaert, J.A. Groot, A.C. Fluit, C.H.E. Boel, J. Alblas, H.C. Vogely, H. Weinans, A.A. Zadpoor, *Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 17080, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03152>.
- [24] B. Yuan, Q. Cheng, R. Zhao, X. Zhu, X. Yang, X. Yang, K. Zhang, Y. Song, X. Zhang, *Biomaterials* 170 (2018) 116, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.014>.
- [25] S. Wu, X. Liu, K.W.K. Yeung, C. Liu, X. Yang, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 80 (2014) 1, <https://doi.org/10.1016/j.msre.2014.04.001>.
- [26] Q. Xue, X. Liu, Y. Lao, L. Wu, D. Wang, Z. Zuo, *Biomaterials* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.008> in press.
- [27] ASTM C373-14, Standard test method for water absorption bulk density, Apparent Porosity and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products, 2014.
- [28] F. Garcia-Moreno, M. Fromme, J. Banhart, *Adv. Eng. Mater.* 6 (2004) 416.
- [29] ISO 13314:2011, Standard for Mechanical Testing of Metals — Ductility Testing — Compression Test for Porous and Cellular Metals.
- [30] UNE-EN ISO 9308-1 Water Quality. Detection and Enumeration of *Escherichia coli* and Coliforme Bacteria. Part 1: Membrane Filtration Method.
- [31] ISO 11737-1:2018 Preview Sterilization of health care products – Microbiological methods – Part 1: Determination of a Population of Microorganisms on Products.
- [32] C. Domínguez-Trujillo, F. Ternero, J.A. Rodríguez-Ortiz, J.J. Pavón, I. Montealegre-Meléndez, C. Arévalo, F. García-Moreno, Y. Torres, *Surf. Coat. Technol.* 338 (2018) 32, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.01.019>.
- [33] X.-Z. Yin, T.-Q. Xiao, A. Nagia, S. Yang, X.-L. Lu, H.-Y. Li, Q. Shao, Y. He, P. York, J.-W. Zhang, *Nat. Sci. Rep.* 6 (2016) 24763, <https://doi.org/10.1038/srep24763>.
- [34] E.W. Collins, *The Physical Metallurgy of Titanium Alloys*, ASM, Metals Park, Ohio, 1984.
- [35] J. Currey, J.H. Black (Ed.), *Handbook of Biomaterials Properties*, Springer-Verlag, Garth, London, 1998.
- [36] S. Clavijo, F. Membrived, G. Quiroga, A.R. Boccaccini, M.J. Santillán, *Ceram. Int.* 42 (2016) 14206, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.05.178>.
- [37] S. Seuss, M. Heinloth, A.R. Boccaccini, *Surf. Coat. Technol.* 301 (2016) 100, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.03.057>.

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174



Contents lists available at ScienceDirect

Surface & Coatings Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/surfcoat



Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration



Ana Civantos^{a,b,c,*}, Cristina Domínguez^d, Raisa Juliana Pino^e, Giulia Setti^e, Juan José Pavón^e, Enrique Martínez-Campos^{c,f}, Francisco Jose Garcia Garcia^g, José Antonio Rodríguez^d, Jean Paul Allain^{a,b,h}, Yadir Torres^d

^a Department of Nuclear, Plasma and Radiological Engineering, College of Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

^b Micro and Nanotechnology Laboratory, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

^c Tissue Engineering Group, Institute of Biofunctional studies, Complutense University of Madrid, Associated Unit to the Institute of Polymer Science and Technology (CSIC), Polymer Functionalization Group, Spain

^d Department of Engineering and Materials Science and Transportation, University of Seville, Seville, Spain

^e Group of Advanced Biomaterials and Regenerative Medicine, Bioengineering Program, University of Antioquia, Colombia

^f Polymer Functionalization Group, Department of Applied Macromolecular Chemistry, Institute of Polymer Science and Technology, CSIC, Madrid, Spain

^g Department of Inorganic Chemistry and Chemistry engineering, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUIQFN, University of Cordoba, Spain

^h Department of Bioengineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Porous titanium
Surface modification
Etching
Biomimetic scaffolds
Trabecular bone
Osseointegration

ABSTRACT

Titanium implant failures are mainly related to stress shielding phenomenon and the poor cell interaction with host bone tissue. The development of bioactive and biomimetic Ti scaffolds for bone regeneration remains a challenge which needs the design of Ti implants with enhanced osseointegration. In this context, 4 types of titanium samples were fabricated using conventional powder metallurgy, fully dense, dense etched, porous Ti, and porous etched Ti. Porous samples were manufactured by space holder technique, using ammonium bicarbonate particles as spacer in three different ranges of particle size (100–200 μm, 250–355 μm and 355–500 μm). Substrates were chemically etched by immersion in fluorhydric acid at different times (125 and 625 s) and subsequently, were characterized from a micro-structural, topographical and mechanical point of view. Etched surfaces showed an additional roughness preferentially located inside pores. In vitro tests showed that all substrates were biocompatible (80% of cell viability), confirming cell adhesion of preosteoblastic cells. Similarly, osteoblast showed similar cell proliferation rates at 4 days, however, higher cell metabolic activity was observed in fully dense and dense etched surfaces at 7 days. In contrast, a significant increase of alkaline phosphatase enzyme expression was observed in porous and porous etched samples compared to control surfaces (dense and dense etched), noticing the suitable surface modification parameters (porosity and roughness) to improve cell differentiation. Furthermore, the presence of pores and rough surfaces of porous Ti substrates remarkably decreased macrophage activation reducing the M1 phenotype polarization as well M1 cell marker expression. Thus, a successful surface modification of porous Ti scaffolds has been performed towards a reduction on stress shielding phenomenon and enhancement of bone osseointegration, achieving a biomechanical and biofunctional equilibrium.

1. Introduction

Titanium (Ti) and some of its alloys are well recognized as the clinical grade metallic biomaterial with the best prognostic for bone replacement. However, the major issues associated with titanium implants failures are related to stress shielding phenomenon and lack of

osseointegration. [1–3]. Many research studies have reported the biomechanical mismatch between Ti implants and the surrounding bone tissue, highlighting the higher elastic Young's modulus of Ti as the main cause associated with bone resorption and weakening of implants area. Under these circumstances, the implant may suffer micro-loosening and further combined with poor osseointegration will finally be rejected

* Corresponding author at: 1306, Micro and Nanotechnology laboratory, 104 South Wright Street, Urbana, IL 61801, USA.
E-mail address: ancife@illinois.edu (A. Civantos).

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.03.001>

Received 20 January 2019; Received in revised form 27 February 2019; Accepted 1 March 2019

Available online 05 March 2019

0257-8972/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

from the body [4].

Many efforts have been developed to create bioactive scaffolds with similar mechanical properties as bone tissue. Indeed, porous metallic biomaterials have become an interesting approach to reduce the stress shielding effect and to improve long-term fixation of Ti devices [4,5]. The porosity factor has been described before as a strategy to reduce the stress shielding effect due to reproducing similar stiffness and Young's modulus as native bone tissue. Several manufacturing techniques enable porous titanium scaffolds fabrication, such as freeze casting [6,7], rapid prototyping [8,9], laser processing [10,11], electric sintering [12–14], and powder metallurgy [15,16]. Unfortunately, many of those methodologies are complex processes and expensive, leaving toxic residues compromising their use in tissue reconstruction applications. Powder metallurgy technology has been used with space holder (SH) particles offering an easy and scalable method to fabricate highly random interconnected pores with suitable mechanical properties [17,18]; The interconnected pores are key factor in the development of healthy bone tissue since pores allow the required irrigation of blood and nutrients to feed the bone tissue in-growth. This SH technique has shown the advantage to control the space volume fraction which allows tailoring similar pore density and structure as cortical bone [16,19]. Earlier work showed similar Young's modulus values on porous samples (20–28 GPa) as those of cortical bone (25 GPa) using a variation in type and percentage of space holder [20,21] during processing. Although for bone regeneration certain stiffness and mechanical properties are required, according to literature, a pore size between 100 and 500 μm enhances vascularization process promoting tissue bone in-growth [22,23]. In addition, other studies also demonstrated that the pores generated by this space holder technique yielded intrinsic surface roughness along pore walls, improving the cell adhesion process and inhibiting bacteria attachment [24,25]. However, the increment of porosity may reduce the mechanical properties and compromise the internal stability of the implant which in turn can negatively affect in-vivo tissue reconstruction. In this context, the control of parameters such as pore size, pore volume fraction and pore morphology, as well as surface roughness are key factors to guarantee biomechanical and biofunctional stability with an enhancement in the osseointegration response in living bone tissue [26,27].

On the other hand, the inert biological character of titanium surfaces may lead low levels of cell interactions at the bio interface. This poor integration may delay or even impair the proper reconstruction of the damaged bone tissue, driving to the failure of the implant [28]. For this reason, it is essential to develop bioactive and biomimetic titanium surfaces, to promote the adhesion and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, osteoblast, macrophages, and osteoclast recovering the required bone homeostasis [29].

Particularly, the implantation of any biomaterial implies an immune host response leading by the action of macrophages which are the first cell line in the immune response process [30]. As any biomaterial, Ti scaffolds triggers an inflammatory response, which usually is resolved in several days once the implant is integrated by the organism. In some scenarios, this initial inflammation may endure several weeks, evolving to a chronic inflammation response by encapsulating the Ti implant [31,32]. This fibrotic capsule isolates the metallic device within a thin layer of fibrous tissue, which reduces cellular interactions with native bone tissue and promotes bacterial infections. This complex and well-orchestrated reaction also referred to as foreign body reaction (FBR) is driven by macrophages, one of the first immune cells which arrive at the implantation area [33–35]. These immune cells are exposed to multiple signals (biophysical and chemical cues from both implant surface and the surrounding tissues). Depending on the integration of these signals, macrophages become activated exhibiting a wide spectrum of polarization states [36]. At either end of such a spectrum, M1 is commonly referred to pro-inflammatory phenotype and M2 to anti-inflammatory. Each M1 and M2 phenotypes show specific features, such as different cell surface markers, expression of particular genes; and

secretion of specific cytokines, chemokines, and enzymes, as well as different cell shape [35].

Some reports have shown the importance of surface modification to successfully control macrophages response and enhance osteoblast cell differentiation [34,37,38]. Hence, surface treatments of porous Ti implants have been developed with the aim of controlling the inflammatory reaction and promoting cell differentiation by enhancing the biological interactions at the bio-interface. Chemical surface modification among other treatments such anodic reaction, hydrogen peroxide, sol-gel, chemical vapor deposition, has contributed to the microtopography by increasing the roughness and the surface free energy, being both essential factors that affect cellular processes such as protein adsorption, cellular adhesion, migration, and differentiation [39]. However, it should be pointed out the great value of nanoscale order in the surface modification role to control cells behavior and develop biomimetic surfaces is still under research by some authors of this group (Civantos and Allain) which are working on the novel nanopatterning of porous titanium scaffolds.

As pointed out above, there is some evidence showing the benefits of porous and rough Ti surfaces in implant fixation and long-term stability [1,37]. Nevertheless, their combined effect has been poorly understood and their interactions with different cellular lineages have not been evaluated before with the aim to reproduce a bone in vitro environment. Under this premise, the hypothesis in this work, based on the controlled chemical etching modification of designed porous Ti disks, will be a biomimetic and bioactive strategy to reestablish bone homeostasis and support faster osseointegration. The mechanical properties and surfaces topography, such as porosity (pore size, shape, and distribution) and roughness profile, were characterized to evaluate their influence on preosteoblast, osteoblast and macrophage behavior. This study reveals a porous surface treatment as a successful approach to activate the porous Ti scaffolds which will enhance the osseointegration and fixation in bone tissue.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of porous and rough titanium samples

The blends of medical grade IV c.p. Ti were supplied by SE-JONG Materials Co. Ltd. (Korea). Porous c.p. Ti samples were obtained by mixing 50% c.p. Ti powder grade IV according to ATM F67-00 [40], and 50% of ammonium bicarbonate (BA) as a space holder, with particle sizes between A: 100–200 μm , B: 250–355 μm and C: 355–500 μm , previously obtained by sieving the spacer. After matrix compaction (800 MPa using a SUZPECAR 600KN), BA particles were removed in an oven in two steps (at 60 °C and 110 °C during 12 h each in low vacuum conditions). Finally, samples were sintered in a ceramic tube under high vacuum conditions (Carbolyte STF 15/75/450) at 1250 °C during 2 h at high vacuum conditions. Subsequently, the chemical etching treatment was performed using hydrofluoric acid (HF, 45%) in distilled water (22 mL/L) and an organic inhibitor (0.5 mL/L). Samples were immersed in the solution at 50 °C during two different times of exposure (125 s and 625 s). The etching times were chosen according to previous work by the authors [41]. Finally, the etched substrates were sonicated in distilled water and ethanol. From now on, the samples will have a reference name which is D0 for fully dense and non-etched surface (equivalent of 0 s of etching treatment); D125 and D625 for dense surfaces with 125 and 625 s of etching treatment. PA0, PB0, and PC0 correspond to porous substrates with pore size of 100–200 μm (A), 250–355 μm (B), and 355–500 μm (C) with no etching treatment, respectively. PA125, PB125 and PC125, are the reference for porous samples with pore size of 100–200 μm (A), 250–355 μm (B), and 355–500 μm (C) and 125 s of etching treatment. PA625, PB625 and PC625 correspond to porous substrates with the ranges of pore size (100–200 μm (A), 250–355 μm (B), and 355–500 μm (C)) which were modified during 625 s of etching.

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

A. Civantos, et al.

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174

2.2. Titanium samples characterization

The surfaces of non-porous or fully dense (D0), dense and etched (D125 and D625), porous (PA0, PB0, and PC0) and porous and etched Ti samples (PA125, PA625, PB125, PB625, PC125 and PC625) were evaluated in relation to porosity parameters. Porosity index was measured following ASTM C373-88 by Archimedes' method, evaluating the density ($\Delta\rho$), total porosity (Pt), and interconnected porosity (Pi) [42]. The porosity structure, total porosity (Pt) and equivalent diameter (Deq), was studied by image analysis (IA), using a metallographic optic microscope NIKON EPIPHOT coupled to an RGB camera JENOPTIK PROGRESS C3. Images were analyzed by the software IMAGE-PRO PLUS 6.2. In terms of surface topography, a scanning electron microscopy (SEM, JSM-6490LV, Jeol, Japan), was performed at different magnifications. Confocal laser microscopy (Sensofar S Neox), was employed to quantify the surface roughness, at the flat area and inside the pores.

In terms of macro-mechanical behavior, the non-etched and etched substrates were submitted in the uniaxial compression test (Instron 5505 universal testing machine) [43–46], in order to evaluate the Young's modulus (E) and the yield strength (σ_y) before and after the chemical etching. Additionally, substrates were characterized by dynamic Young's modulus (Ed) using ultrasound technique (KRAUTKRAMER USM 35 equipment) [47,48]. Otherwise, the micro-mechanical behavior was studied by Vickers micro-indentation at two different loads (HV0.3 and HV1), measuring 10 times per substrate type and load condition.

2.3. Cell culture

All these experiments were carried out in the facilities of Tissue Engineering Group (UCM). Ti samples were sterilized by autoclave at 121 °C for 30 min and then carefully placed into 24 well-plates (Corning Costar). Then, cells were seeded onto the Ti substrates at different cell densities, depending on the cellular experiment. These experiments were performed in triplicate, and fully dense titanium (D0), without pores and no chemical treatment, was used as the control sample.

2.3.1. C2C12-GFP cell line

To study the cell biocompatibility of titanium samples, C2C12 pre-mioblast mouse cell line, from American Type Culture Collection, (ATCC® CRL-1772™), was used. These adherent cells, previously transfected with a lentivirus to introduce green fluorescent protein (GFP) for expressing constitutively fluorescence, were cultured using DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich), completed with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of Penicillin/streptomycin (100 U/mL, Invitrogen, Germany). For adhesion and proliferation studies, cells were seeded at an initial density of 10,000 cells/cm² during 24 and 96 h of incubation.

2.3.2. RAW 264.7 cell line

A mouse macrophage cell line, RAW 264.7 cells, (ATCC® TIB-71™), was used as a polarization model to evaluate the immune response induced by Ti substrates. RAW 264.7 cells were maintained in an undifferentiated state using Dulbecco's MEM (D6429, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), completed with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of Penicillin/streptomycin (100 U/mL, Invitrogen, Germany). Cell passages were performed at 80% of cell confluence in 75 cm² using cell scrapers. Immune response experiments were run after 48 h of cell seeding at a density of 10,000 cells/cm².

2.3.3. MC3T3-E1 cell line

MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell line (ATCC CRL-2593), was employed to reproduce the bone tissue environment. This cell line is a suitable model for studying osteoblastic in vitro differentiation. The subculture routing was performed in MEM (Minimum essential

medium, Sigma Aldrich, Germany), completed with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of Penicillin/streptomycin (100 U/mL, Invitrogen, Germany) and culture flasks were placed in a humid atmosphere with 5% CO₂ and at 37 °C. For differentiation and mineralization cell studies, culture media was enriched with β -glycerophosphate (50 mM), Ascorbic acid (10 mM) and Dexamethasone (10 nM), seeding 5000 cells/cm² (changing media every two-three days) and analyzing at 7 and 14 days, respectively.

2.4. Cell adhesion and proliferation assays

Attachment and proliferation of C2C12-GFP were analyzed by inverted fluorescence microscopy (Olympus IX51) and CellD Software (Olympus). Cell metabolic measurement was measured to evaluate the cell adhesion on day 1. To that end, AlamarBlue assay (DAL1100, ThermoFisher, USA) was performed following the manufacturer's instructions. Assays were carried out by triplicate for each sample condition. This non-toxic and scalable method uses the natural reducing power of living cells, generating a quantitative measure of cell viability and cytotoxicity. Briefly, samples previously seeded with cells were placed in new 24-well plates and added 10% of the culture volume of AlamarBlue dye. After 90 min of incubation, fluorescence signal, with an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm, was read in a microplate reader (Synergy HT, Biotek). Cell adhesion experiments were evaluated at 1 day and proliferation studies at 4 and 7 days for C2C12-GFP and MC3T3E1 respectively.

2.5. Cellular morphology evaluation

For each culture time point, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) solution during 15 min. Afterward, titanium samples were rinsed carefully with PBS twice and permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100. Subsequently, samples were washed with PBS and the actin cytoskeleton was stained with Texas Red®-X phalloidin (Molecular Probes), for 20 min at room temperature (RT) and in darkness. As a contrast marker, cell nuclei were stained using Hoechst (Invitrogen, Molecular Probes). Samples were observed using an inverted fluorescence microscope (Olympus IX51) with a TRICIT filter ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 550/600 nm) for Actin, and DAPI filter for Hoechst ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 380/455 nm) and images were treated by CellD analysis software (Olympus).

2.6. Immunocytochemistry for immune response analysis

CCR7, a cell surface marker, was studied using immunocytochemistry in order to evaluate RAW 264.7 M1 phenotype polarization. Cultured macrophages were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at RT and incubated overnight in a blocking solution (5% Normal Donkey Serum; 0.3% Triton X-100 in 1 × PBS) at 4 °C. After blocking non-specific staining, primary antibodies were added, rat anti-CCR7 for M1 specificity (12 μ g/ml, R&D Systems, MN) at 4 °C, overnight. Finally, cells were incubated with secondary antibody, Alexa Fluor 350 goat anti-rat IgG (7 μ g/ml, Thermo Fisher Scientific, MA) for 2 h at RT for CCR7. The visualization of the fluorescent-labeled cells was performed in an inverted fluorescence microscope (Olympus IX51) with a TRICIT filter ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 547/572 nm) using CellD analysis software (Olympus).

2.7. Cell differentiation: ALP measurement

The detection of alkaline phosphatase (ALP) activity was used as an indicator of pre-osteoblastic MC3T3 differentiation towards osteogenic lineage. After 7 days of culture, samples were washed twice with PBS (500 μ L), and 100 μ L/well of lysis buffer (50 mM Tris pH 6.8, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂) was added. Cell lysates (20 μ L) were plated in a 96 well plate and ALP measurement was assayed using 100 μ L of p-

nitrophenyl phosphate in 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (100 µL/well). After 30 min of incubation at 37 °C in dark conditions, the reaction was stopped using NaOH 0.5M (100 µL/well), and the absorbance at 450 nm was read using a microplate reader (Synergy HT, Biotek).

2.8. Cell mineralization: alizarin red assay

At day 14, samples with osteoblast cells were fixed using PFA 4%, and subsequently were rinsed with an excess of distilled water (three times). Then, samples stained with Sirius red (Sigma, USA), following manufacturer's protocol. Briefly, samples were washed twice with PBS, stained with 40-mM alizarin S-red staining solution (pH 4.2) and incubated at RT during 20 min. After that, the staining solution was removed, and samples were rinsed with distilled water three times, to finally be identified by microscope (Olympus, BX51).

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Origin Pro software expressing results as mean ± standard deviation. Macrophages and osteoblast experiments were performed in triplicate. Statistical significance was obtained and expressed as *p < 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Preferential etching process inside pores

The presence of pores can promote cellular adhesion on the substrates. In this context, it is important to characterize the sample porosity, in order to study its influence in biological behavior. Non-etched porous substrates (PA0, PB0, and PC0) presented a total porosity (Pt) results, from Archimedes' method and Image Analysis (IA), closed to 50% (criteria design), as shown in Table 1. This result validates the space holder technique as a fabrication process to tailor the desired porosity in Titanium-based substrates. Nevertheless, there are some differences among samples values, being those of IA slightly greater than Archimedes' method ones. The main reason is that IA is focused on the substrate surface while Archimedes' method is a volumetric technique. However, in any case, both methodologies follow the same trend, obtaining greater porosity for bigger ranges of pore size (PC0). It is interesting to mention that the D0 sample also presented a low porosity, showing very small pores (Equivalent diameter, Deq, smaller than 5 µm) as a consequence of the powder metallurgy process. In general, the Deq of pores generated by the spacer particles reached a value

between the range of the spacer particle size, fixed by the design criteria. In terms of interconnected porosity, it is remarkable that almost all pores of porous substrates were interconnected, potentially enhancing the bone in-growth through the implant.

After substrates etching, Pt increases for all samples types, especially at etching time of 625 s (Table 1). It is worth mentioning the ΔPt for PC625 (8.4%), a very high value compared to the rest of substrates. The reason is that pore size is bigger, making it easier for the acid solution to cross the entire sample. Furthermore, the interconnected pores also demonstrated a significant size increase in relation to non-etched substrates (Table 1).

Fig. 1 shows the SEM images of all Ti surfaces including, the macroscopic view in the upper insets. In terms of pore size, in non-modified substrates (PA0, PB0, and PC0) the spacer particles determined the range of pore size during the fabrication process as it is observed in Fig. 1. As expected, increasing Deq of pores, there is a reduced number of pores per area, showing greater Ti matrix between them. In addition, as size of the pores increases, a morphology with higher irregularity is exposed. Higher magnifications of PA0, PB0 and PC0 pores (Fig. 2) revealed some roughness patterns inside the pore walls due to the PM process. These patterns, as well as the presence of pores, results in a greater surface area when compared to D0, and therefore, cells find a higher active surface area to attach.

Once the substrates were chemically etched, the microstructural and mechanical properties also changed, compromising the stability and functional balance of the implant. Visually, it is appreciable that the color of substrates darkens, loosening the polished metal bright (Fig. 1). The substrate topography is also highly modified after the etching within 125 and 625 s, as observed in SEM images of Fig. 1. Fig. 2 presents at higher magnifications the effect of HF on flat surface between pores and inside pores surfaces. It was unexpected the appearance of a new roughness pattern generated during the etching, based on geometrical features on all surfaces, simulating stings (see Fig. S1 of Supporting information and the upper insets in Fig. 3). These features increased in terms of number and size (about 10 to 20 nm) in all porous substrates at 625 s. As expected, etched fully dense surfaces (D125 and D625) presented a lower density of geometrical features compared to porous and etched surfaces. As a result, confocal laser allowed obtaining the main roughness parameters (Sa, Sq and Sz) for all samples (see Table 1).

Regarding roughness values (Sa) corresponding to flat surfaces (shown in Fig. 3 and in detail in the upper insets), 625 s of etching time reached the highest Sa values in PB625 (10.36 µm) and PC625 (9.53 µm) samples compared to their counterparts D625 (5.05 µm) and

Table 1
Pore size distribution and Roughness quantification. The abbreviations and symbols correspond to: Image Analysis (IA), Total porosity (Pt), Interconnected porosity (Pi), Density of total porosity (ΔPt), and Equivalent diameter of pores (Deq). Roughness parameters are Arithmetical mean height (Sa), Root mean square height (Sq) and Maximum height (Sz).

Samples	Time of etching (s)	Archimedes method			IA		Confocal laser					
		Pt (%)	Pi (%)	ΔPt (%)	Pt (%)	Deq (µm)	Flat surface			Pore surface		
							Sa (µm)	Sq (µm)	Sz (µm)	Sa (µm)	Sq (µm)	Sz (µm)
D (fully dense)	0	4.5	3.7	^a	1.2	5.5	0.7	11.0	79.2	^a	^a	^a
	125	7.5	7.4	5.2	^a	^a	4.4	15.2	808.4	^a	^a	^a
	625	6.3	6.0	4.0	^a	^a	5.1	12.9	411.2	^a	^a	^a
PA (100–200 µm)	0	47.0	44.3	^a	50.3	161.1	5.0	9.0	97.6	15.5	22.2	166.7
	125	48.2	42.6	1.2	^a	^a	8.5	17.0	150.7	18.9	26.4	222.1
	625	51.5	46.2	4.5	^a	^a	5.2	14.7	217.1	47.1	60.6	437.9
PB (250–355 µm)	0	46.4	42.0	^a	48.7	261.5	3.4	8.8	147.2	30.8	4.0	274.2
	125	49.4	47.1	3.1	^a	^a	6.0	12.3	232.0	18.3	28.1	395.1
	625	50.8	46.7	4.5	^a	^a	10.4	17.2	295.1	71.7	98.9	717.5
PC (355–500 µm)	0	46.1	41.5	^a	47.1	293.4	0.7	11.0	79.2	26.7	36.0	485.2
	125	48.2	44.3	2.1	^a	^a	3.0	6.4	310.7	39.6	49.5	852.5
	625	54.5	51.3	8.4	^a	^a	9.5	15.8	413.3	47.2	55.9	430.2

^a Not available data due to out of measurable range.

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

A. Civantos, et al.

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174

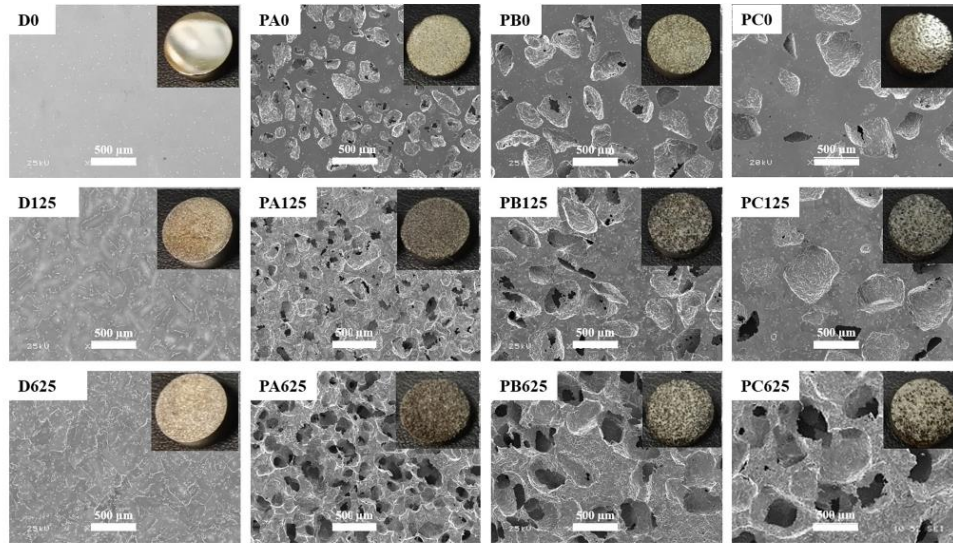


Fig. 1. SEM microphotographs of all c.p.Ti surfaces. Images showed the different surfaces, with and without HF treatment as well the three different pore sizes of space holder (BA). Insets correspond to macroscopic images of the samples revealing the main differences (color and pore size and morphology) of the samples.

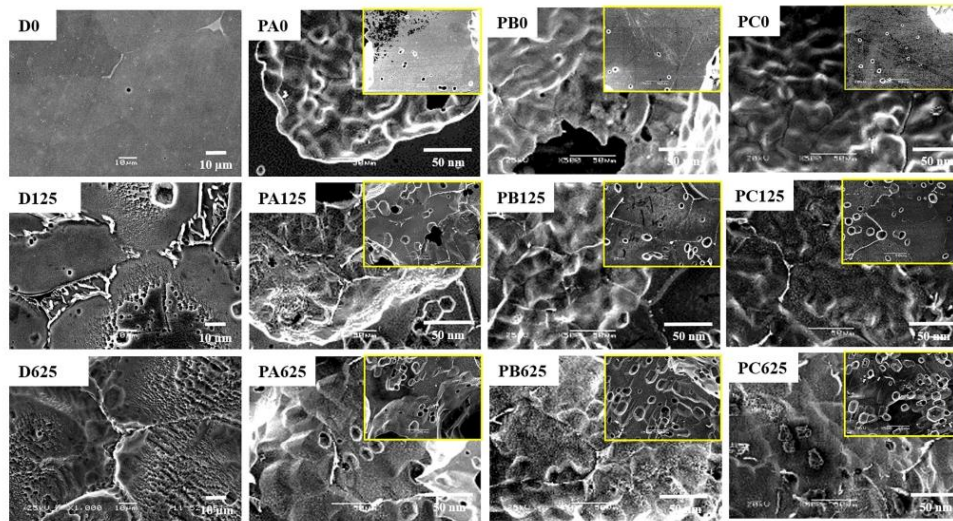


Fig. 2. Pore's detail of cp. Ti samples by SEM. These microphotographs highlight the pores structure and the HF influence as surface modification treatment. Noticed an increased roughness at the microscale order as well as the presence of geometrical features (upper insets) due to HF treatment and PM process respectively.

PA625 (5.23 μm) surfaces. Therefore, the acid treatment presented a stronger effect on bigger pores on flat surfaces. This trend was also observed at pore surfaces, getting a higher modification on PB625 with more pores and bigger size than PA625 samples, followed by PC625, with a lower number of pores but the highest size. In general, the chemical modification achieved a pronounced increase of roughness values, highlighting 625 s as the highest Sa obtained (47.11 μm ,

71.84 μm , and 47.18 μm for PA625, PB625, and PC625 respectively). Therefore, the chemical etching process showed a homogeneous modification with higher affinity for the surface inside pores than outside (flat areas) of the porous and etched samples, which was also correlated with an increment of pore size and pore interconnectivity (see Fig. 1 and S1 of Supporting information). These Sa results were in accordance with the Sa reported by other authors [49–52]. For example, Conrado

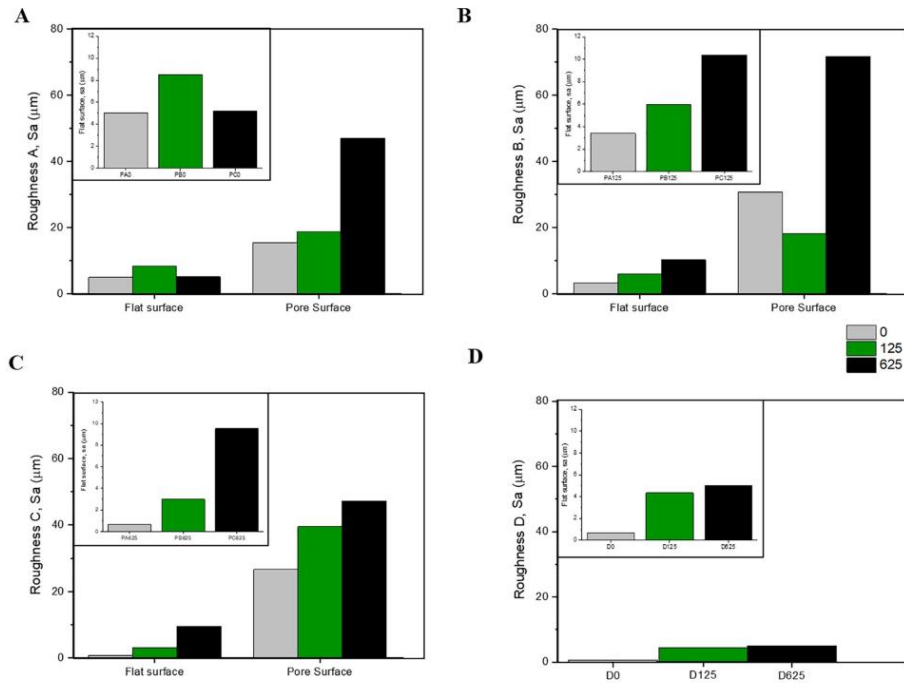


Fig. 3. Roughness quantification, Sa (µm) of c.p.Ti substrates by the analysis of confocal images using Sensomap software. A, B, C, and D correspond to the Sa values comparing flat and pores surfaces of A, B C and D surfaces at the three times of etching modification (0, 125, and 625 s). Upper and left insets showed clearly a bigger scale of flat surfaces. Noticed the higher affinity of chemical attack for pore surfaces which reached higher Sa values.

and coworkers correlated the used of sandblasting treatment to obtain roughness values for Ti flat surfaces of 7 µm (Sa), which indeed promoted an enhancement of osteoblast differentiation [53]. The increase in roughness values by chemical treatment and by anodizing (electrochemical modification) have been correlated to an increased surface area, improving cell adhesion and differentiation process [54,55].

As mention before, the presence of pores reduces Young's modulus of titanium substrates, as well as other mechanical properties, which could compromise the biomechanical equilibrium of implants. In this

context, it is essential to study the macro (uniaxial compression test and US) and micro-mechanical behavior (Vickers micro-hardness). Table 2 shows the Young's modulus (E) and strength yield (σy) for all substrates, as well as dynamic Young's modulus (Ed). All values for non-etched porous substrates (PA0, PB0, and PC0) were close to those of the cortical bone (Young's modulus of 20–25 GPa and mechanical strength of 150–180 MPa), guaranteeing good mechanical behavior. In terms of micro-mechanical behavior, micro-hardness values were higher for HV0.3 than for HV1 for all types of substrate, as a consequence of

Table 2
Mechanical characterization results. Young modulus and microhardness. The abbreviations and symbols correspond to: Strength yield (σy), Young modulus (E), and Dynamic Young modulus (Ed).

Samples	Time of etching (s)	Uniaxial compression test		US	Vickers microhardness	
		σy (MPa)	E (GPa)	Ed (GPa)	HV0.3	HV1
D (fully dense)	0	95	628	101.2	377	342
	125	a	a	a	a	a
	625	a	a	a	a	a
PA (100–200 µm)	0	120	59.5	20.8	401	167
	125	60	30.4	a	a	a
	625	62	26.9	a	a	a
PB (250–355 µm)	0	109	32.6	22.8	356	152
	125	23	28.7	a	a	a
	625	22	47.0	a	a	a
PC (355–500 µm)	0	95	27.7	20.8	350	138
	125	11	14.1	a	a	a
	625	19	22.8	a	a	a

a Not available data due to due to out of measurable range.

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

A. Civantos, et al.

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174

indentation size and localized micro-plasticity phenomena effects. The micro-hardness of porous substrates is closed to that of D for HV0.3 (377), due to the matrix between pores is large enough, having a similar behavior to fully dense substrates. However, while for greater loads (HV1) the D results were similar to that of HV0.3 (342), values decreased because of the pores influence, being lower as pore size increased.

The increase of substrate porosity after chemical etching results in a decrease of mechanical properties due to a slight loss of structural integrity. In general, E decreased for samples after the etching in comparison to non-etched substrates, as a consequence of Pt increased (Table 2). Otherwise, the trend of σ_y depends mainly on pore size, showing lower values as pore Deq is greater. Related to that, it is remarkable that σ_y decrease more drastically for substrates with the biggest pore size (C), due to the acid solution reaching deeper into the porous titanium samples.

3.2. Enhanced cell attachment and proliferation of micro-rough and porous Ti scaffolds

Size, morphology and pore distribution, as well as a surface modification with HF of c.p. Ti samples are considered key factors in cellular response. For that reason, C2C12-GFP, a murine mioblast cell line, was used to evaluate cell viability at 1 day. Fig. 4 showed cell viability results for all c.p. Ti surfaces, expressed in percentage. All substrates reached >80% of cell viability compared to cells growing on D0. Neither BA size and morphology particles nor HF time treatment produced significative differences at p 0.05 level, which means that a short time period, the cell viability was influenced by neither those factors. In addition, the presence of the GFP group allowed tracking the cell culture by inverted fluorescent microscopy. Fig. 5 showed the compiling fluorescence microphotographs of C2C12-GFP cells in adhesion and proliferation states at 1 and 4 days of cell culture. All c.p. Ti surfaces were biocompatible, which allowed the proper cell adhesion and proliferation over time. At day 1, D0 was the only substrate which showed a higher number of attached cells which correlated the increased cell metabolic activity (see Fig. 5A and Fig. 4 respectively). However, at 4 days of cell culture, all surfaces supported similar cell proliferation covering the entire surface and even pore walls (Fig. 5B).

Several studies have reported that the topography, chemistry, and surface energy of metallic-based biomaterials influence the initial adhesion and differentiation of osteoblastic lineage cells. These results agree to those reported in other studies [28,56]. This cell behavior has been evaluated by Chang and co-workers growing mesenchymal stem

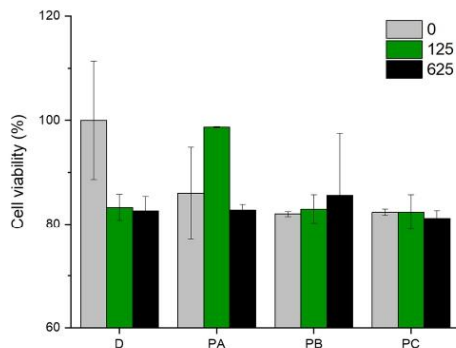


Fig. 4. Cell viability of C2C12-GFP cells at 1 day. Results were expressed as a percentage of D0 levels. All substrates showed similar metabolic activities with no statistical differences ($p \geq 0.05$).

cells onto 70% of porous Ti surfaces. Although the initial attachment was showing low cell density at 24 h, cells could migrate and proliferate increasing cell density at 4 days of incubation [56], similar to results reported here. All samples have shown cytocompatibility with pre-mioblastic C2C12-GFP model. Etched samples showed similar cell density as non-etched, allowing cells to attach and proliferate, and suggesting that neither pore and chemical modification did not diminish cell affinity. In general, the entire surface of all substrates was totally covered by pre-mioblastic cells, highlighting the presence of C2C12-GFP cells inside pores and following pore edges. In these fluorescent images, cells presented a similar elongated morphology on flat surfaces and on pores samples, confirming the suitable surfaces for cell proliferation purposes.

3.3. Porous and etched Ti surfaces improves osteoblast cells adhesion and proliferation

After preliminary biocompatibility evaluation of c.p. Ti samples, a murine preosteoblastic cell line MC3T3-E1 was used to further analyze the interactions with specific bone cells. Fig. 6 showed the cell metabolic activity at 4 and 7 days of cell culture (A and B respectively). In Fig. 6A, cell metabolic levels were similar for all surfaces ($p \geq 0.05$), although it was observed a trend of higher metabolic activity on etched surfaces and even more on 625 s of treatment. At day 7, significant statistic differences on osteoblast cell proliferation ($*p \leq 0.05$) were observed for non-porous samples compared to porous and porous and etched (Fig. 6B). Indeed, the strongest significant differences were observed for D0 and D125 compared to the rest of the surfaces ($*p \leq 0.05$). It should be noticed that pore size did not achieve a reduction of AlamarBlue fluorescence levels for each group, observing similar metabolic activity among all porous and porous and etched substrates. In contrast, the HF modification showed a reduction in osteoblast proliferation, as lower fluorescence levels were observed for 125 and even more, for 625 s.

Osteoblastic cell behavior in non-porous substrates (D0, D125, and D625) was similar to those reported in previous studies, in which the metabolic activity of osteoblast during adhesion and cell proliferation process was higher on smooth than kinetic rough surface [28,57]. Chen and coworkers evaluated the MG63 osteoblast cell adhesion onto porous Ti surfaces at 24 h by MTT. Cell viability was similar between three different porosity volume fractions (30%, 40%, and 70%) and three sizes of spacer particles, showing no statistical differences between them [57].

MC3T3 cells present complex cellular machinery involved in proliferation and differentiation process which influence the cell metabolic in both states. Surface features have shown not only to influence the adhesion but also differentiation of osteoblastic cells, showing a reduction of proliferation rate in regard to increasing production of bone matrix proteins including ALP, collagen, osteopontin, and osteocalcin [57,58]. Regarding other cellular processes affected by roughness treatment, protein adsorption or hemocompatibility can be improved by means of surface modification, particularly increase in surface roughness, in bone and vascular tissue regeneration [59,60]. Romero and Gavilan (2017) evaluated the protein layer adhered onto Ti smooth surfaces, observing an increase in the number of proteins related to glycolysis and apoptosis (such proteins of the complement system, C3), whereas Ti rough surfaces showed an increased in cell signaling pathway by integrin and blood coagulation process (Apo E, and antithrombin). This roughness modification confirmed the effect on cell adhesion and the higher cell metabolic levels observed on flat Ti surfaces [59].

As a result of low cell metabolic activity, it could be expected a reduction of cell density. However, cell morphology evaluation through cytoskeleton and nuclei staining after 7 days of cell culture revealed similar cell density for all substrates (Fig. 7). Furthermore, samples were completely covered by cells on flat and within pores surfaces. The

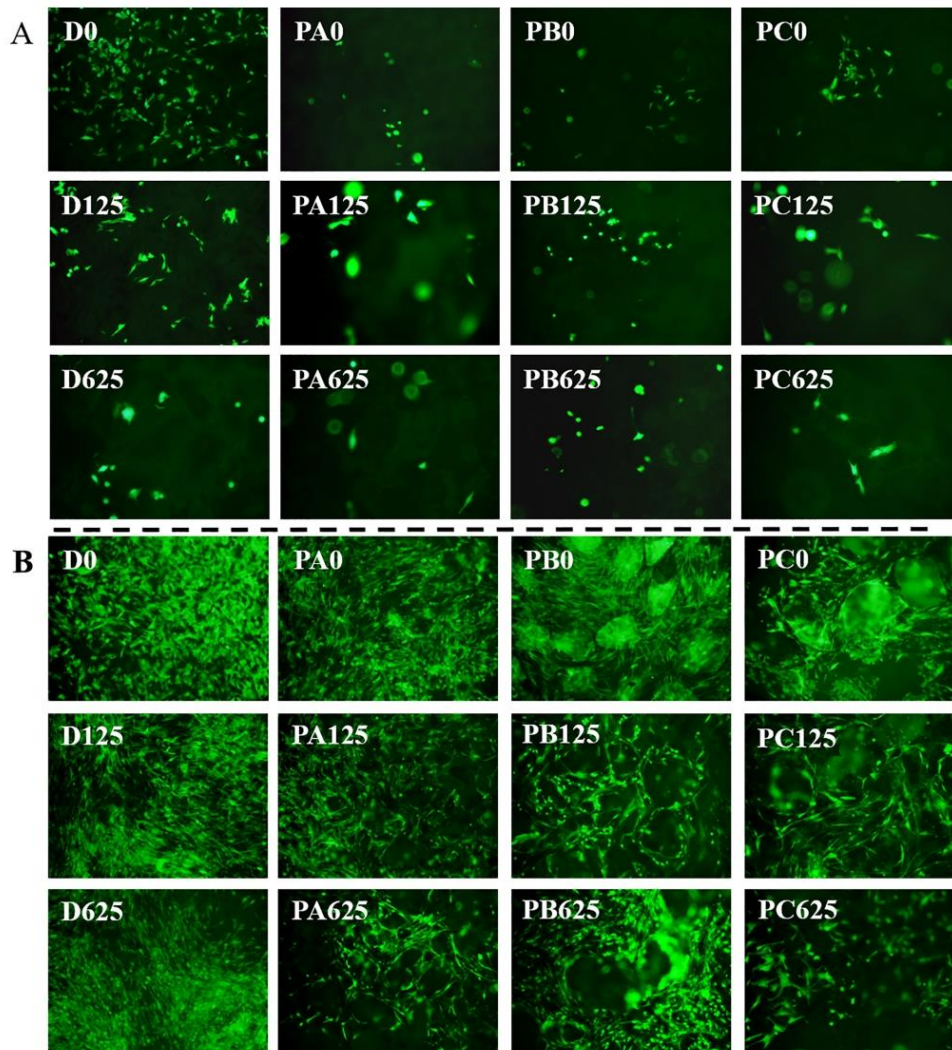


Fig. 5. Fluorescent microphotographs of cell adhesion and proliferation of C2C12-GFP preosteoblastic cell line. A) Cell attachment of D0, D125, D625, PA0, PB0, PC0, PA125, PB125, PC125, PA625, PB625, and PC625 at 1 day of cell incubation. All samples allowed cell attachment, noticing a slight increase in cell density in D0 which has smooth surface and no pores. Etched Ti scaffolds showed similar cell density as controls revealing the cell biocompatibility of the treatment. B) Cell proliferation of C2C12-GFP growing on D0, D125, D625, PA0, PB0, PC0, PA125, PB125, PC125, PA625, PB625, and PC625 at 4 days of cell incubation. Noticed the increase of cell density showing the cytocompatibility character of the treatment.

higher cell density presented on D (D0, D125 and D625) samples hindered the analysis of osteoblast morphology, thus, the organization of F-actin fibers evaluation was only performed on porous and porous and etched. Flat surfaces on PA0, PB0, and PC0 showed similar cell density and a well-spread cell cytoskeleton with a polygonal shape morphology. When surfaces were etched, the osteoblast started to feel the topography and adjust to it a more cuboidal cell shape. Nevertheless, the increase on the surface area of porous and porous and etched samples

(PA0, PB0 and PC0 and etching times of 125 s and 625 s) showed cells attached on pore walls, which correspond to unfocused cell nuclei (blue dots that are far away to focus properly using inverted fluorescence microscopy). This cell morphology was also observed on C2C12-GFP, highlighting an elongated cell shape, displayed a fusiform morphology, following pores edge and growing on flat surfaces. In contrast, these cells displayed a cuboidal or rounded shape inside the pores.

These cells presented an elongated fibroblastic cell morphology,

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

A. Civantos, et al.

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174

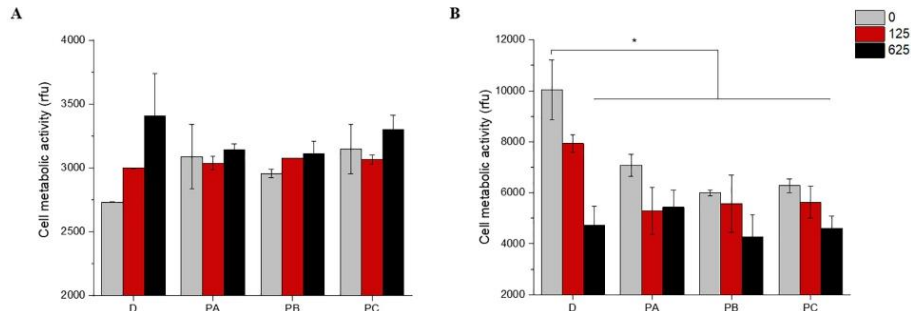


Fig. 6. Cell proliferation of MC3T3E1 preosteoblastic cells expressing cell metabolic activity results as relative fluorescence units at 4 and 7 days of cell culture (A and B, respectively). These fluorescence levels showed similar cell proliferation as control and TCP. Noticed a slight reduction trend in porous samples of cell metabolic levels.

which has been reported by several studies to an advanced cell adhesion state [61] (Fig. 5A). Porous and porous and etched samples (PA0, PB0 and PC0 and etching times of 125 s and 625 s) noticed lower C2C12-GFP cells, with rounded shape even inside pores which correspond to unfocused green dots. In addition, it should be noticed the cell orientation observed on dense and etched samples (D125 and D625) as a response to the rough topography developed by the etching process. The micro-roughness patterns guided cells growth with a certain orientation, as it was observed in D125 and D625. In contrast, this cell distribution and orientation were random on fully dense substrates, as observed after C2C12-GFP and MC3T3 cell lines results (see Fig. 5B and Fig. 7). Similarly, the presence of pores and etched roughness favored a random distribution of osteoblasts cells as D0 samples (Fig. 7).

3.4. Porous and etched Ti surfaces promotes osteoblast cells differentiation

Fig. 8 showed the results of alkaline phosphatase enzyme (ALP) quantified at 7 days. MC3T3E1 cells, cultured in osteogenic media, showed higher levels of ALP in all PA, PB and PC and etching times of 125 s and 625 s compared to non-porous Ti samples (D0), and also, non-etched control surfaces (D125 and D625) with significant differences ($p \leq 0.05$). Indeed, D0 without pores and any surface modification showed the lowest ALP levels, thus, porous and rough surfaces had a synergy effect on cell differentiation, which was confirmed finding the highest values for PC625. On the other hand, the size and pore morphology did not show a significant increase of ALP expression, however, there was a clear trend with higher ALP levels on etched bigger pores (PC125 and PC625). Alkaline phosphatase expression showed an early upward trend in rough and porous samples in comparison to smooth surfaces. Moreover, PC (0, 125 and 625) samples reached higher levels

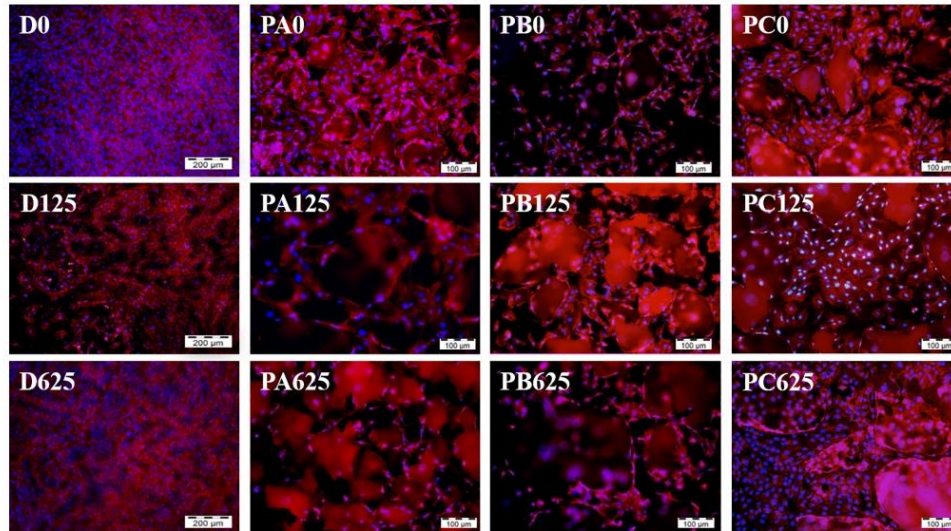


Fig. 7. Microphotographs of cell morphology of osteoblast MC3T3E1 growing on all c.p. Ti samples at day 7. Actin fibers appeared in red and cell nuclei in blue due to Texas Red Phalloidin and Dapi staining. From these images, Ti samples achieved similar cell density covered the whole surface by preosteoblast showing the cytocompatibility character of the samples. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

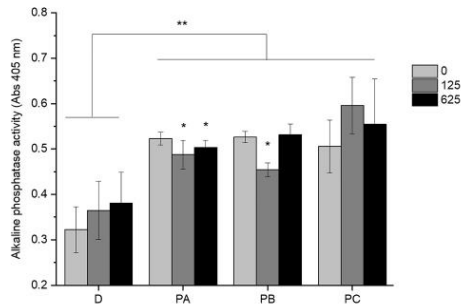


Fig. 8. Evaluation of cell differentiation at 7 days. Detection of alkaline phosphatase enzyme (ALP), an earlier bone marker, of osteoblast MC3T3E1 growing on c.p. Ti samples. The higher ALP levels were observed in 625 s HF treatment and in the pores with bigger size (PC125 and PC625).

of this bone marker expression. These results are in agreement to those reported in the literature. Indeed, Li and coworkers analyzed the ALP activity at 7 days of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) onto porous Ti6Al4V scaffolds, in which they showed an increased absorbance at 405 nm for porous substrates with 400–500 μm of pore size [58].

Fig. 9 showed cell mineralization results which revealed an increase in calcium deposits for porous and porous and etched surfaces compared to D0 and D125 surfaces. Taking into account the presence of calcium deposits over these samples, an optimal osteoblastic behavior is suggested. Although a more complex study, including other mid and late expression markers (osteocalcin, bone sialoprotein...), is needed, sample treatment did not decrease bone differentiation over all surfaces. Thus, the roughness parameter by itself had a clear effect on cell differentiation at earlier stages of osteoblast incubation as it is observed between D substrates (0, 125, and 625) and porous and etched surfaces (P125 and P625s for A, B and C). This improvement of cell differentiation and mineralization are in agreement to those values reported in similar studies highlighting the role of micro-roughness surfaces as the activator to induce these cellular processes [1,28,62,63].

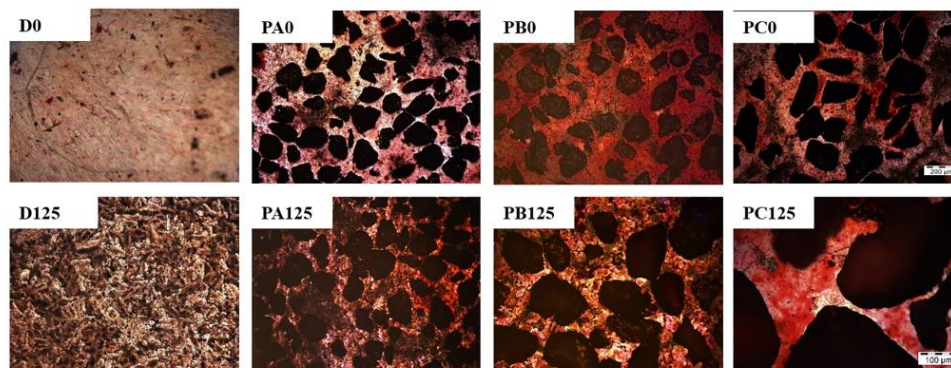


Fig. 9. Evaluation of cell mineralization at 14 days. Microphotographs of calcium deposits in red color after alizarin test. The higher calcium deposits were increased on porous and etched samples with 125 HF treatment (PB125 and PC125). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. Reduced M1 polarization in bioactive porous Ti

The evaluation of macrophages phenotype after contact with the Ti surfaces is essential in the design of successful implants since macrophages have a key role on the acceptance of the implant. In order to study the influence of porous and etched surfaces, RAW 264.7 cells were seeded on samples during 48 h of cell culture, to evaluate cell morphology and specific cell markers related to the M1 phenotype. As it is shown in Fig. 10, macrophages growing on D0 presented an increased polarization of M1 phenotype which was corroborated by the presence of macrophages with several nuclei inside, starry cell shape and bigger size than non-activated macrophages. This M1 phenotype observed on non-porous and non-etched surfaces (D0) was also confirmed by the positive signal of CCR7 immunostaining. In contrast, macrophages in contact with porous non-etched samples (PA0) showed a round cell shape similar to the specific cell morphology that was found in TCP control and the other c.p. Ti sample. Moreover, the tendency of the activation of macrophages decreased when substrates presented porous and etched surfaces, such as D625, and PA625. In these modified samples, it was not possible to detect large multinucleated cells that could differentiate into FBGC, as it was observed on D0 samples. Indeed, PA625s sample (small pores size and higher roughness values) showed less M1 polarization at the same time of cell incubation than D625. It is noteworthy to mention the great influence of surface properties on the immune cell response mediated by macrophages, confirming the potential benefits of porosity and roughness on Ti-based materials to reduce the M1 phenotype activation which is not desired on bone tissue reconstruction purposes. Therefore, the lack of M1 promotes a faster healing process, and the presence of pores the neovascularization required for the new bone tissue.

4. Conclusions

In this work, it has been developed a chemical treatment of porous c.p.Ti surfaces to modify the roughness in a controlled manner by using an organic inhibitor to generate the observed additional micro-roughness. The etching treatment modified substrates surfaces, as well as porosity in terms of volume fraction and morphology. All this microstructural and topographical variations involved a decrease of substrates mechanical properties, getting values closed to those of cortical bone, confirming more biomimetic porous Ti scaffolds. This study correlates cell viability, adhesion, proliferation, cell morphology and immune response of preosteoblastic cells, pre-osteoblastic cells, and

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

A. Civantos, et al.

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174

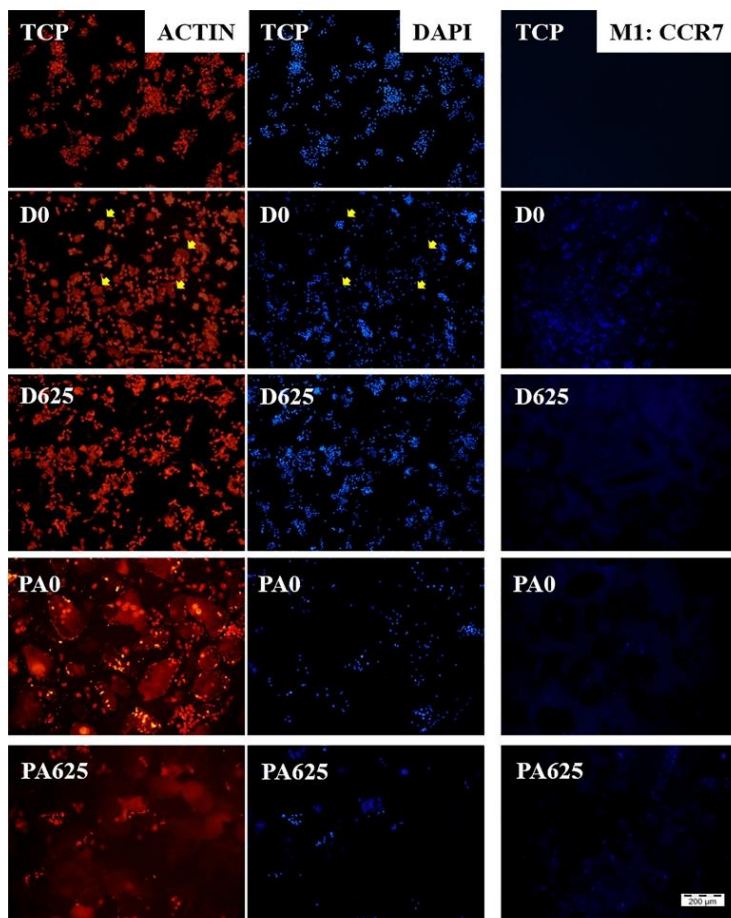


Fig. 10. RAW 264.7 cells seeded on titanium implants with different porosity and roughness. Actin fibers, cell nuclei by Hoechst staining, and M1 cell surface marker (CCR7) staining at 48 h of samples of titanium implants (D0, D625, PA0 and PA625). Cells growing on D0 (without porosity and roughness) presented an increased polarization of M1 that was corroborated with the positive signal of CCR7 staining. Moreover, some multinucleated cells, that could differentiate into FBGC (see yellow arrows), were observed on these samples. In contrast, D625 and PA625, as well as PA0, showed less M1 polarization compared to D0 revealing the positive effects of both parameters, roughness and porosity on the control of immune response. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

macrophages. Cell differentiation was improved, and the immune response was controlled to reduce M1 phenotype. Samples with the time of the attack of 0 s and 125 s favored the cell biocompatibility, whereas the samples with the chemical attack of 625 s enhanced the processes of osteoblast differentiation. In vitro evaluation of porous Ti samples is not sufficient to determine the degree of osseointegration of the samples; making necessary in vivo studies with animal models that allow a better understanding of osseointegration processes in the complex environment.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.03.001>.

Acknowledgements

This article is also dedicated to our dear friend and colleague Prof. Juan Jose Pavón, who prematurely passed away early in 2017, his dedication to his work, his students, his friends and family, will always be remembered. This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain under the grant MAT2015-71284-P and

of the Junta de Andalucía – FEDER (Spain) through the Project Ref. P12-TEP-1401. The authors would like to thank technician J. Pinto for assistance in micro-mechanical testing.

References

- [1] M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, J. Suzuki, T. Kokubo, T. Nakamura, Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium, *Biomaterials*. 26 (2005) 6014–6023, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.019>.
- [2] J.J. Pavón, P. Trueba, J.A. Rodríguez-Ortiz, Y. Torres, Development of new titanium implants with longitudinal gradient porosity by space-holder technique, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 6103–6112, <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9163-1>.
- [3] B. Dabrowski, W. Swieszkowski, D. Godlinski, K.J. Kurzydowski, Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 95B (2010) 53–61, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31682>.
- [4] A.B. Nover, S.L. Lee, M.S. Georgescu, D.R. Howard, R.A. Saunders, W.T. Yu, R.W. Klein, A.P. Napolitano, G.A. Ateshian, C.T. Hung, Porous titanium bases for osteochondral tissue engineering, *Acta Biomater.* 27 (2015) 286–293, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.045>.
- [5] E. Rieger, A. Dupret-Bories, L. Salou, M.-H. Metz-Boutigue, P. Layrolle, C. Debry, P. Lavalle, N.E. Vrana, Controlled implant/soft tissue interaction by nanoscale surface modifications of 3D porous titanium implants, *Nanoscale*. 7 (2015)

- 9908–9918, <https://doi.org/10.1039/C5NR01237F>.
- [6] Y. Chino, D.C. Dunand, Directionally freeze-cast titanium foam with aligned, elongated pores, *Acta Mater.* 56 (2008) 105–113.
 - [7] S.-W. Yook, H.-E. Kim, Y.-H. Koh, Fabrication of porous titanium scaffolds with high compressive strength using camphene-based freeze casting, *Mater. Lett.* 63 (2009) 1502–1504, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.03.056>.
 - [8] G.E. Ryan, A.S. Pandit, D.P. Apatidsi, Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique, *Biomaterials.* 29 (2008) 3625–3635, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.032>.
 - [9] G. Li, L. Wang, W. Pan, F. Yang, W. Jiang, X. Wu, X. Kong, K. Dai, Y. Hao, *In vitro* and *in vivo* study of additive manufactured porous Ti6Al4V scaffolds for repairing bone defects, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34072, <https://doi.org/10.1038/srep34072>.
 - [10] J. Parthasarathy, B. Starly, S. Raman, A. Christensen, Mechanical evaluation of porous titanium (Ti6Al4V) structures with electron beam melting (EBM), *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 3 (2010) 249–259, <https://doi.org/10.1016/j.jmbmm.2009.10.006>.
 - [11] B.V. Krishna, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Low stiffness porous Ti structures for load-bearing implants, *Acta Biomater.* 3 (2007) 997–1006, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.03.008>.
 - [12] C. Ramskogier, F. Warchomicka, S. Mostofi, A. Weinberg, C. Sommitsch, Innovative surface modification of Ti6Al4V alloy by electron beam technique for biomedical application, *Mater. Sci. Eng. C* 78 (2017) 105–113, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.311>.
 - [13] R. Orru, R. Licheri, A.M. Locci, A. Cincotti, G. Cao, Consolidation/synthesis of materials by electric current activated/assisted sintering, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 63 (2009) 127–287.
 - [14] Y.B. An, N.H. Oh, Y.W. Chun, Y.H. Kim, D.K. Kim, J.S. Park, J.-J. Kwon, K.O. Choi, T.G. Eom, T.H. Byun, J.Y. Kim, P.J. Reucroft, K.J. Kim, W.H. Lee, Mechanical properties of environmental-electro-discharge-sintered porous Ti implants, *Mater. Lett.* 59 (2005) 2178–2182, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.02.059>.
 - [15] I.-H. Oh, N. Nomura, N. Masahashi, S. Hanada, Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering, *Scr. Mater.* 49 (2003) 1197–1202, <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2003.08.018>.
 - [16] Y. Torres, J. Pavón, P. Trueba, J. Cobos, J.A. Rodríguez-Ortiz, Design, fabrication and characterization of titanium with graded porosity by using space-holder technique, *Procedia Mater. Sci.* 4 (2014) 115–119, <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.610>.
 - [17] M. Bram, C. Stiller, H.P. Buchkremer, D. Stöver, H. Baur, High-porosity titanium, stainless steel, and superalloy parts, *Adv. Eng. Mater.* 2 (2000) 196–199, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1527-2648\(2000\)4:2<196::AID-ADEM196>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1527-2648(2000)4:2<196::AID-ADEM196>3.0.CO;2-K).
 - [18] N. Tuncer, G. Arslan, E. Maire, L. Salvo, Investigation of spacer size effect on architecture and mechanical properties of porous titanium, *Mater. Sci. Eng. A* 530 (2011) 633–642, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.036>.
 - [19] S. Muñoz, J. Pavón, J.A. Rodríguez-Ortiz, A. Civantos, J.P. Allain, Y. Torres, On the influence of space holder in the development of porous titanium implants: mechanical, computational and biological evaluation, *Mater. Charact.* 108 (2015) 68–78, <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2015.08.019>.
 - [20] Yadir Torres, Sheila Lescano, Jorge Bris, Juan Pavón, José A. Rodríguez, Development of Porous Titanium for Biomedical Applications: A Comparison between Loose Sintering and Space-Holder Techniques, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493113006498>, (2014) (accessed September 1, 2014).
 - [21] Y. Torres, J.J. Pavón, I. Nieto, J.A. Rodríguez, Conventional powder metallurgy process and characterization of porous titanium for biomedical applications, *Metall. Mater. Trans. B Process Metall. Mater. Process. Sci.* 42 (2011) 891–900.
 - [22] C.M. Murphy, F.J. O'Brien, Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds, *Cell Adhes. Migr.* 4 (2010) 377–381, <https://doi.org/10.4161/cam.4.3.11747>.
 - [23] J.D. Bobyn, R.M. Pilliar, H.U. Cameron, G.C. Weatherly, The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone, *Clin. Orthop.* (1980) 263–270.
 - [24] C. Domínguez-Trujillo, F. Temero, J.A. Rodríguez-Ortiz, J.J. Pavón, I. Montealegre-Meléndez, C. Arévalo, F. García-Moreno, Y. Torres, Improvement of the balance between a reduced stress shielding and bone ingrowth by bioactive coatings onto porous titanium substrates, *Surf. Coat. Technol.* 338 (2018) 32–37.
 - [25] C. Domínguez-Trujillo, M.D. Garvi Higuera, A. Salazar-Moya, J. Lebrato Martínez, J.A. Rodríguez-Ortiz, C. Lebrato Vázquez, Y. Torres Hernández, A.M. Beltrán Custodio, Bacterial Behavior on Coated Porous Titanium Substrates for Biomedical Applications, (2019), <https://doi.org/10.1016/j.surcoat.2018.10.098>.
 - [26] C. Torres-Sanchez, F.R.A. Al Mushref, M. Norrito, K. Yendall, Y. Liu, P.P. Conway, The effect of pore size and porosity on mechanical properties and biological response of porous titanium scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* 77 (2017) 219–228, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.249>.
 - [27] Bungo Otsuki, Mitsuru Takemoto, Shunsuke Fujibayashi, Masashi Neo, Tadashi Kokubo, Takashi Nakamura, Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants, *Biomater.* 27 (2006) 5892–5900. (n. d.).
 - [28] Y. Chen, J.E. Frith, A. Dehghan-Manshadi, D. Kent, M. Birmingham, M. Dargusch, Biocompatible porous titanium scaffolds produced using a novel space holder technique, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 106 (2018) 2796–2806, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34060>.
 - [29] R.F. do Prado, G.C. Esteves, E.L.D.S. Santos, D.A.G. Bueno, C.A.A. Cairo, L.G.O.D. Vasconcelos, R.S. Sagnori, F.B.P. Tessarin, F.E. Oliveira, L.D.D. Oliveira, M.F.L. Vilaça-Carvalho, V.A.R. Henriques, Y.R. Carvalho, L.M.R. De Vasconcelos, *In vitro* and *in vivo* biological performance of porous Ti alloys prepared by powder metallurgy, *PLoS One* 13 (2018), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196169>.
 - [30] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86–100, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>.
 - [31] A.K. Refai, M. Textor, D.M. Brunette, J.D. Waterfield, Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines, *J. Biomed. Mater. Res. A* 70A (2004) 194–205, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30075>.
 - [32] A. Civantos, E. Martínez-Campos, V. Ramos, C. Elvira, A. Gallardo, A. Abarrategi, Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (2017) 1245–1261, <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00604>.
 - [33] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86–100, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>.
 - [34] D. Karazisis, A.M. Ballo, S. Petronis, H. Agheli, L. Emanuellsen, P. Thomsen, O. Omar, The role of well-defined nanotopography of titanium implants on osseointegration: cellular and molecular events in vivo, *Int. J. Nanomedicine* 11 (2016) 1367–1382, <https://doi.org/10.2147/IJN.S101294>.
 - [35] K.M. Hotchkiss, N.B. Ayad, S.L. Hyzy, B.D. Boyan, R. Olivares-Navarrete, Dental implant surface chemistry and energy alter macrophage activation in vitro, *Clin. Oral Implants Res.* 28 (2017) 414–423.
 - [36] J. Wang, S. Qian, X. Liu, L. Xu, X. Miao, Z. Xu, L. Cao, H. Wang, X. Jiang, M2 macrophages contribute to osteogenesis and angiogenesis on nanotubular TiO2 surfaces, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 3364–3376, <https://doi.org/10.1039/C6TB03364D>.
 - [37] A. Scisłowska-Czarnecka, E. Menaszek, B. Szaraniec, E. Kolaczowska, Ceramic modifications of porous titanium: effects on macrophage activation, *Tissue Cell.* 44 (2012) 391–400, <https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.08.002>.
 - [38] K.C. Nune, R.D.K. Misra, S.J. Li, Y.L. Hao, R. Yang, Cellular response of osteoblasts to low modulus Ti-24Nb-4Zr-8Sn alloy mesh structure, *J. Biomed. Mater. Res. A* 105 (2017) 859–870, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35963>.
 - [39] K. Subramani, R.T. Mathew, P. Pachauri, Titanium surface modification techniques for dental implants—from microscale to nanoscale, *Emerg. Nanotechnologies Dent.* Second ed., Elsevier, 2018, pp. 99–124.
 - [40] ASTM F67-00, Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications, (2002).
 - [41] J.A. Rodríguez-Ortiz, A. Coronel, J.J. Pavón, L. Cordero, A.R. Boccaccini, C. Romero, Y. Torres, Surface Modification of Porous Titanium for Bone Repair: Controlled Etching by Chemical and Electrochemical Treatments, (n.d.)
 - [42] Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whitespace Products, Ceramic Tiles, and Glass Tiles, 14.
 - [43] I. Standard, ISO 13314: 2011 (E) (2011) Mechanical Testing of Metals—Ductility Testing—Compression Test for Porous and Cellular Metals, Ref Number ISO. 13314 (n.d.) 1–7.
 - [44] P.C. Potts, L. Ma, S.M. Graham, M.A. Adler, Repeatability and Reproducibility of Compression Strength Measurements Conducted According to ASTM E9, National Institute of Standards and Technology, (2009), <https://doi.org/10.6028/NIST.TN.1679>.
 - [45] W.E. Luecke, L. Ma, S.M. Graham, M.A. Adler, Repeatability and Reproducibility of Compression Strength Measurements Conducted According to ASTM E9, (2010).
 - [46] A. Standard, Standard Test Methods of Compression Testing of Metallic Materials at Room Temperature, 1990 Annu. Book ASTM Stand. ASTM West Conshohocken PA, (1990), pp. 98–105.
 - [47] J.R. Davis, *ASM Handbook: Nondestructive Evaluation and Quality Control*, ASM International, 1989.
 - [48] J. Müller-Rochholz, Determination of the elastic properties of lightweight aggregate by ultrasonic pulse velocity measurement, *Int. J. Cem. Compos. Lightweight Concr.* 1 (1979) 87–90.
 - [49] T.B. Kim, S. Yue, Z. Zhang, E. Jones, J.R. Jones, P.D. Lee, Additive manufactured porous titanium structures: through-process quantification of pore and strut networks, *J. Mater. Process. Technol.* 214 (2014) 2706–2715, <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2014.05.006>.
 - [50] G. Pyka, G. Kerckhofs, I. Papantoniou, M. Speirs, J. Schrooten, M. Wevers, Surface roughness and morphology customization of additive manufactured open porous Ti6Al4V structures, *Materials.* 6 (2013) 4737–4757, <https://doi.org/10.3390/ma6104737>.
 - [51] C. Aparicio, F.J. Gil, U. Thams, F. Muñoz, A. Padrós, J.A. Planell, Osseointegration of Grit-Blasted and Bioactive Titanium Implants: Histomorphometry (in, n.d.)
 - [52] L.L. Guehenec, E. Goyenvalle, M.-A. Lopez-Heredia, P. Weiss, Y. Amourig, P. Layrolle, Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (2008) 1103–1110, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01547.x>.
 - [53] C. Aparicio, F. Gil, J. Planell, E. Engel, Human-osteoblast proliferation and differentiation on gritblasted and bioactive titanium for dental application, *J Mater Sci Mater Med.* 13 (2003) 1105–1111.
 - [54] M. Herrero-Climent, P. Lázaro, J. Vicente Rios, S. Lluich, M. Marqués, J. Guillem-Martí, F.J. Gil, Influence of acid-etching after grit-blasted on osseointegration of titanium dental implants: *in vitro* and *in vivo* studies, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 2047–2055, <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4935-0>.
 - [55] T.-S. Jang, H.-D. Jung, S. Kim, B.-S. Moon, J. Baek, C. Park, J. Song, H.-E. Kim, Multiscale porous titanium surfaces via a two-step etching process for improved mechanical and biological performance, *Biomater. Mater.* 12 (2017) 025008, <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa5d74>.
 - [56] B. Chang, W. Song, T. Han, J. Yan, F. Li, L. Zhao, H. Kou, Y. Zhang, Influence of pore size of porous titanium fabricated by vacuum diffusion bonding of titanium meshes

Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration

A. Civantos, et al.

Surface & Coatings Technology 368 (2019) 162–174

- on cell penetration and bone ingrowth, *Acta Biomater.* 33 (2016) 311–321.
- [57] R.F. do Prado, F.S. de Oliveira, R.D. Nascimento, L.M.R. de Vasconcelos, Y.R. Carvalho, C.A.A. Cairo, Osteoblast response to porous titanium and biomimetic surface: in vitro analysis, *Mater. Sci. Eng. C. 52* (2015) 194–203, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.028>.
- [58] G. Li, L. Wang, W. Pan, F. Yang, W. Jiang, X. Wu, ... Y. Hao, In vitro and in vivo study of additive manufactured porous Ti6Al4V scaffolds for repairing bone defects, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34072.
- [59] F. Romero-Gavilan, A.M. Sánchez-Pérez, N. Araújo-Gomes, M. Azkargorta, I. Iloro, F. Elortza, M. Gurruchaga, I. Goñi, J. Suay, Proteomic analysis of silica hybrid sol-gel coatings: a potential tool for predicting the biocompatibility of implants in vivo, *Biofouling*. 33 (2017) 676–689.
- [60] J.P. Allain, M. Echeverry-Rendón, Surface treatment of metallic biomaterials in contact with blood to enhance hemocompatibility, *Hemocompatibility Biomater. Clin. Appl.*, Elsevier, 2018, pp. 279–326.
- [61] A. Ahmad Khalili, M.R. Ahmad, A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 18149–18184, <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- [62] R.A. Gittens, T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K.H. Sandhage, B.D. Boyan, The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation, *Biomaterials*. 32 (2011) 3395–3403.
- [63] Jean-Philippe St-Pierrea, Louis-Philippe Lefebvre, Maryam Tabrizian, Maxime Gauthierb, Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds, *Biomater.* 26 (2005) (2005) 7319–7328.

