



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Comparación *in vitro* de la biocompatibilidad de sustratos de titanio biofuncionalizados con Alginato vs sustratos recubiertos con hidroxiapatita**

**Carlos Andrés Gutiérrez Acosta**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Odontología, Especialidad en Cirugía Oral y Maxilofacial  
Bogotá, Colombia  
2015

# **Comparación *in vitro* de la biocompatibilidad de sustratos de titanio biofuncionalizados con Alginato vs sustratos recubiertos con hidroxiapatita**

**Carlos Andrés Gutiérrez Acosta**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Especialista en Cirugía Oral y Maxilofacial**

Directora:

**Dianney Clavijo Grimaldo**

Médica Cirujana, Msc Ingeniería Biomédica, Ph.D Ingeniería Ciencia y Tecnología de Materiales Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Comparación *in vitro* de la biocompatibilidad de sustratos de titanio biofuncionalizados con Alginato frente a sustratos recubiertos con hidroxiapatita

CódigoHermes: 26727

Grupo de investigación:

Ciencia de materiales y superficies, Universidad Nacional

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología, Especialidad en Cirugía Oral y Maxilofacial

Bogotá, Colombia

2015

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Bogotá, D.C., 6 de noviembre de 2015

*“La ciencia pura no permanece pura indefinidamente. Tarde o temprano, suele convertirse en ciencia aplicada y finalmente en tecnología”.*

*AldousHuxley*

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle a Dios por haberme guiado en este camino, a cada uno de los que son parte de mi familia, a mi padre Carlos Gutiérrez, a mi madre Adíela Acosta y a mi hermana Diana Marcela. Quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica. Por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional para llegar hasta donde estoy ahora.

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Dianney Clavijo mi directora de tesis quién me colaboro en todo momento, que con su ayuda desinteresada y me brindó información relevante.

A todas aquellas personas que, de alguna forma, formaron parte de este proyecto de investigación:

El Dr. Carlos Paucar quien apoyo este proyecto de investigación con la obtención de la hidroxiapatita.

Al doctor Dionisio Malangón, del Instituto biotecnología de la Universidad Nacional por su valioso aporte en la obtención dela solución de alginato.

Al doctor Norberto Calvo vicedecano de odontología de la universidad nacional por la facilitación del horno para el tratamiento térmico de los sustratos en el laboratorio dental.

Al doctor Emeterio Cruz vicerrector de investigación de la universidad ECCI por facilitar el equipo de microscopio electrónico barrido para la realización de la caracterización morfológica.

A rosa Julieth Cifuentes técnica operativa del laboratorio de difracción de RX facultad de ciencias y al departamento de física de la universidad nacional de Colombia por el espacio para realizar los análisis en el perfilometro y en el equipo de difracción de rayos X.

Finalmente un eterno agradecimiento a la universidad Nacional de Colombia que me abrió las puertas y me permitió obtener las habilidades para desarrollar idóneamente mi vida profesional y desarrollar mi trabajo de grado.

## Resumen

Este estudio presenta los resultados de las pruebas *in vitro* de la biocompatibilidad de sustratos de titanio biofuncionalizados con diferentes tipos de recubrimientos. Se identificaron los parámetros de recubrimiento mediante electroespray para los grupos de hidroxiapatita, alginato y un compuesto hidroxiapatita/alginato. Se realizó caracterización morfológica con microscopía electrónica de barrido (SEM) y perfilometría. Posteriormente se evaluó la biocompatibilidad a través de la prueba de apatita bone-like por medio de un fluido corporal simulado y los resultados se observaron a través de difracción de rayos X (DRX). Se muestra en el análisis de DRX que para todos los grupos evaluados hubo formación de apatita, sin embargo teniendo en cuenta las características morfológicas y químicas, el compuesto hidroxiapatita/alginato presentó mejores resultados sobre los sustratos de titanio. Adicionalmente se observa que el recubrimiento del alginato potencia las características bien conocidas que presenta los recubrimientos de hidroxiapatita. Por lo anterior se considera que estos revestimientos compuestos podría tener aplicaciones potenciales en el campo de la ingeniería de tejidos para servir de vehículo y espaciadores en la entrega de factores de crecimiento, medicamentos, que pueden impulsar efectivamente la regeneración ósea y mejorar la oseointegración de los implantes dentales.

**Palabras clave:** Alginato, Titanio, Hidroxiapatita, Electro spray

## Abstract

This present study involves the results of in vitro tests of the biocompatibility of titanium substrates bio-functionalized with different types of coatings. The coating parameters through electrospray for groups of hydroxyapatite, alginate and a hydroxyapatite/alginate compound were identified. The morphological characterization was performed through scanning electron microscopy (SEM) and profilometry. Subsequently, biocompatibility was evaluated by applying Bone Apatite-Like Test through a simulated body fluid and the results are observed by X-ray diffraction (XRD). The analysis XRD proved that apatite formation occurred for all of the evaluated groups. However, the hydroxyapatite/alginate composite showed better results on titanium substrates because of its morphological characteristics. Furthermore, it has been demonstrated that the features of hydroxyapatite coatings were powered by the alginate coating. Therefore, findings revealed that such composite coatings could have many potential applications in the field of tissue engineering so as to be used as spacers on growth factors, prescription delivery; which can effectively boost bone regeneration and improve osseointegration in dental implants.

**Keywords:**Alginate, Titanium, Hydroxyapatite, Electrospray



# Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>11</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>11</b>
<b>Lista de Símbolos y Abreviaturas</b> .....	<b>13</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>15</b>
OBJETIVO GENERAL .....	15
Objetivos Específicos.....	15
<b>Introducción</b> .....	<b>16</b>
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>20</b>
1.1 RUGOSIDAD SUPERFICIAL DE LOS IMPLANTES DENTALES .....	22
1.2 MODIFICACIONES QUÍMICAS DE LA SUPERFICIE .....	25
1.3 BIOFUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE:.....	28
1.4 ELECTROSPRAYING O ELECTROSPRAY .....	30
1.5 ALGINATO.....	34
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>36</b>
2.1 TIPO DE ESTUDIO: .....	36
2.2 MATERIALES UTILIZADOS: .....	36
2.3 PREPARACIÓN DE SUSTRATOS DE TITANIO:.....	37
2.4 PROCESO DE ELECTRODEPOSICIÓN: .....	37
2.5 TRATAMIENTO TÉRMICO DE LOS SUSTRATOS .....	39
2.6 ANÁLISIS DE BIOCAMPATIBILIDAD INDIRECTA .....	40
2.7 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL .....	41
2.8 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS .....	42
<b>3. Resultados</b> .....	<b>43</b>
3.1 ELECTRODEPOSICIÓN HIDROXIAPATITA .....	43
3.2 ELECTRODEPOSICIÓN ALGINATO.....	44

3.3 ELECTRODEPOSICIÓN COMPUESTO HIDROXIAPATITA/ALGINATO .....	47
3.4 CARACTERIZACIÓN .....	49
3.4.1 Microscopio electrónico de barrido .....	49
Titanio sin recubrimiento al SEM .....	49
3.4.2 Perfilometría .....	51
3.5 Pruebas de biocompatibilidad.....	53
3.5.1 Prueba de biocompatibilidad control positivo (Apatita bone-like).....	53
3.5.2 Prueba de biocompatibilidad control negativo (Adsorción proteínas).....	57
<b>4) Discusión.....</b>	<b>60</b>
4.1 PRUEBAS DE BIOCOPATIBILIDAD .....	65
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>74</b>
<b>6. Recomendaciones .....</b>	<b>75</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>76</b>

# Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1:</b> <b>Figura 1.A.</b> Diagrama esquemático de la configuración del proceso de deposición electrospray (26). <b>B.</b> Suspensión líquida por medio de electrospray en el modo de cono de chorro estable.(25).....	31
<b>Figura 2:</b> Montaje de Electrospray.....	38
<b>Figura3 :</b> Sustratos recubiertos con hidroxiapatita.....	43
<b>Figura 4:</b> Sustratos recubiertos con Solución de alginato.....	45
<b>Figura 5:</b> Ensayos de compuesto hidroxiapatita/alginato.....	48
<b>Figura 6:</b> Sustratos recubiertos con compuesto hidroxiapatita/alginato.....	48
<b>Figura7:</b> Micrografía deSustrato de Ti sin recubrimiento al SEM.....	50
<b>Figura 8:</b> Micrografía deSustrato con recubrimiento al SEM. 500x.....	50
<b>Figura 9:</b> Micrografía deSustrato con recubrimiento al SEM. 5000x.....	51
<b>Figura 10:</b> Grafica perfilométrica de grupo control.....	52
<b>Figura 11:</b> Grafica perfilométrica de los sustratos con recubierto.....	52
<b>Figura 12:</b> Difractograma <b>A.</b> sustratos con recubierto HA. <b>B.</b> hidroxiapatita en polvo.....	54
<b>Figura 13:</b> Difractograma prueba de apatita bone-like.....	55
<b>Figura 14:</b> EDS, prueba adsorción de proteínas.....	57
<b>Figura 15:</b> SEM antes y después prueba adsorción de proteínas.....	58
<b>Figura 16:</b> Mecanismo formación apatita bone-like.....	67

## Lista de Tablas

<b>Tabla 3-1-1:</b> Parámetros de procesamiento de HA.....	<b>44</b>
<b>Tabla 3-2-1:</b> Ensayos de solución de alginato.....	<b>45</b>
<b>Tabla 3-2-2:</b> Parámetros de procesamiento de alginato .....	<b>46</b>
<b>Tabla 3-3-1:</b> Ensayos compuesto hidroxiapatita/alginate .....	<b>47</b>
<b>Tabla 3-3-2:</b> Parámetros de procesamiento de compuesto.....	<b>49</b>
<b>Tabla 3-5-1:</b> prueba apatita bone-like, comparación de sustratos mediante difracción rayos X.....	<b>56</b>

# Lista de Símbolos y Abreviaturas

## Símbolos

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
Cm	Centímetros
H	Horas
HA	Hidroxiapatita
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido Fosfórico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
KV	Kilovoltios
l/min	Litros por minuto
ml/h	Mililitros por hora
ml/min	Mililitros por minuto
MI	Milímetros
Nm	Nanómetros
Ti	Titanio
V	Voltios
P	Fosfato
Ca	Calcio
MPa	Megapascales
°C	Grados centígrados
S	Segundos
CP	Fosfato de calcio

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
RX	Rayos X
DRX	Difracción de rayos X
BMP	Proteína Morfogénica Óseas
Ca	Calcio
HCa	Apatita carbonatada
nHA	Nano hidroxapatita
ENSAB	Estudio Nacional de Salud Bucal
SBF	Fluido Corporal Simulado
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
Tlcp	Titanio Comercialmente Puro
TPS	Titanium Plasma Spray
FEPA	Federation of the European Producers of Abrasives

# Objetivos

## Objetivo General

Determinar *in vitro* la biocompatibilidad de sustratos de titanio biofuncionalizados con hidroxiapatita, alginato, compuesto hidroxiapatita/alginato y sustrato sin biofuncionalizar.

## Objetivos Específicos

- Establecer los parámetros para el recubrimiento mediante electrospray de hidroxiapatita, alginato y compuesto hidroxiapatita/alginato sobre sustratos de titanio.
- Realizar caracterización morfológica de los recubrimientos sobre los sustratos de titanio mediante SEM y perfilometría
- Evaluar y comparar de manera indirecta la biocompatibilidad de los sustratos de titanio modificados.

## Introducción

Según los resultados del Estudio Nacional de Salud Bucal del Ministerio de Salud del año 1999 -ENSAB III, la población entre los 15 a 19 años tiene un 3,9% de dientes perdidos por caries, las personas de 35 a 44 años un 8% y los mayores de 55 años un 16,2%. La necesidad de rehabilitar pacientes con prótesis, fue de un 22,3% para el maxilar superior y de un 46,6% para el maxilar inferior (1). En el campo de la rehabilitación oral y la cirugía oral y maxilofacial existen múltiples alternativas de tratamiento para rehabilitación de los dientes perdidos, entre ellos se cuenta con la realización de implantes dentales oseointegrados como uno de los procedimientos protésico-quirúrgico utilizados con más frecuencia y de mayor éxito (2). La introducción de los implantes dentales inicio con el trabajo accidental de Branemark en 1969, el observó que una pieza de titanio incrustado en el hueso de conejo presento una fuerte unión con el tejido óseo y de difícil eliminación. Esto llevó a una cuidadosa caracterización de la interface formada por el tejido óseo y la superficie de implantes de titanio, demostrando la excelente oseointegración (3). Los implantes dentales basados en el trabajo Branemark fueron introducidos en 1971 (4). En la actualidad existen múltiples investigaciones que han dado lugar a un alto porcentaje de tasa de supervivencia y longevidad. Sin embargo, Se puede deducir que el progreso en la oseointegración de implantes dentales ha sido lento y gradual. Después de mas de 4 décadas se continua usando casi las mismas aleaciones y protocolos descritos en las obras de Branemark (3)



En el 2003, se realizaron más de 700.000 procedimientos de implantes dentales en los Estados Unidos y más de 1,3 millones de procedimientos en Europa (5). La tasa de éxito de los implantes dentales va del 90 al 95 % en múltiples estudios. El porcentaje de fracaso es muy bajo, aproximadamente 5 %, en su mayoría probablemente debido procesos infecciosos, el rechazo, la pérdida ósea acelerada y la mala oseointegración que conllevan a la pérdida del implante (6). La causa más frecuente de fracaso es la formación ósea insuficiente alrededor del biomaterial inmediatamente después de la implantación (3); Si la oseointegración no es adecuada el organismo produce una respuesta inflamatoria a cuerpo extraño, si esta se torna crónica, hay osteólisis y se altera la estabilidad a largo plazo del implante dental. Como la superficie del implante es la que entra en contacto con el tejido óseo, la naturaleza mecánica de la conexión hueso-implante está influenciada en gran medida por las propiedades de su superficie (7).

El objetivo y la tendencia actual es la creación de nuevos implantes o la regeneración de órganos completos, sin embargo debido a la enorme escala y la complejidad global este objetivo esta mucho mas allá del alcance de la tecnología actual, por lo tanto la necesidad de un implante sintético para hacer frente a múltiples factores físicos y biológicos impone grandes restricciones sobre la elección de materiales adecuados. La primera vía prometedora para solucionar lo anterior es a través de la ingeniería de superficies, que incluye la topografía y/o revestimientos a nanoescala para una mejor y más rápida oseointegración de los implantes diseñados para funcionar durante toda la vida del paciente (3).

Una alternativa o estrategia complementaria es la BIOFUNCIONALIZACIÓN de la superficie de implantes dentales la cual es definida como el injerto o producto químico de tratamiento molecular de un implante o de recubrimiento de superficies para mejorar la adhesión celular y promover la mineralización, la producción de proteínas de la matriz y marcadores celulares (3). Para entender las funciones específicas de las células y el proceso de oseointegración la nanotecnología nos ofrece nuevas formas de interactuar con células y moléculas biológicas (8). Hay

una fuerte creencia de que los materiales a nanoescala producirán una nueva generación de materiales de implante con una alta eficiencia y alto volumen. La nanoescala en el procesamiento de materiales es realmente una nueva frontera (3). Existen múltiples medios físicos y químicos para lograr la modificación de superficie de los implantes dentales, sin embargo no todos tienen la capacidad de producir recubrimientos de tamaño nano, por lo tanto con una novedosa técnica como el *electrospray* se pueden producir recubrimientos en los que puede controlarse el espesor, composición química y porosidad, entre otras variables (9).

La mayoría de los procesos de biofuncionalización del titanio se han desarrollado desde 1990 siendo los recubrimientos con hidroxiapatita (HA) o fosfato de calcio los más frecuentemente desarrollados y varios de ellos comercializados. En recientes estudios Wang y colaboradores realizaron revestimientos compuestos de alginato/quitosano capa por capa que fueron preparados sobre sustratos de titanio a través de electrodeposición, observaron en la prueba Indirecta de citotoxicidad *in vitro* no tuvieron efectos significativos sobre la viabilidad celular. Por otra parte, el ensayo de citocompatibilidad exhibió que los recubrimientos no eran tóxicos para las células L929. Sin embargo, los resultados revelaron que el recubrimiento de alginato era más beneficio para el cultivo de células de revestimiento de quitosano. Los resultados indicaron que el método propuesto puede ser utilizado para fabricar revestimientos compuestos y estos revestimientos podrían tener aplicaciones potenciales en campo de los andamios de ingeniería de tejidos (10).

Al mismo tiempo Clavijo y colaboradores (11) encontraron que los recubrimientos de solución de alginato sobre los sustratos de titanio presentaron viabilidad celular, sin embargo en los análisis de la bioactividad celular mostraron que el comportamiento celular no difiere de los sustratos de titanio sin recubrimiento. Además se concluyó que a pesar de que las células mesenquimales son una buena alternativa para evaluación de los recubrimientos, sería de mayor importe

realizar los análisis de bioactividad con células ya diferenciadas en linaje óseo. A su vez el alginato incorporado sobre el titanio puede servir de molécula de enlace para la incorporación de medicamentos o factores bioactivos. Teniendo en cuenta que los anteriores estudios conllevan a un gran aporte en el estado del arte de la biofuncionalización de superficies, es innegable la necesidad de continuar realizando estudios y experimentos que lleven a encontrar los parámetros ideales para recubrimiento de titanio, realizar análisis de biocompatibilidad mas precisos para así contribuir al desarrollo de los recubrimientos de titanio que induzcan a la proliferación de células óseas y de esta manera lograr disminuir el inconveniente en la falla de oseointegración de los implantes dentales.

# 1. Marco Teórico

En la actualidad nos encontramos direccionados a la producción de nuevos implantes o la regeneración de órganos completos para la rehabilitación dental, sin embargo los requisitos impuestos por la enorme escala y la complejidad global del diseño están mucho más allá del alcance de la tecnología actual, por lo tanto se hace necesario continuar mejorando los implantes sintéticos con los que contamos para hacer frente a múltiples factores físicos y biológicos (3). El titanio comercialmente puro Tlcp y las aleaciones de titanio son actualmente los materiales de elección para los implantes dentales (10), Tlcp tiene varios grados de pureza, que se clasifican de 1 a 4. La clasificación se relaciona con la resistencia a la corrosión, ductilidad y fuerza. Tlcp grado 1 tiene la más alta pureza, la más alta resistencia a la corrosión, formabilidad y la fuerza más baja, mientras que el grado 4 ofrece la máxima resistencia y conformabilidad moderado. La mayoría de los implantes dentales están hechos de Tlcp grado 4 o grado 5 que es la aleación Ti6Al4V (Titanio Aluminio, Vanadio) porque es más fuerte que los otros grados (12).

El Ti forma una película protectora y estable de óxido. Esta película puede proporcionar una excelente resistencia a la corrosión y pueden adsorber proteínas e inducir la diferenciación de las células óseas (13), contradictoriamente la corrosión también constituye una de las posibles causas de fracaso de los implantes después de un éxito inicial, dado por la liberación de iones/partículas que se presenta en el medio biológico (14). La integración de titanio al hueso es

generalmente muy buena y habitualmente no produce una fibrointegración que sería perjudicial para el éxito terapéutico. Sin embargo, hay algunas áreas de preocupación con respecto al uso de titanio en las que se encuentra la estabilidad a largo plazo, la respuesta de la cicatrización, así como la osteointegración de los implantes dentales (13). La aleación de Ti puede presentar una oseointegración insuficiente debido a su baja osteoconductividad y superficie subóptima, resultando en el aumento del aflojamiento aséptico y el fracaso prematuro subsiguiente de los implantes.

Con el fin de mejorar la osteointegración, reducir el tiempo necesario para cargarlo y aumentar la tasa de éxito de los implantes de aleación de Ti, se han utilizado diversos métodos de modificación de superficie. La incorporación de elementos bioactivos como el calcio (Ca), silicio (Si), zinc (Zn) y estroncio (Sr) es el método más utilizado y útil (15). Sin embargo los tratamientos químicos superficiales y morfológicos actuales están controlados a nivel de micrones, pero la respuesta del tejido es dictada principalmente por procesos controlados en nanoescala. La comprensión y el control de las reacciones a nivel nano es la clave para el desarrollo de nuevas superficies de implantes que eliminarán el rechazo, promocionara adhesión e integración en el tejido circundante.

Por lo anterior los nuevos estudios de Bioingeniería e ingeniería de materiales están encaminados a la modificación de la topografía y/o revestimientos a nanoescala. No existen pautas comúnmente aceptadas para el diseño de las topografías de superficie o la deposición de recubrimientos y la evidencia clínica es a menudo contradictoria (3). En la actualidad a nivel mundial, hay 80 empresas productoras de 220 diversos implantes dentales por lo que la comparación es a menudo difícil (6).

## 1.1 Rugosidad superficial de los implantes dentales

Se ha demostrado que la rugosidad de la superficie de los implantes de titanio esta íntimamente relacionada con la fijación biomecánica y por consiguiente con la tasa de oseointegración. Según las características de la escala de las rugosidades de la superficie se puede dividir en tres niveles: topografías macro, micro y nanométricas (16).

El nivel *macro* se define por las características topográficas en el rango de milímetros a decenas de micras. Esta escala está directamente relacionada con la geometría del implante, con el tipo de rosca y el tratamiento de superficie macroporosa que dan rugosidad de la superficie de más de 10nm. Numerosos informes han demostrado que tanto la fijación temprana y la estabilidad mecánica a largo plazo de la prótesis se ven beneficiadas por un alta rugosidad en comparación con superficies lisas. Lo anterior es dado por un enclavamiento mecánico entre la superficie del implante y crecimiento de hueso. Sin embargo, un riesgo importante puede ser el aumento en la perimplantitis (16).

El perfil *micro* topográfico de los implantes dentales se define como la rugosidad de la superficie en el intervalo de 1-10nm. Esta rango de rugosidad maximiza el enclavamiento entre el hueso mineralizado y la superficie del implante. Algunas teorías sugieren que la superficie ideal debe presentar poros hemisféricos de aproximadamente 1,5nm de Profundidad y 4nm de diámetro (16).

La principal indicación clínica para el uso de un implantes con una superficie rugosa esta dada en los casos donde se presenta una cantidad ósea insuficiente o limitaciones anatómicas, los implantes cortos diseñados con una superficie rugosa han demostrado resultados clínicos superiores a las superficies lisas (15-16).

Las superficies en el rango *nanométrico* juegan un papel importante en la adsorción de proteínas, adhesión de las células osteoblásticas y por lo tanto la

tasa de oseointegración. Sin embargo, esta topografía es difícil de producir con tratamientos químicos. Además, la superficie topografía nano óptima para la adsorción selectiva de proteínas que conducen a la adhesión de las células osteoblásticas y la rápida aposición ósea es desconocida. Varios métodos han sido desarrollados con el fin de crear una superficie rugosa y mejorar la oseointegración de los implantes dentales de titanio. Estos métodos utilizan plasma rociado de titanio, deposición con partículas de cerámica, grabado ácido y anodizado (16).

**Grabado ácido:** un método para hacer rugosa la superficie de los implantes dentales de titanio es por medio de grabado con ácidos fuertes como HCl, H<sub>2</sub>S<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> y HF. Este produce micro poros en las superficies de Ti con tamaños que van de 0,5 a 2 micras de diámetro y se ha demostrado que mejora en gran medida la oseointegración. La inmersión de los implantes de titanio durante varios minutos en una mezcla de HCl concentrado y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (grabado ácido dual) y el calentamiento por encima 100°C se emplea para producir una superficie microrrugosa. Este tipo de superficie promueve la osteointegración rápida, manteniendo el éxito a largo plazo de más de 3 años. Se ha encontrado que las superficies duales de grabado ácido mejoran el proceso de osteoconductividad a través de la unión de fibrina y células osteogénicas, resultando en la formación de hueso directamente sobre la superficie del implante.

Sin embargo, los tratamientos químicos pueden reducir las propiedades mecánicas del titanio. Por ejemplo, el grabado ácido puede conducir a la fragilización por hidrógeno del titanio, creando micro grietas en su superficie que podría reducir la resistencia a la fatiga de los implantes. De hecho, los estudios experimentales han informado de la absorción de hidrógeno por titanio en un entorno biológico. Esta fragilización por hidrógeno de titanio también se asocia con la formación de una fase híbrida quebradiza, lo que lleva a una reducción en la

ductilidad del titanio. Este fenómeno está relacionado con la aparición de mecanismos de fractura en implantes dentales (16).

**Plasma rociado:** Un método de pulverización de plasma de titanio (TPS) se ha utilizado para la producción de superficies de implantes en bruto. Este método consiste en inyectar polvos de Ti en una antorcha de plasma a alta temperatura. Las partículas de Ti se proyectan sobre la superficie de los implantes, donde se condensan y se fusionan entre sí, formando una película alrededor de 30 micras de espesor con una rugosidad promedio de alrededor de 7 micras, lo que aumenta el área superficial del implante.

Sin embargo, las partículas de titanio a veces se han encontrado en el hueso adyacente a estos implantes. Los iones metálicos liberados desde los implantes pueden ser el producto de la disolución y el desgaste, y pueden ser una fuente de preocupación debido a sus potencialmente dañinos efectos carcinogénicos locales y sistémicos. Sin embargo, los efectos adversos locales y sistémicos de la liberación de iones de titanio no han sido universalmente reconocidos (16).

**Anodización:** También se pueden producir superficies con micro-o nano-poros por medio de anodización potencioestática o galvanostática de Ti en ácidos fuertes ( $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$ ,  $HNO_3$ , HF) a alta densidad de corriente ( $200 A/m^2$ ) o potencial (100 V). La anodización produce modificaciones en la microestructura y la cristalinidad de la capa de óxido de titanio. El proceso de anodización es bastante complejo y depende de varios parámetros tales como la densidad de corriente, la concentración de ácidos, la composición y temperatura del electrolito.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar oseointegración en los procesos de modificación de superficie de Ti por anodización: enclavamiento mecánico a través del crecimiento óseo en los poros y la unión bioquímica. Modificaciones a la composición química de la capa de óxido de titanio se han probado con la incorporación de magnesio, calcio, azufre o fósforo. Se ha encontrado que la



incorporación de magnesio en la capa de óxido de titanio conduce a un valor de par de eliminación mayor en comparación a otros iones.

**Arenado:** Otro enfoque para hacer rugosa la superficie de titanio consiste en chorro de los implantes con partículas cerámicas duras. Las partículas de cerámica se proyectan a través de una boquilla a alta velocidad por medio de aire comprimido. Dependiendo del tamaño de las partículas cerámicas, diferentes rugosidades de superficie se pueden producir en los implantes de titanio. El material de voladura debe ser químicamente estable, biocompatible y no debe obstaculizar la oseointegración de los implantes de titanio. Varias partículas cerámicas se han utilizado, como por ejemplo Alúmina, Óxido de Ti y partículas de Fosfato de Calcio (16).

La Alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) se utiliza con frecuencia como un material de voladura y produce rugosidad de la superficie. Sin embargo, el material de limpieza es con frecuencia incrustado en la superficie del implante y el resto se mantiene incluso después de la limpieza ultrasónica, pasivación ácido y esterilización. La alúmina es insoluble en ácido y es por tanto difícil de eliminar de la superficie de titanio. En algunos casos, estas partículas se han liberado en los tejidos que rodean y han interferido con la oseointegración de los implantes (12).

## **1.2 Modificaciones químicas de la superficie**

Además de las modificaciones morfológicas de las rugosidades superficiales de los implantes, numerosas modificaciones químicas de superficies han sido investigados para obtener una interacción óptima con el tejido. El tejido biológico interactúa principalmente con las capas atómicas más externas de un implante. Por lo tanto los tratamientos físico-químicos están diseñados para causar interacciones de superficie directamente con la naturaleza química del hueso, con

el fin de mejorar e influir en la formación de nuevo de hueso. Convirtiendo una superficie comúnmente bioinerte en bioactiva (18).

Para modificar la química de una superficie de titanio el método mas utilizado es la aplicación de recubrimientos. Estos materiales de revestimiento son compuestos bioactivos capaces de promover la unión celular, la diferenciación y la formación de hueso. Los materiales bioactivos más comunes son los fosfatos de calcio (CP), tales como hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP) y vidrios bioactivos. Cuando se implanta, estas cerámicas bioactivas forman una capa de apatita carbonatada (HCA) en su superficie a través de la disolución y precipitación (3). La Incorporación de carbonato en la estructura cristalina induce una mayor reactividad hacia el hueso. Un aumento de la velocidad de disolución después de la implantación conduce a un aumento de la liberación de iones de calcio y fosfato, por lo tanto, aumenta la saturación de los fluidos corporales, facilitado la aposición de apatita biológica sobre la superficie del implante (19). Al mismo tiempo, las fibrillas de colágeno se pueden incorporar en los aglomerados de apatita. La secuencia de eventos es poco conocida pero parece ser: la adsorción de restos biológicos por la acción de los macrófagos, la unión de las células madre y su diferenciación, la formación de la matriz y finalmente la mineralización completa (3).

Para el procesamiento de los recubrimientos sobre superficies de implantes metálicos diversas técnicas han sido investigados, entre las que encontramos la pulverización de plasma, revestimiento de sol-gel, deposición electroforética, implantación de iones y la precipitación biomimético entre otros. La finalidad es combinar las propiedades mecánicas de los metales y en especial la del titanio con las propiedades biológicas de los revestimientos (18).

***Pulverización de plasma:***Es la técnica de revestimiento más comúnmente utilizado para fosfatos de calcio (3-18), Es una técnica en la cual las partículas de cerámica de HA se inyectan en una antorcha de plasma a alta temperatura y

proyectadas sobre la superficie del Ti, donde se condensan y se fusionan entre sí, formando una película (19). A su vez también conduce a una modificación de la superficie en términos de rugosidades superficiales más altas. Por lo tanto los recubrimientos de hidroxiapatita pueden combinar topografía de la superficie con efectos químicos

Sin embargo, la pulverización por plasma muestra algunas desventajas en investigaciones a largo plazo (19). Para lograr una cobertura completa del material de sustrato el espesor de los recubrimientos de plasma - rociado generalmente excede las 50 micras (3). En los implantes dentales esto resulta en un tiempo relativamente pobre de unión entre el plasma de recubrimiento pulverizado de apatita y el titanio. Se requiere pre-tratamientos adicionales del Ti para lograr una rugosidad y por lo tanto un mejor enclavamiento mecánico de las capas depositadas, a pesar de lo anterior se obtiene una morfología muy irregular de los revestimientos, lo que conlleva a un pobre control del espesor del revestimiento, con mayor riesgo de fractura (19). También se ha informado de la liberación de partículas y la delaminación de las capas depositadas que produce fragmentos flotantes. Incluso se ha demostrado que la descomposición térmica parcial de HA, que conduce a la formación de otros fosfatos de calcio, incluyendo 22-62 % de fosfato de calcio amorfo altamente soluble,  $\alpha$ TCP ,  $\beta$  - TCP , fosfato de tetracalcio, y óxido de calcio durante el procedimiento de recubrimiento genera cambios incontrolables en la composición y cristalinidad del material inicial de fosfato de calcio debido a las altas temperaturas involucrados en el proceso de fabricación (3). Esto significa que es muy difícil para recubrir la apatita de carbonato deseado, ya que su estructura se descompone durante la pulverización de plasma.

**Revestimiento de sol-gel:** Es un método de revestimiento generalmente de fosfato de calcio el cual se prepara sumergiendo el sustrato en calcio (por lo general sales de nitrato) y geles de fósforo. Es un procedimiento económico y técnicamente simple de realizar. Esta técnica ofrece ciertas ventajas, debido a la homogeneidad química alta, una estructura de grano fino y baja temperatura de

cristalización del revestimiento resultante (20). Por otra parte, estos recubrimientos formados muestran estructuras porosas, menos densas y reportan una pobre adhesión al material de sustrato. Esta pobre adhesión es un factor perjudicial que limita su uso (21). Por lo tanto, estos recubrimientos deben ser sinterizados a altas temperaturas para mejorar su fuerza de adhesión y densidad. Al igual que en la técnica de pulverización de plasma dependiendo de las temperaturas de sinterización se pueden obtener diferentes fosfatos de calcio (22). En ensayos in vitro se han experimentado recubrimientos de hidroxiapatitafluorada con diferentes contenidos de fluoruro preparados por métodos sol-gel y se ha demostrado que puede mejorar la viabilidad de las células, sin embargo el alto contenido de fluoruro disminuye la solubilidad lo que se manifiesta en una disminución de la liberación de calcio en el medio de cultivo. Para aplicaciones clínicas, se sugiere que un contenido moderado de fluoruros puede ser adecuado para establecer un compromiso entre la unión celular, la proliferación, la deposición de apatita y la resistencia a la disolución (17).

**Recubrimientos biomiméticos de fosfato de calcio:** En este método biomimético, se precipitan cristales de apatita de fosfato de calcio sobre la superficie de Ti a partir de fluidos corporales simulados (SBF) que forma un recubrimiento a temperaturas fisiológicas y en condiciones de pH que se mantienen a alrededor de 7,4(16-18). La deposición de apatita por inmersión en soluciones fisiológicas, a partir de pruebas de biocompatibilidad in vitro, se adapta a fin de lograr deposiciones que están cerca de la composición y la química de hueso natural (22).

### **1.3 Biofuncionalización de la superficie:**

Se ha descrito la Incorporación de partículas biológicamente activas en los implantes dentales de Ti, estos pueden estar recubiertos con agentes estimulantes de hueso, para mejorar la adhesión celular, promover la mineralización y la producción de marcadores celulares y proteínas de la matriz

(3). Los candidatos lógicos para el injerto molecular son proteínas presentes en la matriz extracelular tales como factores de crecimiento con el fin de mejorar el proceso de cicatrización del hueso a nivel local. La superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) y en particular, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento derivado de plaquetas TGF- $\beta$ 1 (PDGF) y similar a la insulina (IGF-1 y 2) (3), fibronectina (FN), la vitronectina (VN), o laminina (LN), para nombrar unos pocos (25). Últimamente, el enfoque ha cambiado al uso de dominios de señalización, compuestas de varios aminoácidos. Estos dominios están presentes a lo largo de la cadena de las proteínas de la matriz extracelular y son los que interactúan con los receptores de la membrana celular. Desde Pierschbacher y Ruoslahti encontraron que la secuencia Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) tal vez es el dominio de señalización más conocido derivado de la fibronectina, la laminina, el colágeno de tipo I y la osteopontina(16). Sin embargo, también se han utilizado otras secuencias tales como Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) o Arg-GluAsp-Val (REDV) (25). El uso de un péptido corto es más conveniente porque las largas moléculas se pueden plegar y como resultado los dominios de unión pueden no estar disponibles.

Los procedimientos más simples para funcionalizar la superficie de Ti implican la inmersión del material en una solución que contiene las moléculas deseadas con el fin de promover la adsorción en la superficie. Las desventajas son la relativamente pobre adhesión.

Aunque la mayor parte de los documentos apoyan la idea de que la funcionalización puede mejorar y acelerar la oseointegración, la clave está en adaptar las técnicas de funcionalización a las superficies de aleaciones dentales, para ser capaz de crear superficies que se mostrarán diferentes moléculas con distribución espacial controlada y el grado requerido de adhesión. Por otra parte, es probable que aún carezcamos de los datos in vivo necesarios para seleccionar métodos de unión y densidades de superficies óptimas (3).

Otros métodos de modificación de la superficie, como el tratamiento alcalino, el tratamiento con ácido han sido reportados en un intento de formar una superficie bioactiva en implantes metálicos a base (16). También recientemente la deposición de nanopartículas de HA por medio de electrospray se ha venido estudiando, ya que es un proceso sencillo y económico, capaz de depositar recubrimientos de fosfatos de Ca como la HA(26).

#### **1.4Electrospraying o electrospray:**

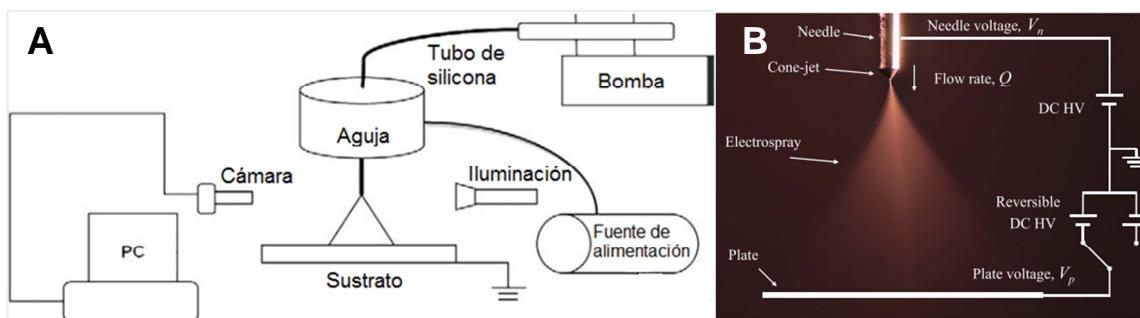
El electrospray (pulverización electrohidrodinámica) es un proceso de generación de gotas y carga simultánea por medio de un campo eléctrico. Es un método de atomización de líquido por fuerzas eléctricas, donde se producen gotitas que se auto-dispersan (9). Las gotas producidas por electrospray están altamente cargadas, lo que impide su coagulación y promueve la auto-dispersión. Las gotitas pueden ser extremadamente pequeñas en casos especiales por de bajo de nanómetros. La carga y el tamaño de las gotitas pueden ser controlados hasta cierto punto por la tensión y la velocidad de flujo. El electrospraying tiene algunas ventajas sobre los sistemas mecánicos convencionales de pulverización con gotitas cargadas por inducción. Por ejemplo, La distribución del tamaño de las gotas suele ser estrecha, con una desviación estándar baja; Las gotitas pueden ser del mismo tamaño sólo por goteo y micro goteo. Las Gotitas cargadas se auto-dispersan en el espacio, lo que se traduce en ausencia de aglomeración de la gota y ausencia de coagulación (9).

En la **figura 1** se observan los componentes del equipo de electrospray los cuales son: Una aguja con diámetro interior variable, una placa circular plana donde se posicionan los sustratos, una fuente de alta tensión continua conectados a la placa circular y a la aguja, una bomba con posibilidad de modificar la tasa de velocidad de flujo que impulsa a través de una jeringa las soluciones. Dos multímetros conectados a las líneas de conexión de la aguja y la placa de las fuentes de alimentación, los cuales miden la intensidad de la corriente. Por ultimo una cámara

conectada a un monitor para poder observar el líquido cuando esta saliendo de la aguja.

El funcionamiento del electroespray en las características de goteo, regímenes multijet o cono de chorro están determinados por la intensidad del campo eléctrico en la salida de la aguja. Mientras que las características de deposición que determinan las propiedades morfológicas como la porosidad, la rugosidad de la superficie del depósito formado están determinados por el campo eléctrico en la superficie de la placa (27).

**Figura 1.A.** Diagrama esquemático de la configuración del proceso de deposición electroespray (26). **B.** Suspensión líquida por medio de electroespray en el modo de cono de chorro estable. (25).



El electroespray tiene múltiples aplicaciones en diferentes procesos industriales, tales como la pintura, la microencapsulación, electroemulsificación, la producción de polvo fino o micro y nano deposición de película delgada preparada a partir de soluciones o suspensiones coloidales. Recientemente, el electroespray empezó a tener interés en procesos de microfluidos y nanotecnología (9).

En los últimos años ha sido de gran interés la utilización de la técnica de electroespray para deposición de nanopartículas de HA. Como se había dicho anteriormente, Los fosfatos de calcio, en particular los revestimientos de hidroxiapatita (HA), se han utilizado ampliamente debido a su gran parecido con la fase mineral inorgánica que se encuentra en los huesos y los dientes, así como su

capacidad para promover la aposición ósea directa. Hasta ahora, los implantes metálicos recubiertos de HA han sido el enfoque más exitoso. Como se reviso en el apartado anterior existe diversos métodos de deposición de revestimientos, Sin embargo, estos métodos implican alta temperatura extrema, son de alto costo o técnicamente complicados. Por todo lo anterior la pulverización electrohidrodinámica ha recibido mucha atención recientemente, ya que es un proceso capaz de depositar recubrimientos de CP. Leeuwenburgh et al. Han demostrado la capacidad para producir recubrimientos de CP, con Ca y soluciones de sal precursora de P y mezclando ambos en la boquilla de pulverización (28).

En los trabajos de Thiana et al. Proponen la técnica de revestimiento mediante deposición con electrospray y refieren que es un enfoque rentable para técnicas de revestimiento tradicionales, además se muestra que es posible producir un revestimiento uniforme que consiste de nanocristales de hidroxapatita (nHA) sobre un sustrato de titanio. Ellos realizaron un proceso de electrodeposición de nano partículas de HA mediante la técnica de electrospray donde tuvieron en cuenta los parámetros de recubrimiento como: un diámetro interno de la aguja de 300 micras, una tasa de flujo de 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se aplicó un voltaje de 4,7KV, una distancia entre la aguja y el sustrato de 20mm un tiempo de pulverización de 60s. Posteriormente realizaron un tratamiento térmico con calor a 124 ° C durante 2 h. luego realizaron una prueba de biocompatibilidad indirecta donde encontraron que estos recubrimientos nHA desencadenaron un proceso de precipitación de apatita temprano en el fluido corporal acelular simulado. Adicionalmente realizaron cultivos celulares donde observaron que las células de osteoblastos humanos presentaron una buena fijación sobre los recubrimientos. Por lo tanto, estos resultados indicaron la bioactividad mejorada in vitro por medio de la técnica de electrospray(28).

Los estudios en animales han demostrado que en comparación con los implantes no revestidos, los implantes con una capa delgada de CP han mejorado notablemente la unión del tejido óseo durante un período de varios meses.



Además, numerosos estudios histológicos proporcionan evidencia de que los implantes revestidos producen una interfaz más fiable con el hueso favoreciendo la oseointegración. Sin embargo, hay informes contradictorios sobre la eficacia de los revestimientos de HA, ya que La mayoría de los estudios indican que las técnicas de recubrimiento disponibles actualmente proporcionan la adherencia inadecuada de los revestimientos del CP a las aleaciones de Ti. La fuerza de adhesión entre comillas, 15-30 MPa son muy bajos afectando la estabilidad mecánica del revestimiento. Por lo tanto, la cuestión de la utilidad de revestimiento no se ha resuelto completamente (29-3).

Idealmente, los recubrimientos deben tener una fuerte adhesión al implante y una buena fijación al hueso. Su microestructura y su tasa de disolución deben ser programados para coincidir con el proceso de curación in vivo, adicionalmente que puedan servir de modelo para el suministro in situ de las drogas y los factores de crecimiento en los momentos requeridos (3). Teniendo en cuenta lo anterior han venido surgiendo inquietudes sobre el tipo de revestimiento que deben complementar la superficie de Ti de los implantes dentales. Hoy por hoy se ha venido estudiando un biomaterial que puede llegar tener beneficios sobre la oseointegración como lo es los recubrimientos con Alginato.

En un estudio reciente de Wang et al. 2014. Donde realizaron recubrimientos por medio de electrodeposición de alginato / quitosano capa por capa sobre sustratos de titanio encontraron que en la prueba de citotoxicidad in vitro los recubrimientos no eran tóxicos para las células. Los resultados indicaron que el método propuesto puede ser utilizado para fabricar revestimientos compuestos de alginato/quitosano capa por capa sobre la superficie de titanio a temperatura ambiente y estos revestimientos compuestos podría tener aplicaciones potenciales en el campo de la ingeniería de tejidos (29).

## 1.5 Alginato

El alginato es un polisacárido aniónico distribuido ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas (Phaeophyceae, incluyendo *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, entre otros). Estas sustancias corresponden a polímeros orgánicos derivados del ácido algínico. Las ventajas que presenta el alginato son la biocompatibilidad, baja toxicidad, costo relativamente bajo, similitud con los tejidos humanos. Por lo anterior ha sido ampliamente investigado y utilizado para muchas aplicaciones biomédicas (30 - 31).

El componente principal del alginato es la sal sódica del ácido algínico. Su estructura química contiene bloques compuestos de 2 unidades monoméricas repetitivas:  $\beta$ -D-manuronato (unidades M) y  $\alpha$ -L-guluronato (unidades G) unidas mediante enlaces  $\beta$  (1-4) (31).

Los Hidrogeles de alginato debido a su similitud estructural a las matrices extracelulares de los tejidos vivos permite amplias aplicaciones en la curación de heridas, la administración de agentes bioactivos tales como fármacos y proteínas, el trasplante de células en ingeniería de tejidos como por ejemplo trasplantes de islotes células de Langerhans para el tratamiento de la diabetes tipo 1, trasplante celular de condrocitos como tratamiento de la incontinencia urinaria y el reflujo vesicoureteral, regeneración de tejidos como vasos sanguíneos, cartílago y hueso, además de promover regeneración periodontal (30).

En la ingeniería biomédica se han encontrado múltiples utilidades y se ha observado propiedades a nivel de regeneración ósea, por ejemplo se ha utilizado en lesiones óseas donde el tratamiento con geles de alginato han encontrado potencial en la regeneración ósea por factores osteoinductivos, células formadoras de hueso o combinación de ambos. Dentro de las ventajas del alginato respecto a otros materiales; presenta mayor propiedades de regeneración ósea y

cartilaginosa debido a su capacidad de ser introducido en el cuerpo de una manera mínimamente invasiva y la liberación controlada de factores de inducción de tejido (por ejemplo, BMP, TGF-B). El Alginato ha demostrado ser útil en modelos animales para la entrega de factores de crecimiento que pueden impulsar efectivamente la regeneración ósea (por ejemplo, proteínas morfogenéticas óseas) (30).

En el estudio de Weng et al. Donde realizo un estudio experimental con células estromales de médula ósea, después de haber realizado inducción por la vía de los osteoblastos in vitro y mezclando con geles de calcio reticulado de alginato, se observo que presento reparación de defectos óseos alveolares horizontales en perros (32).

El alginato también se ha combinado con materiales inorgánicos para mejorar la formación de tejido óseo. Estudios donde se combina compuestos de alginato / hidroxiapatita (HA) se han podido lograr estructuras porosas interconectadas que mejora la adhesión de células de osteosarcoma (30).

Debido a las características osteoinductivas que se han observado con materiales como el alginato y los fosfatos de calcio más puntualmente con la hidroxiapatita resulta interesante realizar investigaciones sobre los beneficios que puede tener las propiedades de estos revestimientos sobre la oseointegración de los implantes dentales.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Tipo de estudio:

Estudio experimental cualitativo *in vitro*.

Variables del estudio:

- Variable independiente: recubrimiento del material (HA, alginato y compuesto HA + alginato)
- Variable dependiente:  
Morfología de los recubrimientos  
Biocompatibilidad indirecta

### 2.2 Materiales utilizados:

- 16 discos de Ticp de 20mm de diámetro por 1mm de espesor.
- Papel metalográfico de diferente tamaño de grano.
- Solución Salina al 0.9%, Etanol al 95%, agua destilada, polivinilpirrolidona SIGMA ALDRICH, acetona al 99,5%, alcohol isopropilico.
- Recubrimientos: Solución de alginato de sodio W201502 SIGMA ALDRICH, hidroxiapatita no sinterizada, pureza del 98% tamaño de partícula promedio 20Nm.
- Pruebas biocompatibilidad: Lactato de Ringer 30%, Albúmina Bovina 30% SPINREAC ®

### 2.3 Preparación de sustratos de Titanio:

- A. Los sustratos de Ti fueron sometidos a un proceso de limpieza y pulido secuencial por medio de papel metalográfico de tamaños de grano de P600,P 800,P 1000 y P1500 FEPA con abundante irrigación.
- B. Ultrasonido con Acetona al 99,5% durante 20 minutos a 30° C
- C. Ultrasonido con alcohol isopropilico durante 20 minutos a 30° C
- D. Ultrasonido con agua destilada durante 20 minutos a 30° C
- E. Secado a temperatura ambiente.

### 2.4 Proceso de electrodeposición:

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de electrospray de la facultad de medicina de la Universidad Nacional. El montaje del electroespray estaba compuesto de una aguja de acero inoxidable marca Upchurch referencia U 1145 ½ X 0.8mm X 5mm con un diámetro interno de 0.8 mm y un colector o plataforma para el sustrato. La aguja se conectó a una fuente de alto voltaje Spellman CZE 1000R y el colector se conectó a un polo a tierra, se utilizó una bomba KDS 100 con una jeringa de 21 mm de diámetro para impulsar el líquido hacia la aguja a través de un capilar. Se determinó para cada ensayo la tasa de flujo, Voltaje y distancia entre la aguja y el sustrato.

La intensidad de la corriente eléctrica que llega a la aguja para equilibrar la carga de eyección y la corriente recogida en el colector se midió mediante dos multímetros que se insertaron en las líneas de conexión de la aguja y la plataforma a las fuentes de alimentación.

La salida del líquido se visualizó utilizando una cámara filmadora conectada a una pantalla de televisión, para supervisar la deposición del líquido. **Ver figura 2.**

**Figura 2:** Montaje de Electro spray.



Se tomaron en cuenta 4 grupos para realizar la electrodeposición: el primer grupo 4 discos de titanio recubiertos con partículas de HA, el segundo grupo 4 discos de titanio recubiertos con solución de alginato, el tercer grupo 4 discos de titanio recubiertos con un compuesto de hidroxiapatita/alginato y finalmente un cuarto grupo o grupo control consistente en 4 discos de titanio sin recubrimiento de superficie.

#### **Grupo #1: Deposición de solución de hidroxiapatita:**

Se maneja la solución de hidroxiapatita en polvo al 6% peso /volumen, 0,6 gr de hidroxiapatita disueltos en 10ml Etanol al 95%, Posteriormente se sometió la solución a ultrasonido durante 20 minutos a 30° C. (para efectos prácticos esta solución será llamada mas adelante el apartado solución **HA1**). Se realizó el proceso de electrodeposición mediante la técnica de electro spray con el sobrenadante de la solución de Hidroxiapatita.

### ***Grupo #2: Deposición de alginato:***

Se realizaron 8 ensayos donde se compararon diferentes variables como la cantidad y concentración de polímero y de solvente (Solución Salina al 0.9%, Etanol al 95%, Lactato de Ringer al 30%, agua destilada y polivinilpirrolidona), con el fin de obtener una muestra que no se precipitara, con adecuada conducción eléctrica y optimas condiciones para manejo en el equipo de electro spray.

Posteriormente se procedió a realizar el recubrimiento mediante la técnica de electro spray durante 45 minutos.

### ***Grupo #3: Deposición de compuesto hidroxiapatita/alginate:***

Se realizaron 6 ensayos donde se compararon diferentes variables como la cantidad y concentración de polímero y de solvente (Solución Salina al 0.9%, Etanol al 95%, Lactato de Ringer al 30% y agua destilada), Buscando el balance ideal entre las dos soluciones para obtener unos parámetros en los cuales se adquiriera una adecuada configuración cono- chorro spray y un flujo continuo sobre los sustratos mediante la técnica de electro spray.

### **2.5 Tratamiento térmico de los sustratos:**

Los sustratos ya recubiertos fueron sometidos a calor en el horno Miditherm BEGO ® perteneciente al laboratorio dental de la facultad de odontología de la Universidad Nacional. Para facilitar la adhesión de los recubrimientos a los sustratos. Los ensayos fueron realizados por grupos de la siguiente manera:

***Grupo #1: sustratos recubiertos con hidroxiapatita y sustratos recubiertos con compuesto hidroxiapatita/alginate:***

Las muestras fueron llevadas al horno a temperaturas de 60, 120, 180, 240°C las cuales iban aumentando gradualmente en un tiempo de 5 minutos y finalmente una temperatura constante a 600°C durante 20 minutos para completar un total de 45 minutos, luego se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente.

***Grupo #2: sustratos recubiertos Alginato:***

En este grupo las muestras fueron llevadas al horno iniciado desde 60°C aumentando en intervalos de 60°C hasta completar 240°C, las cuales iban aumentando gradualmente en un tiempo de 5 minutos para completar un total de 25 minutos. Las temperaturas utilizadas fueron debido a que los polímeros cambian de fase a diferentes temperaturas y el cambio vítreo del alginato está entre 200 y 300 grados.

## **2.6 Análisis de biocompatibilidad indirecta**

***A. Prueba de biocompatibilidad de control positiva:***

Se realizó un análisis mediante pruebas de formación de apatita bone-like, se utilizaron 1 disco de Ti recubierto con HA, 1 disco de Ti recubierto con alginato, un disco de Ti recubierto con Compuesto hidroxiapatita/alginate y 1 disco de titanio sin recubrimiento como control. previo enjuague de las muestras con agua desionizada los anteriores fueron sometidos a Lactato de Ringer 30%, como fluido corporal simulado (SBF), en este caso cada muestra fue sumergida en 30 ml de SBF en una botella de vidrio a temperatura ambiente por un periodo de 25 días sin agitación.

Seguidamente las muestras fueron lavadas suavemente en agua destilada y se secadas a temperatura ambiente. La formación de apatita bone-like se comprobó mediante difracción de rayos X.



**B. Prueba de biocompatibilidad de control negativa:**

Se realizó una prueba de adsorción de proteínas, por lo tanto las muestras se lavaron con agua desionizada previamente. Luego se tomaron 3 discos de Ti recubiertos con HA, 3 discos de Ti recubiertos con alginato, 3 discos de Ti recubiertos con compuesto hidroxiapatita/alginato y 3 discos controles y se sumergieron en 2.1 ml de Albúmina Bovina 30% en una botella de vidrio a temperatura ambiente por un periodo de 2 horas.

Posteriormente las muestras fueron lavadas suavemente en agua destilada y se secaron a temperatura ambiente para ser analizadas mediante SEM con sonda de espectrometría de dispersión de energía de rayos X donde se obtuvo la medición de la capa de proteína adsorbida.

**2.7 Caracterización del material:**

**A. Caracterización morfológica:**

- Microscopio electrónico de barrido (SEM) PHENOM TM perteneciente al laboratorio de caracterización de la universidad ECCI Bogotá.
- Perfilometría en un equipo DEKTAK 150 Veeco perteneciente al laboratorio de difracción de rayos X facultad de ciencias departamento de física de la Universidad Nacional.

Ambas caracterizaciones morfológicas se realizaron antes de someter las muestras a las pruebas de biocompatibilidad indirecta.

**B. Caracterización Química:**

- SEM con sonda de espectrometría de dispersión de energía de rayos X equipo TESCAN perteneciente al laboratorio de caracterización de materiales de facultad de ciencias departamento de física de la Universidad Nacional. para la prueba de biocompatibilidad de control negativa, adsorción de proteína.

- Difracción de rayos X para la prueba de biocompatibilidad de control positiva, apatita bone-like.

Los ensayos de difracción de rayos-X se han llevado en un equipo PANalytical X'Pert PRO perteneciente al laboratorio de difracción de rayos X facultad de ciencias departamento de física de la Universidad Nacional. El barrido de las muestras se realizó con un rango entre  $10^\circ$  y  $80^\circ$ , una máscara de 10mm, un antiscatter a  $2^\circ$ , un tamaño de paso 0,02s y un tiempo de paso de 60s para un total de tiempo por muestras de 12 minutos.

## **2.8 Metodología de análisis**

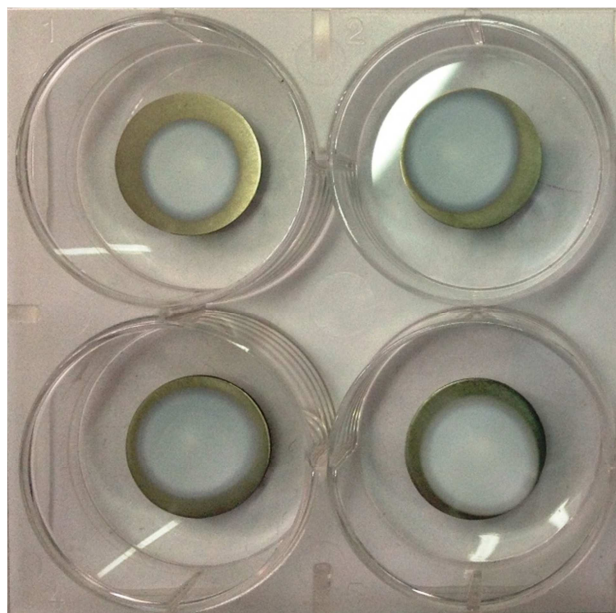
Se realizó un análisis cualitativo comparativo para la caracterización morfológica y para la caracterización química con el fin de determinar qué elementos muestrales son diferentes de otros en función de cantidad de formación de apatita y absorción de proteína evaluado para los 4 grupos.

## 3. Resultados

### 3.1 Electrodeposición hidroxapatita

Para obtener la preparación de la solución de hidroxapatita fue suficiente 1 único ensayo (**Fig. 3**) consistente en: 0,6 gr de hidroxapatita disueltos en 10ml Etanol al 95% (HA1), Se realizo el proceso de electrodeposición con el sobrenadante de la solución de Hidroxapatitasiguiendo los parámetros de procesamiento referenciados en el artículo de Thiana y colaboradores (35) ver tabla 3-1-1. Obteniendo un recubrimiento uniforme y con adecuada conductividad para el proceso de deposición mediante la técnica de electrospray.

**Figura 3:** Sustratos recubiertos con hidroxapatita.



**Tabla 3-1-1:** Parámetros de procesamiento de HA.

PARÁMETRO	CIFRA DEFINITIVA
Distancia Aguja-Sustrato	2.5 cm
Flujo	1,2 ml/h
Voltaje	5 KV
Corriente eléctrica	20 $\mu$ A
Tiempo de deposición	10 Min

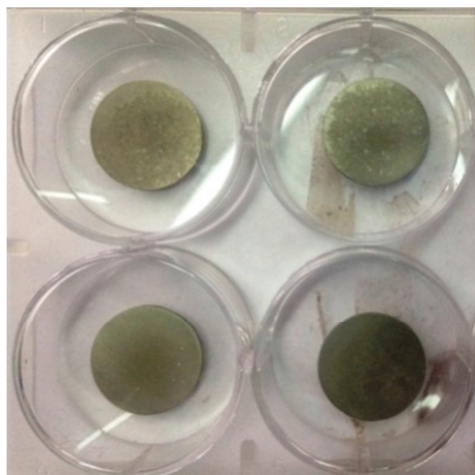
### 3.2 Electrodeposición alginato

Para obtener la adecuada solución con alginato fue necesario realizar 8 ensayos descritos en la tabla 3.2.1. Observando que la concentración de soluto y solvente, el tiempo y el mecanismo de preparación para la mezcla influyen circunstancialmente para que no se presente precipitación y además permitiera una correcta conductividad eléctrica logrando así una configuración cono-chorro spray y un recubrimiento uniforme.

Con la formula realizada inicialmente diluyendo 0,05g de Alginato en polvo + 5ml de etanol al 95% (ensayo A6) y dejando en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas se observo una solución en gel que no presentaba precipitación sin embargo no era conductora y adicionalmente no se obtuvo una conformación de cono-chorro estable, por lo tanto a la solución anterior fue necesario adicionar 2ml de solución salina al 0.9% +2ml de etanol (Ensayo 8). Con este nuevo ensayo durante la exposición a la técnica de electrospray se obtuvo una configuración adecuada y un recubrimiento homogéneo (**Fig. 4**) por lo tanto se procedió a

realizar el recubrimiento durante 45 minutos con los parámetros de recubrimiento establecidos en la tabla 3-2-2.

**Figura 4:** Sustratos recubiertos con Solución de alginato.



**Tabla 3-2-1:** Parámetros de procesamiento de alginato.

PARÁMETRO	CIFRA DEFINITIVA
Distancia Aguja-Sustrato	3 cm
Flujo	1,5 ml/h
Voltaje	11 KV
Corriente eléctrica	40 $\mu$ A
Tiempo de deposición	45 in

**Tabla 3-2-2:** Ensayos de solución de alginato.

ENSAYO	POLÍMERO/ CANTIDAD	DISOLVENTE/ CANTIDAD	PREPARACION PARA MEZCLA	RECUBIMIENTO EN ELECTROESPRAY	RESULTADO
<b>A1</b>	Alginato polvo0,0010g	H2O destilada 5ml + Etanol 95% 5ml	Ultrasonido 10 minutos a 30°C	NO	Precipitación
<b>A2</b>	Alginato polvo0,0010g	Solución salina 0.9%, 5ml + Etanol 95% 5ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
<b>A3</b>	Alginato polvo0,0010g	H2O destilada 7ml + 0,025mg polivinilpirrolidona	20 minutos de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
<b>A4</b>	Alginato polvo0,05g	Etanol 95% 10ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	SI	Patrón de recubrimiento de solo Etanol
<b>A5</b>	Alginato polvo0,05g	H2O destilada 5ml	24 horas de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
<b>A6</b>	Alginato polvo0,05g	Etanol 95%5ml	24 horas de reposo al medio ambiente	SI	No formación de cono estable
<b>A7</b>	Ensayo A6 2ml	Etanol 95%2ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	SI	Obstrucción Capilar de conducción
<b>A8</b>	Ensayo A6 4ml	Solución salina 0.9%, 2ml + Etanol 95%, 2ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	SI	Adecuado patrón de recubrimiento

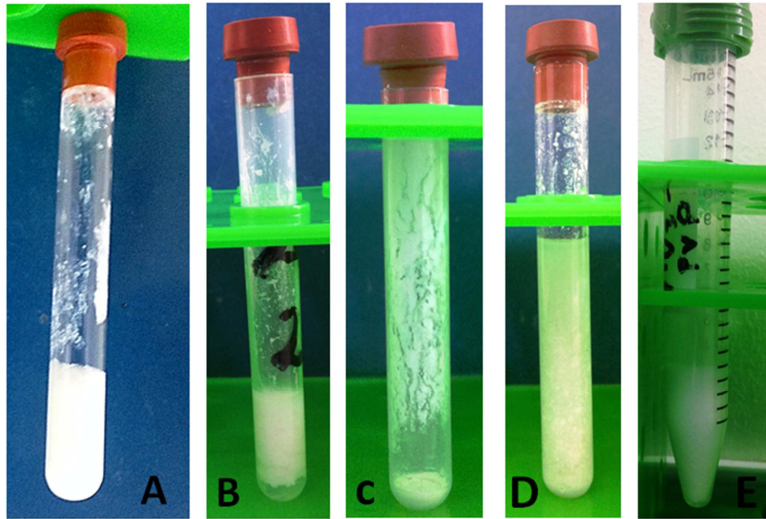
### 3.3 Electrodeposición compuesto hidroxiapatita/alginate

Tabla 3-3-1: Ensayos compuesto hidroxiapatita/alginate.

ENSAYO	POLÍMERO/ CANTIDAD	DISOLVENTE/ CANTIDAD	PREPARACION PARA MEZCLA	RECUBIMIENTO EN ELECTROESPRAY	RESULTADO
1	Solución A80,8ml	Solución HA1 0,8ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
2	Solución A81ml	Solución salina 0.9%, 0.5ml + solución HA1 1,5ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
3	Alginato polvo0,0010g	solución HA1 1,5ml	20 minutos de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
4	Solución A62.5ml	Solución salina 0.9%, 1.25ml + Alginato polvo0,3g	20 minutos de reposo al medio ambiente	NO	Precipitación
5	Solución A810ml + H2O destilada 5ml	solución HA1 10ml	Ultrasonido 20 minutos a 30°C	SI	No formación de cono estable
6	Solución A81ml	H2O destilada 3ml, Etanol 95%2ml, hidroxiapatita polvo 2gr	20 minutos de reposo al medio ambiente	SI	Adecuado patrón de recubrimiento

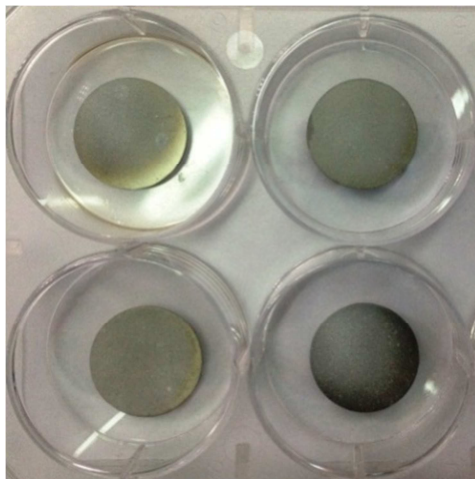
Se realizaron 6 ensayos descritos en la tabla 3.3.1. En los primeros 4 ensayos se observaba que la unión de las dos soluciones no presentaban adecuada dilución y por el contrario presentaban precipitación (**Fig. 5**). Se observó que la mezcla entre polímero y disolvente con la que se obtuvieron mejores resultados fue el ensayo # 6 y adicionalmente presento una adecuada dispersión sobre los discos de titanio (**Fig.6**) al someterse a la técnica de electro spray con los parámetros descritos en la tabla 3.3.2.

**Figura 5:** Ensayos de compuesto hidroxiapatita/alginato.



**A.** Ensayo # 1. **B.** Ensayo # 2 **C.** Ensayo # 3 **D.** Ensayo # 4; se observa precipitación de las soluciones.  
**E.** Ensayo # 6: se observa adecuada integración de los elementos de HA y alginato sin precipitación.

**Figura 6:** Sustratos recubiertos con compuesto hidroxiapatita/alginato





**Tabla 3-3-2:** Parámetros de procesamiento de compuesto hidroxiapatita/alginato:

PARÁMETRO	CIFRA DEFINITIVA
Distancia Aguja-Sustrato	3 cm
Flujo	1,5 ml/h
Voltaje	10 KV
Corriente eléctrica	30 $\mu$ A
Tiempo de deposición	15 in

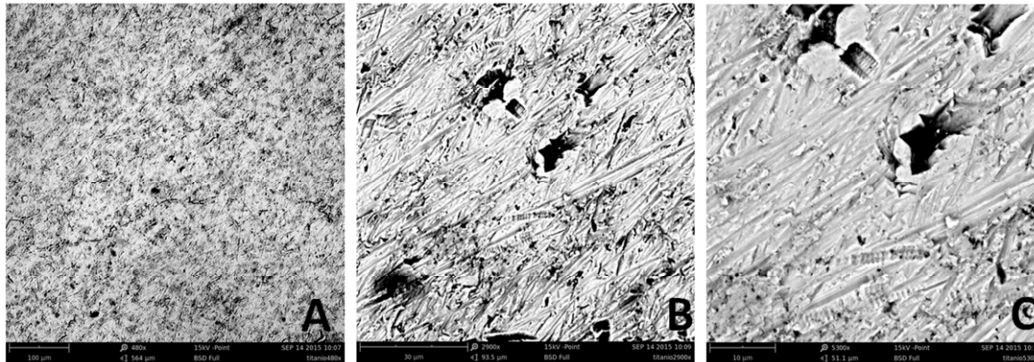
### 3.4 Caracterización

#### 3.4.1 Microscopio electrónico de barrido

##### Titaniosin recubrimientoal SEM

Las muestras del grupo control que no presentaban ningún recubrimiento de superficie se les realizó caracterización morfológica mediante microscopio electrónico de barrido SEM a 500, 3000 y 5000x (**Fig. 7**), Observándose que el titanio presenta múltiples grietas, alteraciones en la topografía resultado del proceso de limpieza con los diferentes materiales metalográficos, estas a manera de grietas y fisuras con profundidades variables.

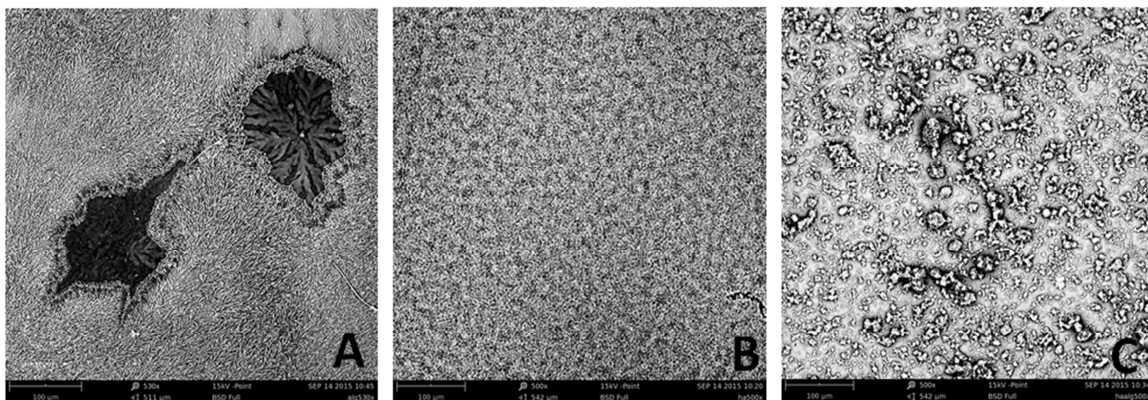
**Figura 7:** Micrografía de Sustrato de Ti sin recubrimiento al SEM. **A.** 500x, **B.** 3000x y **C.** 5000x



### Sustratos recubiertos HA, alginato y compuesto HA/alginato a 500x

En un acercamiento a 500x se puede evaluar que el sustrato que presenta recubrimiento con Alginato ha presentado desprendimiento del material posterior al tratamiento térmico. Presentando un porcentaje de recubrimiento cercano al 70%. Para el grupo de sustratos biofuncionalizados con hidroxiapatita y el compuesto hidroxiapatita/ alginato se observa un porcentaje de recubrimiento del 100% sin desprendimiento del material depositado

**Figura 8:** Micrografía de Sustrato con recubrimiento al SEM. 500x

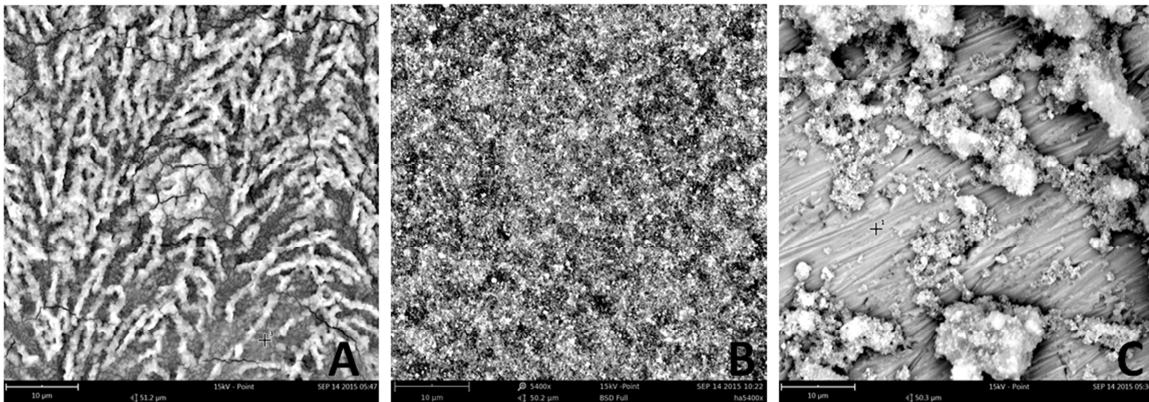


**A.** Recubrimiento con Alginato **B.** Recubrimiento con HA. **C.** Recubrimiento compuesto HA/alginato

### Sustratos recubiertos HA, alginato y compuesto HA/alginato a 3000x y 5000x

Para evaluar la morfología del recubrimiento se realizó un acercamiento a 3000x y 5000x. Donde se evidencio que el recubrimiento con alginato (Fig. # 8 A) presenta con configuración similar a fibras, con presencia de grietas y fisuras. Por otro lado el recubrimiento con hidroxapatita presenta una disposición mas homogénea con mayor superficie de sustrato recubierto sin embargo no presenta una rugosidad tan marcada como los sustratos recubiertos con HA/alginato. El anterior se observa en la Fig. 9 C sin grietas ni fisuras, con zonas alternante de baja rugosidad y rugosidad pronunciada.

**Figura 9:** Micrografía de Sustrato con recubrimiento al SEM. 5000x

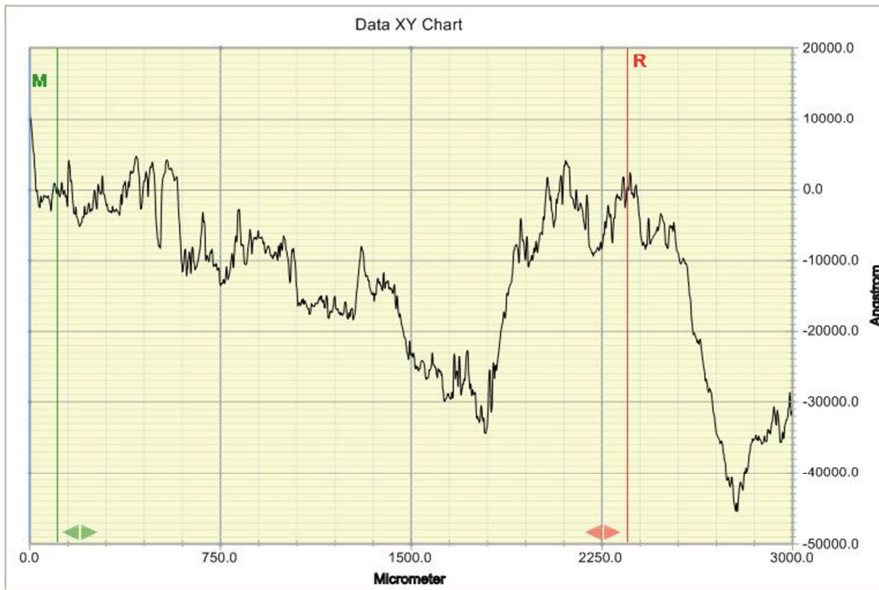


**A.**Recubrimiento con alginato **B.** Recubrimiento con HA. **C.**Recubrimiento compuesto HA/alginato

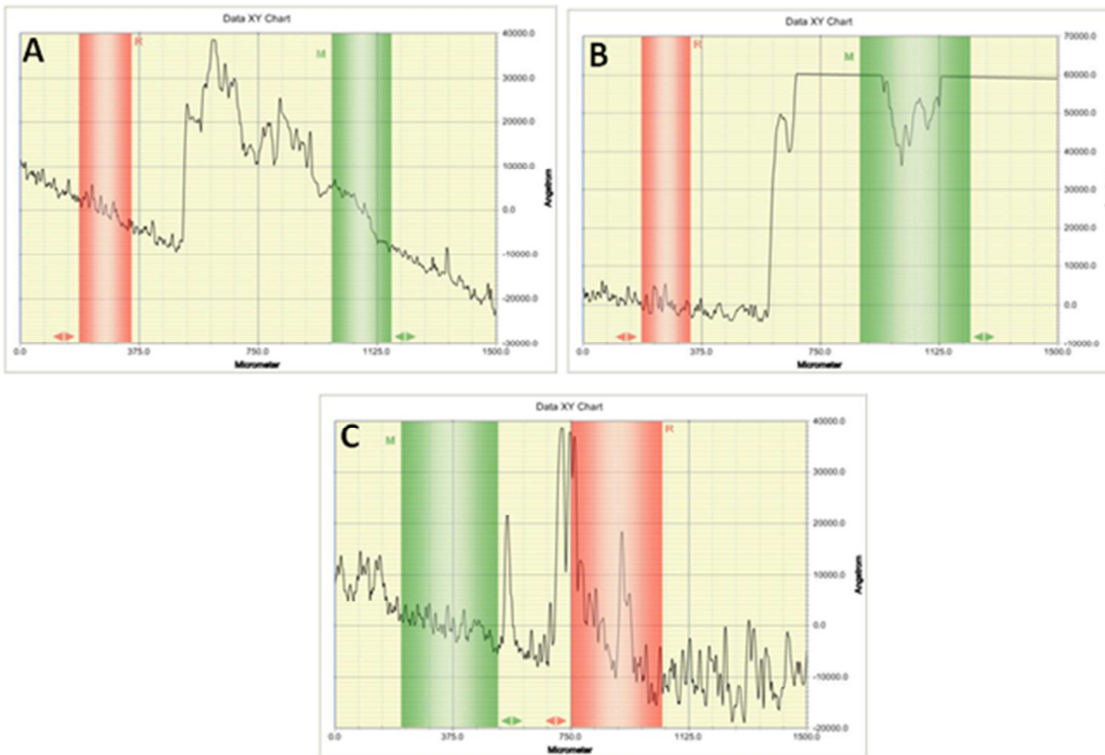
#### 3.4.2 Perfilometria

Se tomaron para cada muestra 3 puntos al azar. Inicialmente se evaluó el grupo control (sustratos de titanio sin recubrimiento) observando que el Ti presenta picos y valles relacionado con tratamiento de limpieza de los discos.

**Figura 10:** Grafica perfilométrica de grupo control (Ti sin recubrimiento)



**Figura 11:** Grafica perfilométrica de los sustratos con recubierto.



**A.** Recubrimiento con alginato **B.** Recubrimiento con HA. **C.** Recubrimiento compuesto HA/alginato

Al realizar la comparación de los diferentes grupos de sustratos con recubrimiento se puede resaltar que el compuesto hidroxiapatita/alginate presenta mayor número de rugosidades e irregularidades en la superficie, presentando picos muy pronunciados seguidos de valles. Complementariamente presenta un espesor promedio de recubrimiento de 1833,213 micras, siendo el recubrimiento con mayor espesor (**Fig. 11 C**).

Al realizar la valoración de los sustratos biofuncionalizados con alginato se observó que presenta un espesor promedio de 80,8423 micras, adicionalmente se observa una irregularidad de la superficie intermedia (**Fig. 11 A**).

Para el grupo correspondiente a los sustratos recubiertos con hidroxiapatita se observó que presenta pocas zonas de irregularidad, disminución de frecuencia de picos y valles, sin embargo el espesor promedio para este grupo es de 1223,2705 micras, lo que significa que el recubrimiento es aproximadamente 1.5 veces mayor al grupo biofuncionalizado con alginato (**Fig. 11 B**).

## **3.5 Pruebas de biocompatibilidad**

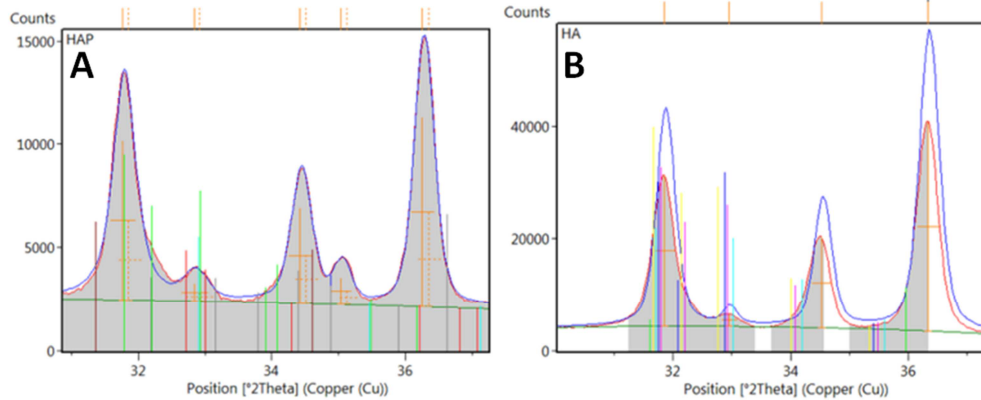
### **3.5.1 Prueba de biocompatibilidad control positivo (Apatita bone-like)**

El sustrato de titanio sin biofuncionalizar y los 3 sustratos recubiertos con alginato, hidroxiapatita y compuesto hidroxiapatita/alginate fueron sumergidos durante 25 días en lactato de Ringer al 30% como un fluido corporal simulado (SBF), posteriormente se evaluó la formación de apatita bone-like realizándose la caracterización química por medio de difracción de rayos X.

Para evitar sesgos al evaluar la formación de apatita con los grupos que contienen recubrimiento con hidroxiapatita y compuesto hidroxiapatita/alginate. Se realizó difracción de rayos X a la hidroxiapatita en polvo que fue utilizada para los recubrimientos y se comparó con el sustrato recubierto con hidroxiapatita

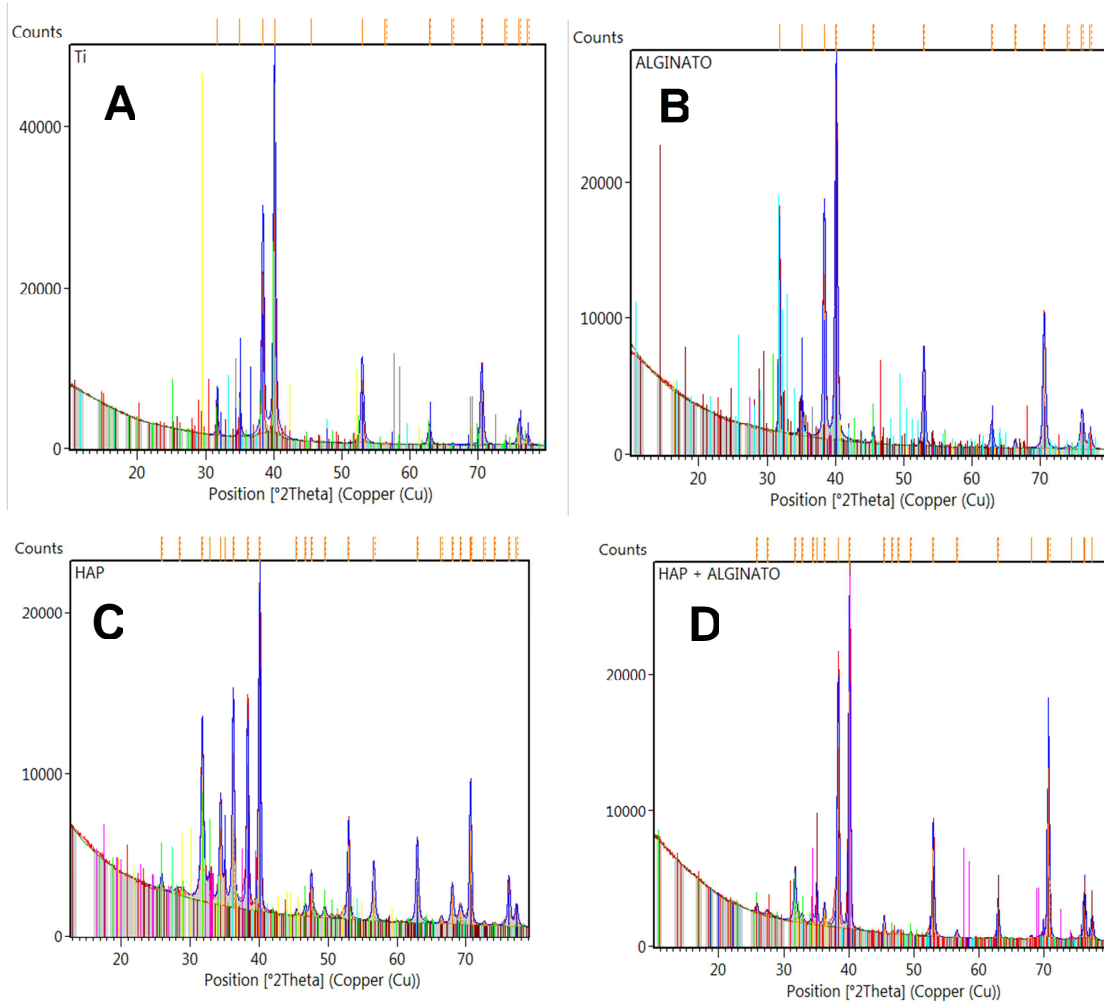
sumergido en el SBF, donde se observó un patrón similar en los ángulos de difracción entre 30 y 36° (**Fig. 12**). Estos picos evaluados por medio de la base Pdf2 concuerdan con dos tipos de hidroxiapatita, hidrato fosfato de calcio  $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_2$  e hidróxido fosfato de calcio  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

**Figura 12:** Difractograma **A.** sustratos con recubierto HA. **B.** hidroxiapatita en polvo



Al realizar el análisis comparativo (**Fig. 13**), se observa un patrón similar en los ángulos de difracción entre en las 4 muestras que exhibieron líneas de difracción en 35, 38, 40, 53, 63, 71, 76 y 77°, que caracterizan la fase hexagonal del óxido de titanio correspondiente al material de los discos.

**Figura 13:** Difractograma prueba de apatita bone-like



- 1) **Ti** sin recubrimiento **B.** Recubrimiento con alginato. **C.** Recubrimiento con HAD. Recubrimiento con compuesto HA/alginato

Los cuatro sustratos presentan formación de apatita en sus diferentes fases de formación. Los discos de Ti sin recubrimiento presentan titanato de sodio romboédrico, sin embargo no se observa titanato de calcio. Hay presencia de formación de hidróxido fosfato de calcio (apatita), magnesio mas no de sodio.

Para los recubrimientos con hidroxiapatita se observa formación de titanato de sodio, titanato de calcio con una configuración ortorrómbico. También se observa formación de fosfato de calcio hexagonal.

En el grupo compuesto de hidroxiapatita/alginate, hay formación de titanato de sodio en mayor concentración que los sustratos recubiertos con HA, presencia de titanato de calcio. La formación de apatita se observa como fosfato de calcio hexagonal similar a la encontrada en el grupo de recubrimientos con hidroxiapatita únicamente.

El recubrimiento que presento mayor formación de titanato de calcio fue el recubrimiento con alginate, también presento formación de titanato de sodio, hidroxifosfato de calcio Hexagonal en menor medida comparativamente que los recubrimientos con HA y compuestos HA/alginate pero en mayor medida que titanio sin recubrimiento.

La configuración cristalografía para el fosfato de calcio en los 4 grupos es de tipo hexagonal.

**Tabla 3-5-1:** prueba apatita bone-like, comparación de sustratos mediante difracción rayos X

	TitanatoNa	Configuración cristalográfica	Titanato Ca	Configuración cristalográfica	Hidroxi fosfato de calcio	Na	Mg
<b>Sin recubrimiento</b>	+	Romboédrico	-		+	-	++
<b>Alginate</b>	+	Romboédrico	+++	Cubico	++	+	+
<b>Hidroxiapatita</b>	++	Anortico	++	Ortorrómbico	+++	++	++
<b>Compuesto HA/alginate</b>	+++	ortorrómbico	++	Orthorhombic	+++	+	++

*\*Análisis realizado por medio de HighScore Plus.*

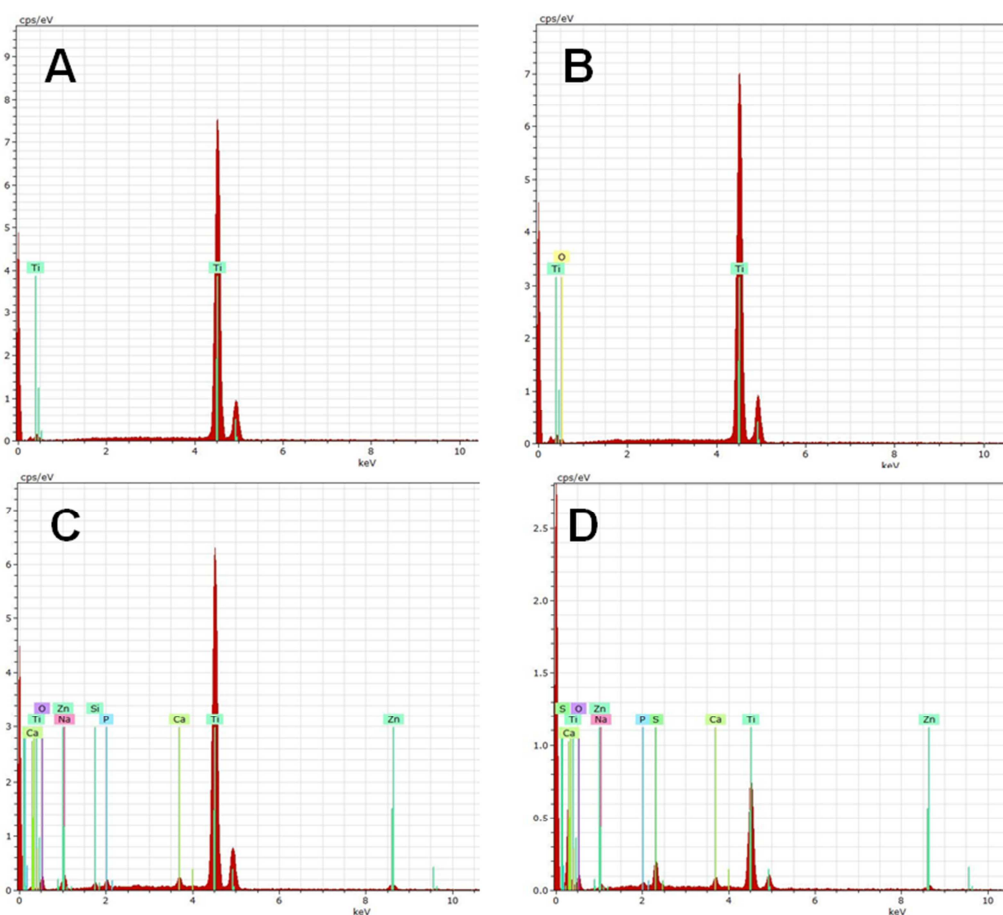


### 3.5.2 Prueba de biocompatibilidad control negativo (Adsorción proteínas)

Se realizó una prueba de adsorción de proteínas, por lo cual se tomaron 3 discos de Ti recubiertos con HA, 3 discos de Ti recubiertos con alginato, 3 discos de Ti recubiertos con compuesto hidroxiapatita/alginato y 3 discos controles y se sumergieron en 2.1 ml de Albúmina Bovina 30% a temperatura ambiente.

Se observó que para ninguno de los 4 grupos presentó adsorción de albumina al realizar la evaluación química básica mediante el análisis con sonda de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (**Fig. 14**).

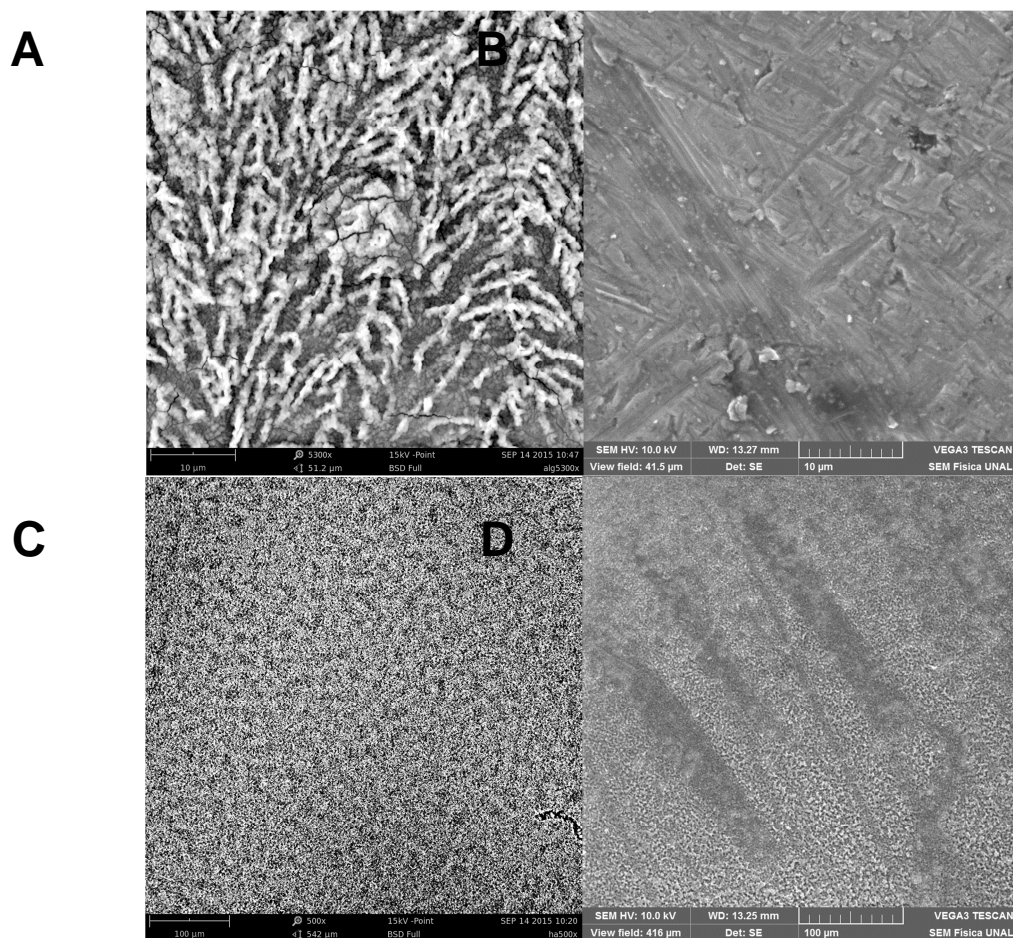
**Figura 14:** EDS, prueba de adsorción de proteínas



**A.** Ti sin recubrimiento **B.** Recubrimiento con alginato. **C.** Recubrimiento con HA **D.** Recubrimiento con compuesto HA/alginato

Se observa que el análisis del recubrimiento no presenta ninguna diferencia en su composición química con respecto a los sustratos de titanio sin recubrimiento. Las muestras de hidroxiapatita y compuesto hidroxiapatita/alginato presentan los mismos elementos químicos dado por la composición de la hidroxiapatita en ambas muestras. Sin embargo, las muestras revestidas con el compuesto hidroxiapatita/alginato presentan azufre (S) en un 2.63% en sus componentes relacionado con un componente de la albumina que no es significativo, dado que no presenta ningún otro componente relacionado con la misma.

**Figura 15:** SEM antes y después de prueba adsorción de proteínas



**A.** Alginato 3000x **B.** Alginato 3000x prueba ED **C.** HA 500x **D.** Alginato 3000x prueba EDS

En la figura 15 se observa la comparación en el SEM de los recubrimientos de alginato e hidroxiapatita antes y después de ser sumergidos en albumina para la realización de la prueba de adsorción de proteínas. Se observa que ambos grupos presentaron desprendimiento del material de recubrimiento sobre todo las muestras pertenecientes al grupo de recubrimiento con alginato.

## 4) **Discusión**

La fusión de la superficie de un implante dental con el hueso circundante juega un papel crucial en la longevidad y la función de la prótesis sobre implantes. De hecho, el evento biológico más importante en la fase de curación clínica de los implantes dentales es la adhesión celular en la interfase entre el tejido huésped y el implante. Esta unión estructural y funcional del implante con el hueso está muy influenciada por las propiedades de la superficie del implante. En realidad, el éxito de un implante dental es altamente dependiente de sus características químicas, físicas, mecánicas y topográficas de su superficie. Estas diferentes propiedades interactúan y determinan la actividad de las células unidas que se acercan a la superficie del implante dental (42-43). Se informó que la fijación primaria del implante es fuertemente afectada por las características de diseño y la macro-escala del implante, mientras que las micro y nano-características afectan la respuesta celular. Ellos controlan el reclutamiento celular, la adhesión, la orientación, la morfología, la formación de contacto focal, la organización del citoesqueleto e incluso la expresión de genes. Por otra parte, la absorción de proteínas y la conformación también son moduladas por nanorugosidades de superficie. Además, las nanorugosidades no aumentan el riesgo de contaminación bacteriana (43).

El proceso de modificación de la superficie principal que se utiliza actualmente para la realización de los implantes dentales en bruto son: revestimientos porosos

por pulverización de plasma de Ti o sinterización, superficies con chorro de arena, grabado ácido de superficies; superficies arenadas, láser de superficies para obtener modificaciones en micro y nanoestructuras, superficies anodizadas, obtenidos por oxidación electroquímica en varios electrolitos y resultando en capas de óxido de titanio poroso, enriquecido con diferentes iones, tales como calcio o fósforo (44-45-46).

En el presente estudio se utilizó una novedosa técnica consistente en un proceso de generación de gotas y carga simultánea por medio de un campo eléctrico, llamado electrospray. Este es un método de atomización de líquido por fuerzas eléctricas, donde se producen gotitas que se auto-dispersan. Las gotas producidas por electrospray están altamente cargadas, lo que impide su coagulación y promueve la auto-dispersión. Las gotitas pueden ser extremadamente pequeñas en casos especiales por debajo de nanómetros lo que permiten realizar recubrimientos sobre la superficie de titanio (9).

Para obtener los parámetros adecuados en el proceso de deposición por medio de la técnica de electrospray realizamos diferentes ensayos con las soluciones de alginato y el compuesto hidroxiapatita/alginato.

Sin embargo el recubrimiento que no presentó inconvenientes tanto en la preparación de la solución como en la electrodeposición fue la hidroxiapatita. Los fosfatos de calcio, en particular los revestimientos de hidroxiapatita, se han utilizado ampliamente debido a su gran parecido con la fase mineral inorgánica que se encuentra en los huesos y los dientes, así como su capacidad para promover la aposición ósea directa. Hasta ahora, los implantes metálicos recubiertos de HA han sido el enfoque más exitoso (27). Para el proceso de electrodeposición de hidroxiapatita tomamos como base los parámetros establecidos por Thiana et al. En su trabajo reportan que el proceso de deposición de nano partículas de HA se llevó a cabo a temperatura ambiente. La suspensión de nanopartículas de HA fue forzada a través de la aguja utilizando una bomba de

jeringa automática a una tasa de flujo de 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se aplicó un voltaje de 4,7 KV entre la aguja y el sustrato de Ti y se utilizó un tiempo de pulverización de 60 s. La distancia entre la aguja y el sustrato se mantuvo a 20mm. En estos parámetros de procesamiento, se logró un modo de cono de chorro estable y por lo tanto, se produjo un revestimiento uniforme. A diferencia de nuestro proceso de electrodeposición se utilizó un tiempo de deposición de 10 minutos dado que con tan solo 60s no se observaba un recubrimiento homogéneo.

Thiana et al. Reporta que estos recubrimientos de nanopartículas de HA fueron luego tratadas con calor a 124 ° C durante 2 h. en comparación con nuestro ensayo, se realizó una prueba piloto observando que el recubrimiento expuesto a esta temperatura no presentaba una adecuada fijación al sustrato por lo tanto se realizó un tratamiento con calor a temperaturas de 60, 120, 180, 240°C las cuales iban aumentando gradualmente en un tiempo de 5 minutos y finalmente una temperatura constante a 600°C durante 20 minutos para completar un total de 45 minutos donde se obtuvo una adecuada fijación.

Por otra parte para la obtención de la solución de alginato fue necesario realizar 8 ensayos (tabla 3.2.1). Observando que la concentración de soluto y solvente, el tiempo y el mecanismo de preparación para la mezcla influyen circunstancialmente para que no se presente precipitación y además permita una correcta conductividad eléctrica logrando así una configuración cono-chorro spray y un recubrimiento uniforme.

Con la fórmula realizada inicialmente diluyendo 0,05g de alginato en polvo + 5ml de etanol al 95% (ensayo A6) y dejando en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas se observó una solución en gel que no presentaba precipitación sin embargo no era conductora y adicionalmente no se obtuvo una conformación de cono-chorro estable, por lo tanto a la solución anterior fue necesario adicionar 2ml de solución salina al 0.9% +2ml de etanol (Ensayo 8). Con este nuevo ensayo durante la exposición a la técnica de electrospray se obtuvo una configuración

adecuada y un recubrimiento homogéneo. Los parámetros utilizados para la electrodeposición se basaron en los estudios previos de Clavijo y colaboradores(11): los parámetros que no se modificaron fueron el diámetro de la aguja: 0.8mm, la velocidad de flujo: 1.5ml/h, el microamperaje: 40  $\mu$ A y tiempo de deposición durante 45 minutos. Sin embargo se observó que con una distancia aguja-sustrato: de 3cm, un voltaje de 11KV se obtenía una mejor configuración cono-chorro spray a diferencia de la distancia aguja sustrato de 12cm y el Voltaje de la aguja a 20KV referidos por Clavijo y colaboradores.

Para realizar la fijación del alginato a los sustratos se tuvo en cuenta que los polímeros cambian de fase a diferentes temperaturas y el cambio vítreo del alginato está entre 200 y 300 grados(30 - 31). Por lo tanto las muestras fueron llevadas al horno iniciado desde 60°C aumentando en intervalos de 60°C hasta completar 240°C, las cuales iban aumentando gradualmente en un tiempo de 5 minutos para completar un total de 25 minutos. Se observó una adecuada fijación con los parámetros mencionados sin embargo de las 4 muestras 1 presentó desprendimiento del material en casi un 40%.

Al analizar los resultados del tratamiento térmico recibido en ambos grupos, se puede evidenciar que para la fijación de los recubrimientos de hidroxiapatita a los sustratos, un tratamiento con calor a temperaturas de 60, 120, 180, 240°C y 600°C durante un total de 45 minutos es adecuado. Sin embargo para realizar la fijación del alginato a los sustratos, una temperatura máxima de 240°C puede ser elevada dado que se observa desprendimiento de un porcentaje considerable del material de recubrimiento.

Finalmente para obtención del compuesto hidroxiapatita/alginato se realizaron 6 ensayos descritos en la tabla 3.3.1. En los primeros 4 ensayos se observaba que al mezclar las dos soluciones presentaban precipitación. Se observó que la mezcla entre polímero y disolvente con la que se obtuvieron mejores resultados fue el ensayo # 6 consistente en solución de alginato utilizada para los recubrimientos

del grupo de alginato a la cual se le adiciono 3ml de H<sub>2</sub>O destilada, 2ml de Etanol al 95%, 2gr hidroxiapatita en polvo. No se encontró en la literatura parámetros para realizar la electrodeposición del compuesto hidroxiapatita/alginato mediante la técnica de electrospray por lo tanto se utilizaron parámetros de recubrimiento intermedios con las siguientes características: el compuesto fue forzado a través de la aguja utilizando una bomba de jeringa automática a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min. Se aplicó un voltaje de 10 KV entre la aguja y el sustrato de Ti, con una corriente eléctrica de 30  $\mu$ A y se utilizó un tiempo de deposición de 15 minutos. La distancia entre la aguja y el sustrato se mantuvo a 3cm. De esta manera se logro obtener un adecuado recubrimiento sobre los sustratos de Ti. Para obtener una adecuada fijación del compuesto a los discos de titanio se tomo en cuenta los parámetros de tratamiento térmico incluidos para el grupo de sustratos recubiertos con hidroxiapatita únicamente y se observo una adecuada fijación del mismo.

Al evaluar la caracterización morfológica de los sustratos cabe destacar que las muestras recubiertas con el compuesto hidroxiapatita/alginato son las que presentan mayor número de zonas alternantes de baja rugosidad y rugosidad pronunciada, sin presencia de grietas ni fisuras. El hecho de que el recubrimiento no sea homogéneo y que la rugosidad sea irregular es propicio para la adhesión y proliferación de las células del linaje óseo. Este rango de rugosidad maximiza el enclavamiento entre el hueso mineralizado y la superficie del implante (11).

Complementariamente el recubrimiento compuesto hidroxiapatita/alginato presenta un espesor promedio de 1833,213 micras, siendo el recubrimiento con mayor espesor. Teniendo en cuenta que las superficies en el rango *nanométrico* juegan un papel importante en la adsorción de proteínas, adhesión de las células osteoblásticas y por lo tanto la tasa de oseointegración. Sin embargo, esta topografía es difícil de producir con tratamientos de superficie. Además, la superficie topografía nano óptima para la adsorción selectiva de proteínas que



conducen a la adhesión de las células osteoblásticas y la rápida aposición ósea es desconocida.

Al observar al SEM y en el análisis perfilométrico, el recubrimiento con alginato, presenta una configuración similar a fibras, con presencia de grietas y fisuras. Con espesor promedio de 80,8423 micras siendo este el que presenta menor espesor de los 3 recubrimientos. Por una parte esta característica puede ser beneficiosa dado que la respuesta del tejido es dictada principalmente por procesos controlados en nanoescala(3). Sin embargo también pueden presentar complicaciones como en este caso desprendimiento del alginato en un 30% en el acercamiento comparativo a 500x en el SEM. Teniendo en cuenta que los recubrimientos deben tener una fuerte adhesión al implante y una buena fijación al hueso. Su microestructura y su tasa de disolución deben ser programados para coincidir con el proceso de curación in vivo, adicionalmente que puedan servir de modelo para el suministro in situ de las drogas y los factores de crecimiento en los momentos requeridos (3).

Por otro lado el recubrimiento con hidroxiapatita presenta una disposición más homogénea con mayor superficie de sustrato recubierto. Presenta pocas zonas de irregularidad, disminución de frecuencia de picos y valles en comparación con los recubrimientos de alginato y compuesto hidroxiapatita/alginato. Presenta un espesor de aproximadamente 1.5 veces mayor (1223,2705 micras) que el grupo biofuncionalizado con alginato por lo cual no presento desprendimiento de los sustratos.

#### **4.1 Pruebas de biocompatibilidad**

Los sustratos con los diferentes recubrimientos se evaluaron mediante pruebas de biocompatibilidad indirecta de control positivo y negativo. La prueba de control positivo se realizó mediante la observación de formación de apatita similar al hueso (apatita bone-like) en su superficie después de la inmersión en SBF. Para un

material artificial unirse al hueso vivo, es esencial que tenga la capacidad de formar una capa de apatita similar al hueso biológicamente activa en su superficie (47).

La prueba de control negativa fue evaluada por la adsorción de proteínas, este es el evento casi inmediato que se produce tras la implantación de los metales y media la respuesta celular y las interacciones posteriormente entre el implante y el tejido (48). Además, se reconoce ampliamente que un determinante importante de la interfase hueso- biomaterial es la unión inicial, propagación y el crecimiento de los osteoblastos en la superficie del implante y que las mejoras en estos procesos pueden conducir a una integración más rápida y más extensa aumentando la estabilidad del implante a largo plazo (49).

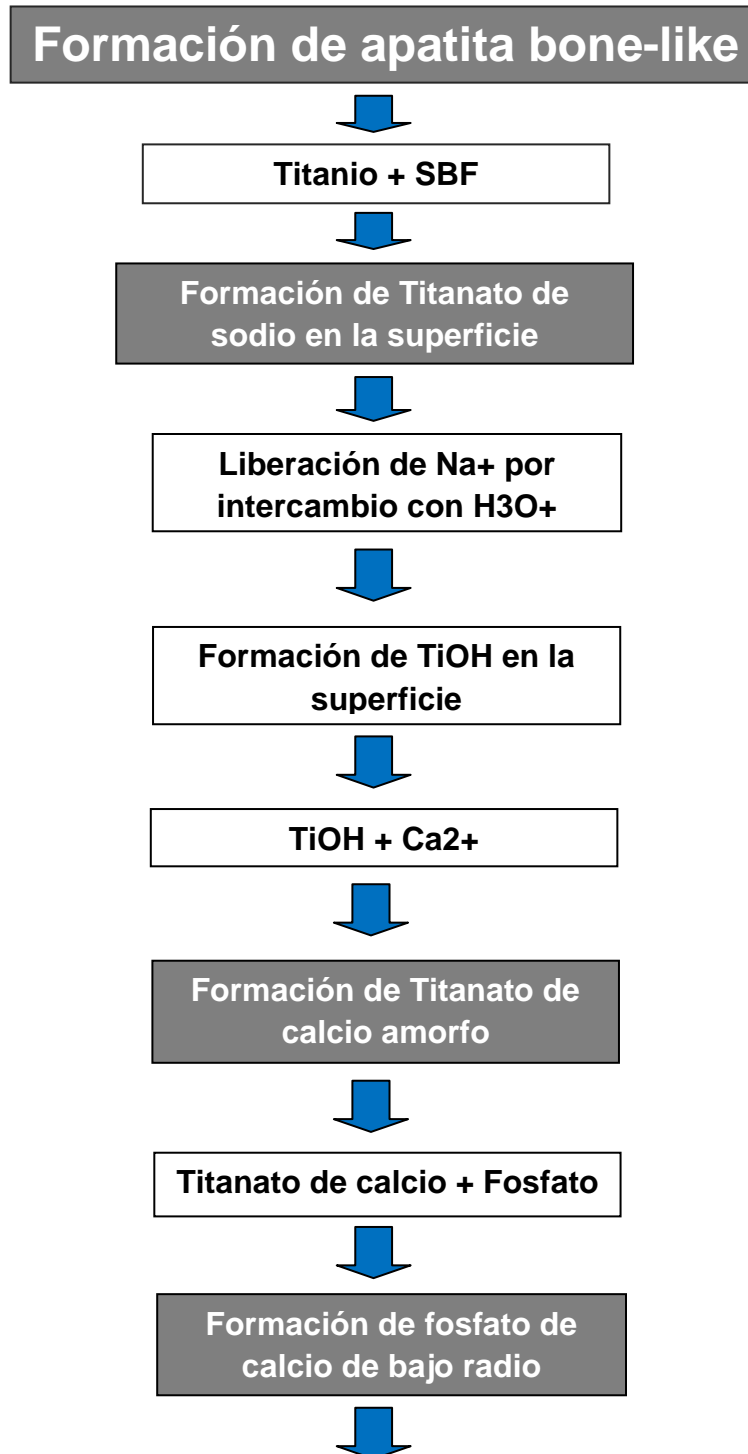
Las pruebas in vitro de la adsorción de proteínas ahora están bien establecidos para evaluar la biocompatibilidad de los biomateriales y son ampliamente utilizados para evaluar la osteointegración de las aleaciones de titanio (49-50). Además, el mejor rendimiento de la formación de apatita en aleación de titanio en SBF in vitro fue confirmada por el efecto benéfico sobre la osteoconducción en el experimento in vivo realizado por Lu et al. (51).

### **Prueba apatita bone-like:**

El mecanismo por el cual se forma apatita cuando un sustrato de titanio es sumergido en SBF fue explicado en el trabajo de L. Hao L. Lawrence L (**ver figura 16**). En un modelo diferente mediante la técnica de caracterización XPS (47): el mecanismo de la formación de apatita inicia como titanato de sodio amorfo formado en el metal de titanio. En el SBF, el titanato de sodio libera iones de  $\text{Na}^+$  a través del intercambio con iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  en el líquido para formar grupos  $\text{Ti-OH}$  en su superficie. Los grupos  $\text{Ti-OH}$  formados se combinan inmediatamente con iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el fluido para formar titanato de calcio amorfo. Este titanato de calcio más tarde se combina con iones fosfato en el líquido para formar fosfato de calcio amorfo con una baja relación  $\text{Ca}:\text{P}$ . El fosfato de calcio se transforma en

apatita, que exhibe una relación Ca: P de 1,65 y contiene una pequeña concentración de Mg y Na, similar al mineral ósea (52).

**Figura 16:** Mecanismo formación apatita bone-like



Fosfato de calcio con  
aumento en el radio Ca:P



**Formación de HA** cuando la relación Ca:P es de 1,65 y  
contiene pequeñas cantidades de Mg y Na

un valor máximo positivo. A partir de entonces, se redujo al aumentar el tiempo de remojo, alcanzó un valor negativo de nuevo y finalmente convergido a un valor negativo constante. Los grupos Ti-OH formados en la superficie de titanato de sodio después de la inmersión en SBF están cargadas negativamente y, por lo tanto, combinar selectivamente iones  $\text{Ca}^{2+}$  cargado positivamente en el líquido para formar titanato de calcio. A medida que los iones de calcio se acumulan en la superficie, la superficie adquiere gradualmente una carga global positiva. Como resultado, la superficie cargada positivamente se combina con los iones fosfatos cargados negativamente para formar fosfato de calcio amorfo. Este fosfato de calcio se transforma espontáneamente en la apatita, debido a que la apatita es la fase estable en el medio ambiente corporal (47).

En nuestro estudio el sustrato de titanio sin biofuncionalizar y los 3 sustratos recubiertos con alginato, hidroxiapatita y compuesto hidroxiapatita/alginato fueron sumergidos durante 25 días en SBF teniendo en cuenta la evaluación de L. Hao L. Lawrence L. con el fin de alcanzar un valor negativo constante en el cual los grupos Ti-OH formados en la superficie de titanato de sodio se combinen selectivamente con iones  $\text{Ca}^{2+}$  cargado positivamente en el líquido para lograr la formación de titanato de calcio y de esta manera favorecer la formación de apatita.

Los patrones de difracción de rayos x observados, muestran la presencia de hidroxiapatita (hidroxi-fosfato de calcio con una configuración cristalográfica hexagonal) en las cuatro condiciones evaluadas. Se empleó el criterio de la altura media de la intensidad de la curva de difracción, donde se evidencia que el grupo

donde se presento mayor formación de HA fueron los grupos recubiertos con hidroxiapatita y el compuesto hidroxiapatita/alginate. Cabe destacar que como los dos recubrimientos que presentaron mayor formación de apatita se encontraban recubiertos con hidroxiapatita, para evitar resultados erróneos se realizo difracción de rayos X a la hidroxiapatita en polvo que fue utilizada para los recubrimientos y se comparo con los recubrimientos sumergidos en el SBF, donde se observo un patrón similar en los ángulos de difracción entre 30 y 36° (**Fig. 12**). Teniendo en cuenta lo anterior se pudo evaluar que las muestras correspondientes a los recubrimientos de HA y compuesto HA/alginate muestran alturas de intensidad de la curva de difracción mas elevadas, patrones de hidroxifosfato de calcio en ángulos de difracción diferente en comparación al análisis realizado a la hidroxiapatita en polvo y adicionalmente contiene una pequeña concentración de Mg y Na, similar al mineral ósea.

La muestra que presento menor formación de Ha fue la del grupo control que no presentaba recubrimiento de superficie en comparación con las otras 3 muestras. Lo que nos ayuda a concluir que los tres recubrimientos de superficie realizados presentan un mayor bioactividad en las pruebas de biocompatibilidad indirecta de control positivo.

Llama la atención que el grupo de recubrimiento con alginate fue el que mostro en las líneas de difracción mayor intensidad en cuanto a la formación del elemento de titanato de calcio que como ya se menciono antes,este más tarde se combina con iones fosfato en el líquido para formar fosfato de calcio amorfo con una baja relación Ca: P. para posteriormente transformarse en apatita. Adicionalmente también se observó presencia de formación de hidroxiapatita, Na y Mg en menor intensidad que los grupos que contienen recubrimiento de Ha y compuesto HA/alginate sin embargo mayor formación que el grupo control. Esto comprueba que el alginate aumenta la biocompatibilidad de los sustratos de titanio.Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Wang et al (10). Donde realizaron recubrimientos por medio de electrodeposición de alginate/quitosano capa por

capa sobre sustratos de titanio donde refieren que los resultados indicaron que el método propuesto puede ser utilizado para fabricar revestimientos compuestos de alginato/quitosano capa por capa sobre la superficie de titanio a temperatura ambiente y estos revestimientos compuestos podría tener aplicaciones potenciales en el campo de la ingeniería de tejidos.

### **Prueba adsorción de proteínas:**

Las moléculas implicadas en la adhesión celular y la propagación incluyen moléculas de la matriz extracelular, receptores transmembrana y componentes del citoesqueleto intracelulares. La fibronectina entre otras es una proteína de la matriz extracelular que se muestran para mediar en la unión de células a los sustratos, esta proteína se encuentra en muchas matrices extracelulares y en el plasma sanguíneo y sirve como una molécula de unión entre el sustrato y la membrana celular de las células dependientes de anclaje. Se sabe que el ligando fibronectina conecta a la membrana celular a través de receptores de integrina. La activación de las integrinas desencadena reacciones citoplasmáticas y por lo tanto estimula la vía de señalización intracelular, posteriormente, las funciones celulares tales como la proliferación y la diferenciación (54).

Por otro lado, la albúmina humana es una proteína no adhesiva para osteoblastos, por lo tanto se puede utilizar como prueba de biocompatibilidad de control negativa (55). La albúmina es el principal componente proteico de suero y domina la adsorción de los fenómenos en los implantes médicos en la primera etapa de contacto con los fluidos corporales. Albúmina de suero humano o albúmina de suero bovino se utilizan a menudo como un agente de pasivación para evitar la adhesión de las células y la formación de trombos (51).

En nuestro estudio se realizo una prueba de adsorción de proteínas, donde se tomo 3 discos de Ti recubiertos con HA, 3 discos de Ti recubiertos con alginato, 3 discos de Ti recubiertos con compuesto hidroxiapatita/alginato y 3 discos controles

y sumergieron en 2.1 ml de Albúmina Bovina 30% en una botella de vidrio a temperatura ambiente durante 2 horas. La finalidad de realizar la anterior prueba es encontrar una evaluación de biocompatibilidad de control negativa y poder realizar un análisis comparativo con la prueba de apatita bone-like de control positiva.

En el análisis con sonda de espectrometría de dispersión de energía de rayos X, se observó que ninguno de los 4 grupos presentó adsorción de albumina al realizar la evaluación química básica y teniendo en cuenta que la albúmina es el principal componente proteico de suero y domina la adsorción de los fenómenos en los implantes médicos en la primera etapa de contacto con los fluidos corporales (51). Estos datos no se tuvieron en cuenta para realizar la conclusión de biocompatibilidad *in vitro* dado que se cree que las condiciones en las cuales fue realizada la prueba no eran similares al ambiente fisiológico de los componentes de la matriz extracelular. La anterior prueba se realizó a temperatura ambiente por lo cual se tiene a consideración que esto pudo haber influenciado significativamente en los resultados.

En el trabajo de Lu et al. Donde realizaron la prueba de adsorción de proteínas con albúmina de suero humano. Refieren que se realizó una dilución de 1 mg/ml de albúmina en un buffer de fosfato salino. Las muestras individuales se transfirieron a una placa de cultivo. A continuación, se añadieron 2,5 ml de solución de albúmina preparada. Se procedió con la adsorción durante 1 hora en una incubadora a 37°C. Después de que la adsorción se completó, las muestras se secaron con N e inmediatamente transferidas a un elipsómetro para la medición de la capa de proteína adsorbida. Se encontró que el espesor de la capa de albúmina en el Ti-6Al-4V no tratada es más alta que en el láser de CO<sub>2</sub>, la densidad de potencia láser aplicada en el experimento se correlaciona negativamente con cantidades de albúmina, se inhibe la adsorción de en las muestras que recibieron tratamiento de superficie con láser CO<sub>2</sub>.

Comparativamente con lo anterior se observa que en nuestro estudio tanto las muestras con tratamiento de superficie como los grupos control no presentaron ningún porcentaje de adsorción de proteína y se cree que el hecho de no haber realizado la prueba a 37°, no diluir la albumina bovina al 30% en un buffer fosfato salino y no realizar un secado en N, pudo haber influenciado significativamente en el resultado de la prueba. Además se observó que al retirar las muestras después de 2 horas en la albumina, los sustratos con recubrimiento de hidroxiapatita y alginato presentaron desprendimiento del material de recubrimiento. Por lo cual se decidió no tomar en cuenta estos resultados y solo realizar el análisis de biocompatibilidad indirecta únicamente con la prueba de apatita bone-like.

La biofuncionalización de las superficies mediante la técnica de electroespray es un enfoque idóneo para realizar recubrimientos de sustratos de titanio dado que se pueden realizar revestimientos uniformes y reproducibles incluso a nivel de nanopartículas.

Por último al evaluar las características morfológicas y químicas llegamos a la conclusión de que el recubrimiento que presentó mayores propiedades favorables fue el recubrimiento del compuesto hidroxiapatita/alginato sobre los sustratos de titanio. Se observa que el recubrimiento del alginato a pesar de no ser el que presenta mayor aumento en las características de biocompatibilidad, sí potencia las características bien conocidas que presenta los recubrimientos de hidroxiapatita exclusivamente. Por lo anterior y teniendo en cuenta que el alginato es un polímero se considera que estos revestimientos compuestos podría tener aplicaciones potenciales en el campo de la ingeniería de tejidos para servir de vehículo y espaciadores en la entrega de factores de crecimiento, medicamentos, que pueden impulsar efectivamente la regeneración ósea y mejorar la oseointegración de los implantes dentales. Lo anterior ha sido demostrado por Liu et al. Al ser utilizados en modelos animales (29). Incluso recientemente Bosco et



al 2015 demostró que el alendronato (bifosfonato) vinculado a nanocristales de hidroxiapatita tiene potencial terapéutico y puede ser considerado como un material constituyente atractivo de revestimiento para implantes ortopédicos y orales para su aplicación en pacientes con osteoporosis (53).

## 5. Conclusiones

- 1) Los parámetros de procesamiento para realizar recubrimiento de superficies de titanio con hidroxiapatita, alginato y compuesto hidroxiapatita/alginato fueron óptimos.
- 2) El recubrimiento que presentó mayores propiedades favorables fue el recubrimiento del compuesto hidroxiapatita/alginato sobre los sustratos de titanio. Las muestras recubiertas con el compuesto hidroxiapatita/alginato son las que presentan una morfología de superficie propicia para la adhesión y proliferación de las células del linaje óseo.
- 3) Es beneficioso realizar biofuncionalización de la superficie de titanio mediante la técnica de electroespray ya que con esta se aumenta la bioactividad en las pruebas de biocompatibilidad indirecta.
- 4) El recubrimiento del alginato a pesar de no ser el que presenta mayor aumento en las características de biocompatibilidad, sí potencia las características bien conocidas que presenta los recubrimientos de hidroxiapatita exclusivamente.

## **6.Recomendaciones**

Para observar mayores resultados en el tratamiento de rehabilitación oral con implantes de oseointegración, es indispensable realizar nuevos estudios respecto a los recubrimiento de superficie de los implantes.

A los nuevos grupos de investigación se recomienda continuar trabajando con la biofuncionalización de superficies de titanio mediante la técnica de electroespray con las soluciones de hidroxiapatita y alginato. En especial poder ejecutar ensayos con el recubrimiento compuesto hidroxiapatita/alginato y realizar análisis con cultivos celulares del linaje óseo e incluso ensayos in vivo en modelo animal. De esta manera poder contribuir en mejorar la unión íntima del implante de titanio al hueso en las fases de oseointegración.

## Bibliografía

- 1) Galvis V, Paredes C, Valencia A, Ronderos M, Suarez E. III Estudio Nacional De Salud Bucal - ENSAB III. 1999.
- 2) Goiato, D. dos Santos D, Jr. Santiago J, Moreno A, Pellizzer E. Longevity of dental implants in type IV bone: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2014; 43: 1108–1116.
- 3) Tomsia et al. Nanotechnology Approaches for Better Dental Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011 ; 26(Suppl): 25–49.
- 4) Hobo, S.; Ichida, E.; Garcia, L. Osseointegration and occlusal rehabilitation. Quintessence Publishing; Tokyo: 1990. Osseointegration Implant Systems; p. 3-4.
- 5) Schein, H. Business Wire. Melville, N.Y.: July 6. 2004 Henry Schein Enters Growing Dental Implant Category Through Strategic Partnership with Camlog.
- 6) Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection.* 2009; 72(2):104–110. [PubMed: 19329223].
- 7) Goodman S, Yao Z, Keeney M, Yang F. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials.* 2013; 34: 3174-3183.
- 8) Mendonça G, Mendonça D, Aragaõ F, Cooper L. Advancing dental implant surface technology – From micronto-nanotopography. *Biomaterials.* 2008; 29:3822–3835.
- 9) Jaworek A. Micro- and nanoparticle production by electrospraying. *Powder Technol.* 2077; 176: 1: 18–35.

- 10) Wang Z, Zhang X, Gu J, Yang H, JunNie, GuipingMa. Electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer composite coatings on titanium substrates. *Carbohydrate Polymers* 103 (2014) 38– 45.
- 11) Ensayo de biocompatibilidad in vitro de un recubrimiento polimérico sobre titanio obtenido mediante electrospray. Clavijo D, Ramirez D, Santander C. 2013. Universidad nacional de Colombia. Bogota DC.
- 12) Ogle O. Implant Surface Material, Design, and Osseointegration. *Dent Clin N Am* 59 (2015) 505–520.
- 13) Olmedo D, Paparella M, Brandizzi D, Cabrini R. Reactive lesions of peri-implant mucosa associated with titanium dental implants: a report of 2 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 39:5:503-507.
- 14) Le Guéhennec L , Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater J.* 2007; 23:7:844–854.
- 15) Rautray T, Narayanan R, Kim K. Ion implantation of titanium based biomaterials. *Prog Mater Sci.* 2011; 56; 8:1137–1177.
- 16) Le Guéhennec L , Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater J.* 2007; 23:7:844–854.
- 17) Vargas T, Alfaro E. Oseointegracion: la clave para el éxito en implantes. UCR. 2005.
- 18) Zhang W, Wang G, Liu Y, Zhao X, Zou D, Zhu C, et al. The synergistic effect of hierarchical micro/nano-topography and bioactive ions for enhanced osseointegration. *Biomaterials.* 2013; 34:3184-3195.
- 19) Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. Part I: Lateral approach. *J Clin Periodontol* 2008; 35 (Suppl. 8): 216–240.
- 20) Buser D, Schenk R, Steinemann S, Fiorellini J, Fox C, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A

- histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991;25:889–902.).
- 21) Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 2004;25:4601–6.].
- 22) Cho SA, Park KT. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials* 2003;24:3611–7.].
- 23) Novaes Jr AB, Papalexiou V, Grisi MF, Souza SS, Taba Jr M, Kajiwara JK. Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed in periodontally infected sites. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:34–43.,
- 24) Papalexiou V, Novaes Jr AB, Grisi MF, Souza SS, Taba Jr M, Kajiwara JK. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:44–53.].
- 25) Yokoyama K, Ichikawa T, Murakami H, Miyamoto Y, Asaoka K. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implants. *Biomaterials* 2002;23:2459–65.].
- 26) Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:252–9.
- 27) Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5:S57–63.
- 28) Bauer S, Schmuki P, Mark KVD, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. *Prog Mater Sci.* 2013; 58:261–326.
- 29) Liu DM, Yang QZ, Troczynski T, Tseng WJJ. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials* 2002;23:1679–87.

- 30) Liu DM, Yang QZ, Troczynski T. Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. *Biomaterials* 2002;23:691-8.
- 31) Metikoš-Hukovic M, Tkalcec E, Kwokal A, Piljac J. An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings. *Surf Coat Technol* 2003;165:40-50.
- 32) Muller L, Conforto E, Caillard D, Muller FA. Biomimetic apatite coatings – carbonate substitution and preferred growth orientation. *Biomol Eng* 2007;24:462-6.
- 33) Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24(24):4353-4364
- 34) Massia SP, Hubbell JA. Covalent Surface Immobilization of Arg-Gly-Asp-Containing and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Containing Peptides to Obtain Well-Defined Cell-Adhesive Substrates. *Analytical Biochemistry*. 1990; 187(2):292-301.
- 35) Thiana E, Lic X, Huangc J, Edirisinghec M, Bonfieldb W, Bestb S. Electro spray deposition of nanohydroxyapatite coatings: A strategy to mimic bone apatite mineral. *Thin Solid Films*. 2011; 519: 7:2328-2331
- 36) Martin S, Perea A, Garcia P, Y barra J, Castillo L. Effect of the collector voltage on the stability of the cone-jet mode in electrohydrodynamic spraying. *J Aerosol Sci*. 2012; 46:53-63.
- 37) Thiana E, Lic X, Huangc J, Edirisinghec M, Bonfieldb W, Bestb S. Electro spray deposition of nanohydroxyapatite coatings: A strategy to mimic bone apatite mineral. *Thin Solid Films*. 2011; 519: 7:2328-2331.
- 38) Yang, Y.; Bessho, K.; Kim, K-H; Park, S-W.; Ong, JL. Hydroxyapatite coatings. In: Wnek, GE.; Bowlin, GL., editors. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Informa Healthcare USA, Inc; New York, London: 2008. p. 1464-1469.
- 39) Lee KY, Mooneya DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012; 37: 106- 126.

- 40)Pereira R, Carvalho A, Vaz D, Gil M, Mendes A, Bártolo P. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *Int. J Biol. Macromol.* 2013; 52: 221– 230.
- 41)Weng YL, Wang M, Liu W, Hu XJ, Chai G, Yan QM, Zhu L, Cui L, Cao YL. Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone. *TissueEng*2006;12:1503–13.
- 42)Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol* 2006;77(10):1736–43.
- 43)Ferraris S, Bobbio A, Miola M, Spriano S. Micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium dental implants. *Surface&CoatingsTechnology* 276 (2015) 374–383.
- 44)Buser D. Titanium for dental applications (II): implants with roughened surfaces, in: P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen (Eds.), *Titanium in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2001, pp. 875–888.
- 45)Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* 20 (2009) 185–206.
- 46)Wennerberg A, Albrektsson T, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* 20 (2009) 172–184.
- 47)L. HaoL. Lawrence L. *Laser Surface Treatment of Bio-Implant Materials.* Laser Surface Treatment of Bio-Implant Materials© 2005 John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-470-01687-6
- 48)PuleoD.A, Nanci A, Understanding and controlling the boneimplantinterface, *Biomaterials*, 20, 2311–21 (1999).
- 49)Scotchford C.A, Ball M, Winkelmann M, Voros J, Csucs C,Brunette D.M, Danuser G, Textor M. Chemically patterned,metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein andcell-



- interactions. Part II. Protein adsorption and early cell interactions, *Biomaterials*, 24, 1147–58 (2003).
- 50) Cho S, BeagY.-W, Han S, KimK.-H, Cho J, KohS.-K. Hydrophilic surface formation on materials and its applications, *Surface and Coatings Technology*, 128–129, 66–70 (2000).
- 51) Lu X, Leng Y, Zhang X. D, Xu J. R, Qin L, Chan C. W. Comparative study of osteoconduction on micromachined and alkali treated titanium alloy surfaces in vitro and in vivo, *Biomaterials*, 26, 1793–801 (2005).
- 52) Kokubo T, Kim H. M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials*, 24, 2161–75 (2003).
- 53) Bosco R, Lafisco M, Tampieri A, Jansen J. Hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate bioactive components for bone implant coatings to decrease osteoclastic activity. *Applied Surface Science* 328(2015)516–524.
- 54) Ducheyne P, Qiu Q, Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function, *Biomaterials*, 20, 2287–303 (1999).
- 55) D. A. Puleo D.A, Bizios R, Mechanisms of fibronectin-mediated attachment of osteoblasts to substrates in vitro, *Bone and Mineral*, 18, 215–26 (1992).