

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**



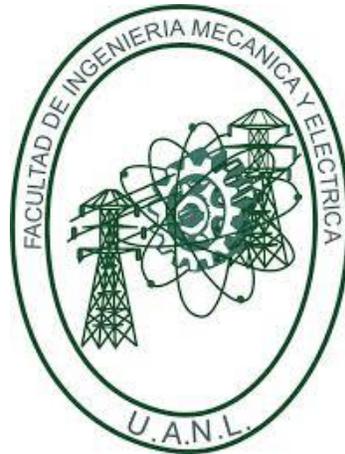
**RECUBRIMIENTOS DE APATITAS CON ZINC PREPARADOS
BIOMIMÉTICAMENTE SOBRE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MODIFICADAS PARA SU
USO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**POR:
ING. YAIMÍ MARTÍN SANTANA**

**TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN
MATERIALES**

Junio de 2020

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**RECUBRIMIENTOS DE APATITAS CON ZINC PREPARADOS
BIOMIMÉTICAMENTE SOBRE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MODIFICADAS PARA SU
USO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**POR
ING. YAIMÍ MARTÍN SANTANA**

**TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN
MATERIALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN. Junio de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del comité de tesis recomendamos que la tesis RECUBRIMIENTOS DE APATITAS CON ZINC PREPARADOS BIOMIMÉTICAMENTE SOBRE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MODIFICADAS PARA SU USO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS realizada por el alumno(a) YAIMÍ MARTÍN SANTANA, con número de matrícula 1983182, sea aceptada para su defensa como opción al grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES.

El Comité de Tesis

Dr. Marco A. L. Hernández Rodríguez
Director

Dr. Edén A. Rodríguez Castellanos
Revisor

Dr. Edgar Omar García Sánchez
Revisor

Vo. Bo

Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



006

San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Junio de 2020

DEDICATORIA

A mi familia, por brindarme siempre un infinito amor y apoyo sin condiciones, pero sobre todo por ayudarme a convertirme en quien soy.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco A. L. Hernández Rodríguez por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por su guía y apoyo en cada momento.

Al Dr. Jesús E. González Ruiz por su apoyo incondicional a pesar de la distancia y por la confianza que siempre ha depositado en mí.

Al grupo de investigación de Biomateriales del Posgrado en Ingeniería de Materiales de la FIME que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

A los doctores Josué A. Aguilar Martínez, Edgar Omar García Sánchez y Nayely Pineda Aguilar por su colaboración durante la realización de este trabajo.

A los profesores del Posgrado en Ingeniería de Materiales de la FIME.

Al CONACyT por el apoyo económico durante la maestría.

A mis amigos y mi familia por su apoyo incondicional y su ayuda en la realización de este trabajo.

RESUMEN

En este trabajo se realizó la caracterización de dos variantes de recubrimientos de apatitas con zinc (con relación Ca/Zn = 33.4 y 8.35, respectivamente) depositados sobre la aleación Ti6Al4V modificada superficialmente. Los recubrimientos se obtuvieron mediante una variante del método biomimético a partir de utilizar soluciones sobresaturadas en iones calcio y fosfato (SCS) con inclusión de zinc. Las superficies activadas previamente y los recubrimientos obtenidos se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), espectroscopia por energía dispersiva de rayos X (EDS), espectrometría de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) y por difracción de rayos X (XRD). Se obtuvo recubrimientos de apatitas con zinc incorporado sobre la superficie de Ti6Al4V modificada en un periodo de exposición de 4 horas. Los resultados del análisis por EDS y XPS confirmaron la incorporación de zinc en el sistema del recubrimiento. Se demostró que la inclusión de iones dopantes provocó cambios morfológicos en los recubrimientos al comparar con los recubrimientos de apatita pura. Al aumentar la concentración de iones Zn^{2+} disminuyó el tamaño de partícula y se obtuvo un arreglo no uniforme de partículas con geometrías esféricas y tamaños nanométricos. Además, dicho aumento restringe la nucleación y el crecimiento de la capa de apatita. El aumento de la temperatura del tratamiento térmico favoreció el alargamiento de las partículas y el endurecimiento de la estructura. Los resultados por XRD revelaron para ambas variantes de tratamientos previos estudiadas la fase hidroxiapatita de baja cristalinidad en todos los patrones obtenidos. Se observó un ligero cambio en la posición de los picos para los recubrimientos Zn-HA en comparación con los de HA pura.

ABSTRACT

In this work, the characterization of two zinc apatite coatings variants (with Ca/Zn ratio = 33.4 and 8.35, respectively) deposited on the superficially modified Ti6Al4V alloy was performed. The coatings were obtained through a new variant of biomimetic method using calcium and phosphate supersaturated solutions ions (SCS) with zinc inclusion. The previously activated surfaces and the coatings were characterized by field emission scanning electron microscopy (FESEM), X-ray dispersive energy spectroscopy (EDS), X-ray photoelectron spectrometry (XPS) and X-ray diffraction. (XRD). Apatite coatings with zinc incorporated were obtained on the modified Ti6Al4V surface over an exposure period of 4 hours. The EDS and XPS results confirmed the zinc incorporation in the coating system. The dopant ions inclusion was shown to produce morphological changes in the coatings when compared to pure apatite coatings. Increasing the Zn^{2+} ions concentration decreased the particle size and a non-uniform particles arrangement with spherical geometries without sharp face angles and nanometric sizes was obtained. Furthermore, such an increase restricts nucleation and growth of the apatite layer. The temperature increase of the heat treatment favored the particles elongation and the structure hardening. XRD results revealed for both variants of previous treatments studied the low crystallinity hydroxyapatite phase in all the patterns obtained. A slight change in peak position was observed for Zn-HA coatings compared to pure HA.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes	2
1.3. Justificación.....	3
1.4. Hipótesis.....	4
1.5. Objetivos	4
1.5.1. Objetivo General.....	4
1.5.2. Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO 2.....	1
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	1
2.1 El titanio y sus aleaciones	1
2.1.1 Características	1
2.1.2 Propiedades y aplicaciones.....	2
2.2. Oseointegración	3
2.3. Métodos de modificación superficial.....	4
2.4. Recubrimientos bioactivos sobre titanio para mejorar oseointegración.....	7
2.4.1. Fosfatos de calcio	8
2.4.2. Hidroxiapatita	10
2.4.3. El papel de las sustituciones iónicas en hidroxiapatita	13
2.4.4. Requerimientos para recubrimientos de HA	14
2.5. Método biomimético	15

2.5.1. Influencia de los tratamientos de activación superficial previos	16
2.5.2. Influencia de la composición y concentración de las disoluciones.....	21
2.5.3. Influencia del pH	22
2.6. Influencia de tratamientos térmicos posteriores	23
2.7. Zinc.....	23
2.7.1. Recubrimientos bioactivos con zinc.....	24
CAPÍTULO 3.....	1
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	1
3.1 Diagrama de tratamientos aplicados	1
3.2 Materiales empleados para la realización de los ensayos.....	2
3.3 Preparación Inicial de las Probetas	2
3.4 Aplicación de los tratamientos de modificación superficial.....	2
3.4.1 Grabado Ácido (GA)	2
3.4.2 Tratamientos sucesivos en disoluciones de peróxido de hidrógeno y de cloruro de calcio (H ₂ O ₂ /HCl+TT+CaCl ₂)	3
3.4.3 Tratamiento alcalino empleando disoluciones de hidróxido de sodio y de cloruro de calcio (NaOH+CaCl ₂ +TT+H ₂ O)	3
3.5 Preparación de las disoluciones con alto contenido de calcio y fosfato	5
3.6 Tratamiento pos-deposición	6
3.7 Diseño experimental.....	7
3.8 Técnicas de Caracterización de las superficies modificadas.....	7
3.8.1 Microscopia Electrónica de Barrido.....	7
3.8.2 Espectroscopia por energía dispersiva de Rayos X.....	7

3.8.3	Difracción de Rayos X	7
3.8.4	Espectrometría de fotoelectrones inducidos por Rayos X	8
3.8.5	Rugosidad superficial.....	8
CAPÍTULO 4.....		1
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		1
4.1.	Introducción.....	1
4.2.	Caracterización del material empleado como sustrato	1
4.2.1.	Morfología.....	1
4.2.2.	Composición elemental y de fases	1
4.3.	Caracterización morfológica y de composición elemental y de fases del sustrato activado.....	2
4.3.1.	Efecto del tratamiento en grabado ácido (GA).....	3
4.3.2.	Efecto de la Variante 1 de tratamiento de activación superficial (H ₂ O ₂ /HCl+TT+CaCl ₂)	5
4.3.3.	Efecto de la Variante 2 de tratamiento de activación superficial (NaOH+CaCl ₂ +TT+W).....	10
4.4.	Efecto de la aplicación de los tratamientos de activación sobre la rugosidad superficial	15
4.5.	Efecto de los tratamientos aplicados sobre la composición elemental	16
4.6.	Caracterización de los precipitados obtenidos en la disolución.....	17
4.7.	Caracterización morfológica de los recubrimientos obtenidos.....	18
4.7.1.	Recubrimientos obtenidos en VD1-Zn0	19
4.7.2.	Recubrimientos obtenidos en VD2-Zn1	22
4.7.3.	Recubrimientos obtenidos en VD3-Zn2	25
4.8.	Composición elemental de los recubrimientos obtenidos.....	28

4.9. Composición de fases de los recubrimientos obtenidos.....	34
CAPÍTULO 5.....	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
5.1 Conclusiones.....	37
5.2 Recomendaciones.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURAS CRISTALINAS DEL TITANIO. (A) HCP A TEMPERATURA AMBIENTE: (B) BCC A PARTIR DE 883 °C (31).	1
FIGURA 2. (A) CÉLULA MADRE MESENQUIMAL PRIMITIVA INDIFERENCIADA QUE DIFERENCIA EN OTRAS CÉLULAS CON DIFERENTES FUNCIONES. (B) EL FIBROBLASTO QUE ASEGURA UNA INSERCIÓN DE TEJIDOS BLANDOS ALREDEDOR DEL IMPLANTE PARA PROTEGER LOS TEJIDOS CERCANOS Y EL OSTEÓBLASTO, QUE FORMA TEJIDO ÓSEO COMO UNA CAPA PROTECTORA ALREDEDOR DE LOS IMPLANTES (40, 41).	4
FIGURA 3. ESTRUCTURA JERÁRQUICA DEL HUESO EN VARIAS ESCALAS DE LONGITUD (48).....	8
FIGURA 4. FASES DE LOS FOSFATOS DE CALCIO (49, 50).....	9
FIGURA 5. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA HA: (A) MODELO COMPUTACIONAL DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA HEXAGONAL CON SIMETRÍA P63. LOS IONES DE CALCIO ESTÁN EN LOS VÉRTICES DE LOS TRIÁNGULOS ALREDEDOR DE CADA GRUPO HIDROXILO (ROJO). (B) PERSPECTIVA DE LA CELDA UNIDAD. (52).	10
FIGURA 6. (A) DISTRIBUCIÓN DE LOS SITIOS DE IONES Ca^{2+} , 6Ca (II) Y 4 Ca(I). (B) REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA CELDA UNITARIA DE HA. LAS LÍNEAS PUNTEADAS REPRESENTAN EL NIVEL INFERIOR (53).....	11
FIGURA 7. DIFERENTES MORFOLOGÍAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE HA DEPENDIENDO DEL TIPO DE PREPARACIÓN (48).	12
FIGURA 8. REQUERIMIENTOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS RECUBRIMIENTOS DE HA SEGÚN LA FDA (50). 14	
FIGURA 9. MORFOLOGÍA DE RECUBRIMIENTOS DE FOSFATOS DE CALCIO OBTENIDOS POR EL MÉTODO BIOMIMÉTICO (49).....	16
FIGURA 10. IMÁGENES SEM DE LAS CAPAS DE GEL DE TITANIA FORMADAS EN LAS SUPERFICIES DE TI DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LA SOLUCIÓN DE H_2O_2 / HCl A 80 °C DURANTE (A) 20 MIN; (B) 60 MIN (67).	19
FIGURA 11. MORFOLOGÍA OBTENIDA POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTO ALCALINO EN SOLUCIÓN NaOH (5 M) A 60 °C DURANTE 24 H, Y TRATAMIENTO TÉRMICO A 60 °C DURANTE 24 H (68).	20
FIGURA 12. ESTRUCTURAS DE TITANATO DE HIDRÓGENO Y SODIO, TITANATO DE HIDRÓGENO Y CALCIO Y TITANATO DE CALCIO PROYECTADAS EN UN PLANO PERPENDICULAR AL EJE B CRISTALOGRAFICO (70).	21
FIGURA 13. DIAGRAMA QUE REPRESENTA EL PROCEDIMIENTO REALIZADO DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.....	1

FIGURA 14. IMÁGENES DE LAS PROBETAS DE Ti6Al4V DURANTE LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE MODIFICACIÓN SUPERFICIAL. A: GA, B: H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂ , C: NaOH+CaCl ₂ +TT+W.	4
FIGURA 15. IMÁGENES DE LAS PROBETAS DE Ti6Al4V DURANTE LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS: A) VD1-Zn0, B) VD2-Zn1, C) VD3-Zn2.	6
FIGURA 16. IMÁGENES FESEM DE LA SUPERFICIE DEL MATERIAL EMPLEADO COMO SUSTRATO EMPLEANDO MAGNIFICACIONES DE 5000X Y 10000X.	2
FIGURA 17. ESPECTRO EDS Y PATRÓN XRD DEL MATERIAL EMPLEADO COMO SUSTRATO.	2
FIGURA 18. CAMBIOS DE COLORACIÓN EN LA SUPERFICIE DE LAS PROBETAS POSTERIOR A LOS TRATAMIENTOS APLICADOS, A: DESBASTE, B: GA, C: H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂ , D: NaOH+CaCl ₂ +TT+W.....	3
FIGURA 19. IMÁGENES FESEM DE LA SUPERFICIE DEL Ti6Al4V POSTERIOR A LA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO EN GRABADO ÁCIDO. A) 5000X, B) 10000X Y C) 20000X.	4
FIGURA 20. ESPECTRO EDS Y PATRÓN XRD DEL MATERIAL SOMETIDO A TRATAMIENTO EN GRABADO ÁCIDO.....	5
FIGURA 21. IMÁGENES FESEM DE LA SUPERFICIE DE LAS MUESTRAS DE Ti6Al4V LUEGO DE APLICADA LA VARIANTE 1 DE TRATAMIENTO: A, B Y C: H ₂ O ₂ /HCL. SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 2500X, 5000X Y 25000X RESPECTIVAMENTE.	6
FIGURA 22. IMÁGENES FESEM DE LA SUPERFICIE DE LAS MUESTRAS DE Ti6Al4V LUEGO DE APLICADA LA VARIANTE 1 DE TRATAMIENTO: D, E, F: TT (400 °C-1H); G, H, I: CaCl ₂ . SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 2500X, 5000X Y 25000X RESPECTIVAMENTE.	7
FIGURA 23. ESPECTROS EDS DE LAS MUESTRAS SOMETIDAS A LOS TRATAMIENTOS DE LA VARIANTE 1 DE ACTIVACIÓN SUPERFICIAL.	8
FIGURA 24. ESPECTRO XPS COMPLETO (A) Y ESPECTRO DE ALTA RESOLUCIÓN DEL Ca 2P (B) DE LA SUPERFICIE DE Ti6Al4V SOMETIDA A LOS TRATAMIENTOS DE LA VARIANTE 1.....	9
FIGURA 25. PATRONES XRD DE LAS SUPERFICIES DE LAS MUESTRAS DE Ti6Al4V SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS (VARIANTE 1).....	10
FIGURA 26. IMÁGENES FESEM DE LA SUPERFICIE DE LAS MUESTRAS LUEGO DE APLICADA LA VARIANTE 2 DE TRATAMIENTO. A, B, C: NaOH; D, E, F: TT (600 °C-1H). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 2500X, 10000X Y 30000X RESPECTIVAMENTE.	11
FIGURA 27. ESPECTROS EDS DE LAS MUESTRAS SOMETIDAS A LOS TRATAMIENTOS DE LA VARIANTE 2 DE ACTIVACIÓN SUPERFICIAL. 1-NAOH, 2-NAOH-CaCl ₂ -TT, 3-NAOH-CaCl ₂ -TT-H ₂ O.....	12
FIGURA 28. ESPECTRO XPS COMPLETO (A) Y ESPECTRO DE ALTA RESOLUCIÓN DEL Ca 2P (B) DE LA SUPERFICIE DE Ti6Al4V SOMETIDA A LOS TRATAMIENTOS DE LA VARIANTE 2.....	13
FIGURA 29. PATRONES XRD DE LAS SUPERFICIES DE LAS MUESTRAS DE Ti6Al4V SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS (VARIANTE 2).....	14

FIGURA 30. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE LA RUGOSIDAD SUPERFICIAL.	16
FIGURA 31. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS DE ACTIVACIÓN APLICADOS SOBRE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LA SUPERFICIE DEL Ti6Al4V.	17
FIGURA 32. IMÁGENES FESEM DE LOS POLVOS DE LOS PRECIPITADOS OBTENIDOS EN LAS SCS. A, B) VD1-Zn0; C, D) VD2-Zn1 Y E, F) VD3-Zn2.	18
FIGURA 33. CAMBIOS EN LA SUPERFICIE DE LAS PROBETAS POSTERIOR AL TRATAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE RECUBRIMIENTOS. ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE DEPOSICIÓN Y TRATAMIENTO TÉRMICO: A Y B: VARIANTE 1 PREVIA; C Y D: VARIANTE 2 PREVIA.....	19
FIGURA 34. IMÁGENES FESEM DE LOS RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA PRIMERA VARIANTE DE DEPÓSITO SIN INCLUSIÓN DE ZINC. A, B, C Y D: SUPERFICIE PREVIA (H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂); E Y F: SUPERFICIE PREVIA (NaOH+CaCl ₂ +TT+W). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 2500X Y 5000X.....	20
FIGURA 35. IMÁGENES FESEM DE LOS RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA PRIMERA VARIANTE DE DEPÓSITO SIN INCLUSIÓN DE ZINC Y TRATAMIENTO TÉRMICO POS-DEPOSICIÓN. A, B Y C: (H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂); D, E Y F: (NaOH+CaCl ₂ +TT+W). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 2500X, 20000X Y 50000X RESPECTIVAMENTE.	21
FIGURA 36. IMÁGENES FESEM DE LOS RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA SEGUNDA VARIANTE DE DEPÓSITO CON MENOR CONCENTRACIÓN DE ZINC. A, B Y C: SUPERFICIE PREVIA (H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂); D, E Y F: SUPERFICIE PREVIA (NaOH+CaCl ₂ +TT+W). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 5000X, 10000X Y 20000X RESPECTIVAMENTE.	23
FIGURA 37. IMÁGENES FESEM DE LOS RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA SEGUNDA VARIANTE DE DEPÓSITO CON MENOR CONCENTRACIÓN DE ZINC Y TRATAMIENTO TÉRMICO POS-DEPOSICIÓN. A, B Y C: (H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂); D, E Y F: (NaOH+CaCl ₂ +TT+W). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 5000X, 10000X Y 20000X RESPECTIVAMENTE.	24
FIGURA 38. IMÁGENES FESEM DE LOS RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA TERCERA VARIANTE DE DEPÓSITO CON MAYOR CONCENTRACIÓN DE ZINC. A, B Y C: (H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂); D, E Y F: (NaOH+CaCl ₂ +TT+W). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 5000X ,10000X Y 20000X RESPECTIVAMENTE.	26
FIGURA 39. IMÁGENES FESEM DE LOS RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA TERCERA VARIANTE DE DEPÓSITO CON MAYOR CONCENTRACIÓN DE ZINC Y TRATAMIENTO TÉRMICO POS-DEPOSICIÓN. A, B Y C: (H ₂ O ₂ /HCL+TT+CaCl ₂); D, E Y F: (NaOH+CaCl ₂ +TT+W). SE EMPLEARON MAGNIFICACIONES DE 10000X, 20000X Y 30000X RESPECTIVAMENTE.	27
FIGURA 40. IMÁGENES SEM Y ESPECTROS EDS (PUNTUAL) DE LA SUPERFICIE DE Ti6Al4V CON RECUBRIMIENTO DE APATITAS Y TRATAMIENTOS PREVIOS EN: A) H ₂ O ₂ /HCL-TT-CaCl ₂ ; B) NaOH-CaCl ₂ -TT-W.	29
FIGURA 41. IMÁGENES SEM Y ESPECTROS EDS DE LA SUPERFICIE DE Ti6Al4V CON RECUBRIMIENTO DE APATITAS CON ZINC: A) VARIANTE PREVIA H ₂ O ₂ /HCL-TT-CaCl ₂ Y VD2-Zn1; B) VARIANTE PREVIA H ₂ O ₂ /HCL-TT-CaCl ₂ Y VD3-Zn2; C) VARIANTE PREVIA NaOH-CaCl ₂ -TT-W Y VD2-Zn1; D) VARIANTE PREVIA NaOH-CaCl ₂ -TT-W Y VD3-Zn2.	30

FIGURA 42. IMÁGENES DEL MAPEO ELEMENTAL DE LA SUPERFICIE DE Ti6Al4V RECUBIERTA A TRAVÉS DE LA VD3-ZN2.....	31
FIGURA 43. ANÁLISIS DE ENERGÍA XPS DE LAS SUPERFICIES DE Ti6Al4V RECUBIERTAS CON ZN-CAP.	32
FIGURA 44. ESCANEOS XPS DE ALTA RESOLUCIÓN (P 2P, Ca 2P Y ZN2P) PARA (A) V1.VD2-ZN1 (B) V1.VD3-ZN2, (C) V2.VD2-ZN1, (D) V2.VD3-ZN2.	33
FIGURA 45. PATRONES XRD DE LAS MUESTRAS RECUBIERTAS CON APATITA Y ZN-APATITA Y TRATAMIENTO TÉRMICO PARA LAS DOS VARIANTES DE TRATAMIENTOS DE ACTIVACIÓN PREVIOS. ...	35

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

El titanio y sus aleaciones son materiales metálicos que se emplean en la fabricación de dispositivos biomédicos destinados a soportar la acción de cargas biomecánicas. Esto se debe en gran medida a sus excelentes propiedades mecánicas, alta resistencia a la corrosión en fluidos biológicos y excelente biocompatibilidad (1-3). También presentan capacidad para oseointegrarse, siendo esta una propiedad muy importante porque determina la estabilidad a corto y largo plazo de los dispositivos implantables (4).

La mejora del proceso de oseointegración ha sido motivo de estudio de numerosos investigadores en las últimas décadas, los cuales han demostrado que los cambios en la topografía, la energía superficial y la composición de fase en la superficie del titanio, son factores que influyen significativamente en su tasa de oseointegración (5-7).

Diversos tratamientos de modificación superficial han sido desarrollados con el objetivo de mejorar la calidad superficial de los implantes (8-10), ya que es en la superficie donde tienen lugar los procesos de adhesión, diferenciación y crecimiento celular responsables del desarrollo del tejido óseo. Dichos tratamientos son aplicados dependiendo del tipo de respuesta que se desee obtener.

En años recientes han sido ampliamente investigados los recubrimientos bioactivos, específicamente los de fosfatos de calcio en implantes metálicos ya que se ha reportado su capacidad para producir una unión fuerte y estable entre la superficie del implante y el tejido óseo circundante, mimetizando la superficie, haciéndola similar al hueso en su composición (4, 8, 11-13). Para la obtención de los recubrimientos, se utilizan varios métodos de deposición como: sol-gel,

plasma-spray, deposición pulsada laser (14), deposición electroforética, método biomimético, etc. Particularmente este último es una ruta simple que ha ganado popularidad a través de los años pues permite depositar recubrimientos de fosfatos de calcio en sustratos con geometrías complejas (15). El método fue descrito por primera vez en la década de los noventa por *Kokubo y cols.* (16) y ha sido modificado a lo largo de los años por varios autores con el fin de obtener una mejor cristalización de fase. Adicionalmente, esta técnica no requiere de instalaciones especiales ni de altas temperaturas para su implementación, permite el tratamiento de superficies porosas y brinda la posibilidad de incorporar agentes bioactivos y proteínas (4, 17, 18).

No obstante, los recubrimientos de fosfatos de calcio obtenidos mediante el método biomimético requerían de tiempos largos de deposición (19), presentaban pobres propiedades mecánicas y baja adhesión al sustrato (20, 21), y se ha reportado que estimulan la colonización bacteriana (22).

Por otra parte, el cobre y el zinc son micronutrientes que son necesarios para el funcionamiento de muchos procesos en los seres humanos, sin embargo, en grandes concentraciones son tóxicos. El papel del zinc en la formación y mineralización del hueso también ha sido reportado. Alrededor de la tercera parte del contenido de este elemento en el cuerpo humano se encuentra en el tejido óseo (22). Este contribuye a la proliferación de células osteoblásticas mejorando los procesos de formación de hueso (22, 23).

1.2. Antecedentes

Numerosos estudios han reportado que la incorporación de varios elementos como Zn, Na, Mg, Ag, K, Cu, Sr, entre otros, puede mejorar el comportamiento *in vivo* de la hidroxiapatita (HA), ya que su estructura permite la sustitución tanto aniónica como catiónica (22). Los recubrimientos obtenidos de Zn-HA se depositaron en la mayoría de los casos empleando métodos electrolíticos, electroforéticos o mediante sol-gel.

El mecanismo de incorporación de los iones Zn^{2+} en la HA fue investigado por *Matsunaga y cols.* en el año 2010 (23). En ese trabajo se encontró que la HA dopada con Zn^{2+} tiende a tener una composición química deficiente en Ca y que los iones Zn^{2+} sustitucionales están asociados con una vacante de Ca^{2+} y dos protones compensadores de carga. Por otra parte, *Ding y cols.* en el año 2015, obtuvieron recubrimientos de HA dopada con Zn^{2+} por el método de deposición electrolítica (24). Los cristales de Zn-HA preparados eran deficientes en calcio y carbonatados. Esta incorporación de Zn^{2+} redujo significativamente la porosidad y provocó que el recubrimiento se volviera notablemente más denso.

En el año 2014, el método de recubrimiento hidrotérmico fue utilizado por *Prado da Silva y cols.* para la deposición HA dopada con Zn^{2+} (25). En este trabajo se observó que la tasa de nucleación y crecimiento fue menor en las soluciones que contenían Zn^{2+} , en comparación con la solución de CaP pura.

Adawy y Abdel-Fattah en 2013 (26) reportan recubrimientos de apatita dopadas con iones de estroncio y zinc en superficies de acero inoxidable. La incorporación de estroncio y zinc indujo el crecimiento de estroncianita y smithsonita carbonatada más reabsorbible, así como de brushita, que es una fase de fosfato de calcio mucho más reabsorbible con una menor relación calcio/fosfato en comparación con HA (27).

1.3. Justificación

Cada año, más de 2.2 millones de personas en todo el mundo requieren cirugía de injerto óseo para reparar defectos óseos grandes, de tamaño crítico, derivados de accidentes, traumas o enfermedades (como la resección tumoral) (14). Esos defectos se reconstruyen utilizando injertos óseos autólogos, aloinjertos y materiales biocompatibles.

Los implantes dentales se han utilizado como raíces de dientes artificiales desde hace más de cinco décadas para fijar y soportar estructuras protésicas (28). Sin embargo, debido a que se requieren tiempos de vida útil prolongados y a la creciente necesidad de colocar implantes en pacientes cada vez más jóvenes, es

necesaria la fabricación de implantes duraderos, que interactúen con el medio biológico favoreciendo la creación de conexiones estructurales y funcionales entre el hueso vivo y la superficie del dispositivo, y evitando a su vez la colonización bacteriana.

Teniendo en cuenta los factores anteriormente mencionados, en los últimos años los mayores esfuerzos se han dirigido al desarrollo de nuevos materiales capaces de imitar la composición y estructura del hueso y que posean superficies que exhiban buena biocompatibilidad.

En este sentido, varias estrategias están siendo investigadas para obtener superficies capaces de promover adhesión celular (29). En el presente trabajo de investigación se pretende desarrollar recubrimientos de apatitas con diferentes concentraciones de zinc mediante una variante del método biomimético para evaluar la influencia del zinc en el recubrimiento.

1.4. Hipótesis

La incorporación de iones Zn^{2+} en soluciones con altas concentraciones de calcio y fosfato durante el proceso de obtención de recubrimientos de apatita mediante el método biomimético en superficies de Ti6Al4V activadas superficialmente producirá modificaciones en la morfología, composición elemental y de fases de los recubrimientos de apatitas.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de las relaciones calcio/zinc utilizadas en el proceso de deposición sobre la morfología y composición elemental y de fases de los recubrimientos de apatitas.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Modificar la superficie de Ti6Al4V mediante tratamientos químicos que permitan la incorporación de iones calcio.
- Caracterizar las superficies Ti6Al4V modificadas superficialmente.

- Obtener recubrimientos de apatitas a través de la inmersión en disoluciones sobresaturadas de calcio.
- Obtener recubrimientos de apatitas con zinc a través de la inmersión en disoluciones sobresaturadas de calcio.
- Evaluar el efecto de las relaciones Ca/Zn empleadas en el proceso de deposición sobre la morfología y composición elemental y de fases de los recubrimientos obtenidos con inclusión de zinc.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 El titanio y sus aleaciones

2.1.1 Características

El titanio es un metal de transición que se obtiene a partir de minerales ricos en óxido de titanio como el rutilo y se considera el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre y el cuarto después del aluminio, el hierro y el magnesio. El titanio metálico se presenta comercialmente en aproximadamente 20 composiciones (grados) diferentes. Es un material alotrópico (figura 1) que presenta una estructura cristalina hexagonal compacta (HCP) denominada α , y se transforma a estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC) denominada β alrededor de los 883 °C (30, 31). Los grados del titanio pueden agruparse en tres grandes clases, dependiendo de la fase (o las fases) que se presentan en su microestructura: α , β , y la combinación de fases denominada $\alpha+\beta$. Los elementos aleantes favorecen la formación de una u otra estructura y son los causantes de muchas de sus propiedades.

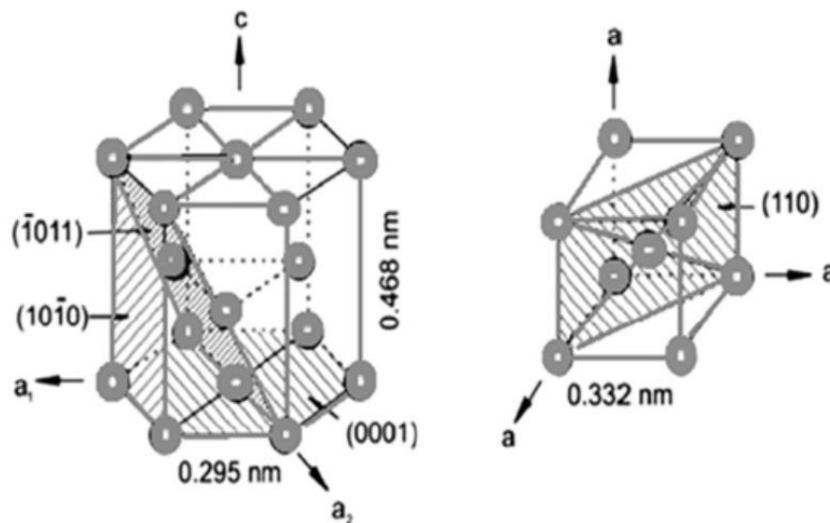


Figura 1. Estructuras cristalinas del titanio. (α) HCP a temperatura ambiente; (β) BCC a partir de 883 °C (31).

2.1.2 Propiedades y aplicaciones

Es un metal ligero siendo su densidad es de 4.51 g cm^{-3} (32). La posibilidad de combinarlo con otros metales permite obtener una amplia gama de aleaciones con propiedades atractivas para las industrias aeroespacial, aeronáutica, automovilística, química, militar y médica.

- ✓ Su baja densidad, gran solidez, alta conductividad térmica y bajo coeficiente de expansión térmica lo hacen especialmente apto para la construcción aeroespacial. Casi todas las piezas de aviones y de satélites sometidas a condiciones extremas (grandes esfuerzos a elevadas temperaturas) se fabrican en aleaciones de titanio.
- ✓ La elevada resistencia a la corrosión frente a diversos agentes químicos lo hace ampliamente utilizado en la industria química y petroquímica, y también en la construcción de partes expuestas al agua salina tales como piezas de barcos y plantas industriales costeras.
- ✓ Por su biocompatibilidad (capacidad de interactuar con los tejidos del organismo humano, sin que su presencia provoque reacciones alérgicas del sistema inmunitario), excelentes propiedades mecánicas (alta resistencia y larga vida de fatiga, bajo módulo elástico comparable con el del hueso cortical) y alta resistencia a la corrosión en fluidos biológicos, el titanio comercialmente puro y sus aleaciones, ha sido ampliamente estudiado para aplicaciones biomédicas.

En comparación con los aceros inoxidable y las aleaciones a base Cr-Co, las aleaciones de titanio exhiben mejor biocompatibilidad (33), utilizándose notablemente en el campo de la implantología y la ortopedia.

A pesar que en los últimos años el estudio de materiales alternativos ha ganado un interés creciente dentro de la comunidad científica, el material de elección para implantes sigue siendo titanio (comercialmente puro o aleación), debido a las

propiedades anteriormente descritas y su capacidad para lograr la integración biológica (34).

2.2. Oseointegración

El mecanismo de oseointegración está estrechamente relacionado con los biomateriales. El término oseointegración fue descrito por *Branemark* en la década de 1950 quien lo definió como la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y ordenado y la superficie de un implante sometido a cargas funcionales (35). Este proceso es un aspecto clave, que dicta el tiempo de curación y el éxito a largo plazo de los implantes.

La oseointegración depende de una serie de eventos (fijación de células mesenquimales, diseminación, proliferación y diferenciación en osteoblastos) que eventualmente conducen a la formación de hueso mineralizado alrededor del implante como se muestra en la figura 2 (36).

Es conocido que la unión celular a la superficie metálica y la consiguiente formación ósea alrededor del implante están influenciadas por varios factores, como: el procedimiento quirúrgico, la salud y calidad del hueso, la carga tras la implantación, el diseño del implante y especialmente su superficie (37). Las características superficiales, como la composición química y de fases, la morfología, la topografía, la rugosidad, la energía y la humectabilidad, juegan un papel importante durante la curación temprana del hueso que se integra al implante (38, 39).

De los materiales metálicos empleados en aplicaciones biomédicas ninguno se une directamente al hueso vivo, razón por la que los métodos de modificación superficial evolucionan continuamente con el desarrollo de nuevas técnicas y tecnologías, cuyo objetivo es lograr una oseointegración rápida y más predecible. Los métodos para mejorar la calidad superficial consisten en la aplicación de tratamientos que tienen por finalidad: incrementar la bioactividad del material y la resistencia a la corrosión, activar la superficie para posibilitar la deposición de

recubrimientos, inhibir el crecimiento de microorganismos e impedir la liberación de iones al medio biológico, entre otros.

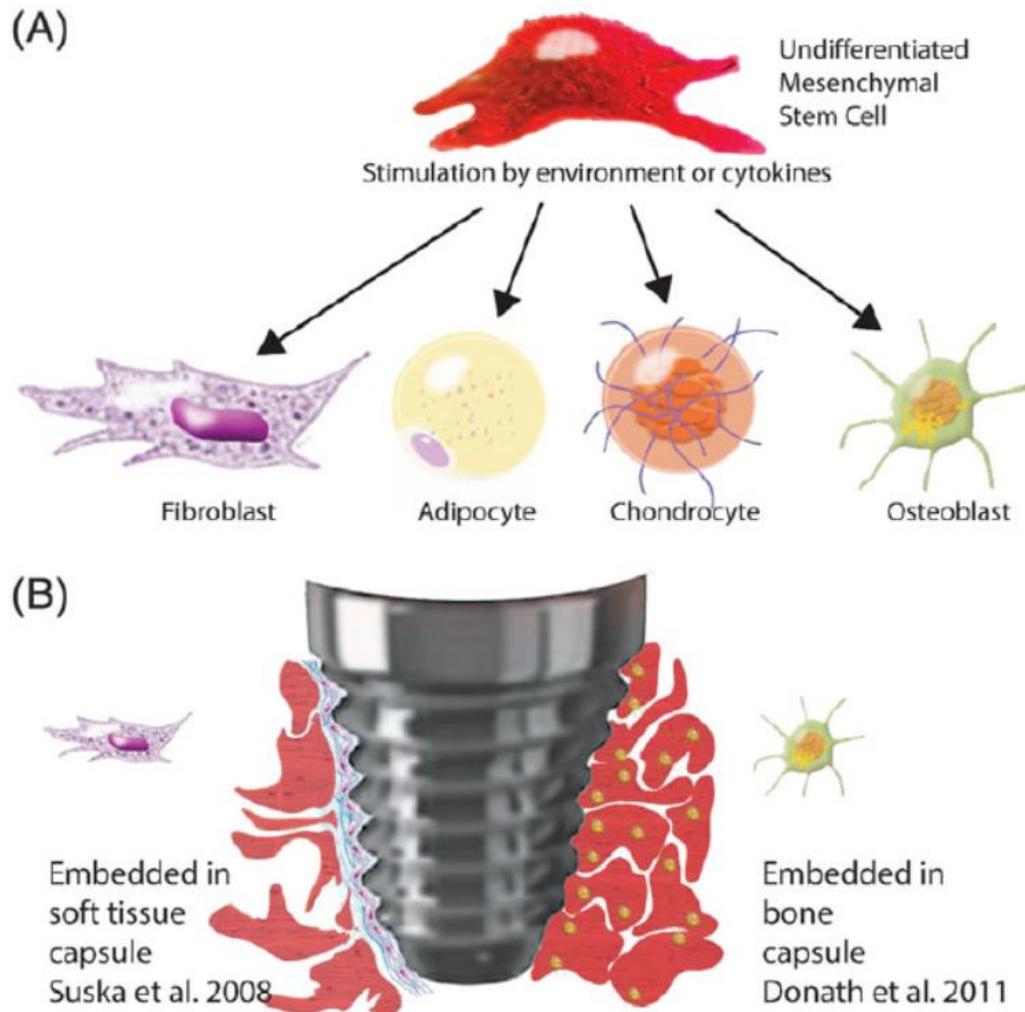


Figura 2. (A) Célula madre mesenquimal primitiva indiferenciada que diferencia en otras células con diferentes funciones. (B) El fibroblasto que asegura una inserción de tejidos blandos alrededor del implante para proteger los tejidos cercanos y el osteoblasto, que forma tejido óseo como una capa protectora alrededor de los implantes (40, 41).

2.3. Métodos de modificación superficial

Los métodos de modificación superficial se pueden categorizar en sustractivos y aditivos (38). Los métodos sustractivos (granallado, grabado ácido, combinación de granallado y grabado ácido, anodizado, laser peening, etc.) se caracterizan por crear patrones o irregularidades en las superficies para mejorar rugosidad, aumentar el área superficial y mejorar la oseointegración (40). Las superficies lisas

dan como resultado una adhesión ósea deficiente, mientras que las superficies rugosas (a un nivel que permite el crecimiento vascular) estimulan el crecimiento óseo. La microporosidad (diámetro de poro inferior a 10 μm) permite la circulación de fluidos corporales, mientras que la macroporosidad (diámetro de poro superior a 100 μm) proporciona un andamio para la colonización de células óseas (42).

Por otra parte, los métodos aditivos se caracterizan por la adición de capas de materiales bioactivos en forma de recubrimientos sobre el material base (sustrato) con el objetivo de apoyar en la formación de hueso en la interfaz, facilitando el proceso de oseointegración (43). Algunas de las técnicas más empleadas se resumen a continuación:

➤ *Técnicas de pulverización térmica*

Es el proceso en el que los materiales fundidos o endurecidos por calor se pulverizan sobre una superficie más fría para depositarse sobre ella. La materia prima se calienta con una llama a alta temperatura o un chorro de plasma (pulverización con llama y pulverización con plasma respectivamente).

La temperatura máxima alcanzable es la principal diferencia entre ellos. Son técnicas simples y flexibles con las que se producen recubrimientos uniformes a bajo costo. Como desventaja se puede mencionar que las altas temperaturas inducen la descomposición parcial y la formación de compuestos no estequiométricos y amorfos. Por otra parte, la incorporación simultánea de agentes biológicos es imposible y el enfriamiento rápido produce grietas. Además, debido al espesor relativamente alto, los recubrimientos tienen una alta tendencia al agrietamiento y la delaminación (41).

➤ *Técnicas de deposición de vapor*

Se pueden dividir en dos grupos principales: deposición física (PVD) y química de vapor (CVD). Los tipos de técnicas de PVD pueden clasificarse en otro conjunto de dos grupos: los que involucran evaporación térmica, donde el material se calienta hasta que su presión de vapor es mayor que la presión ambiental, y

aquellos que involucran la pulverización iónica, donde haces de iones y/o electrones altamente energéticos golpean un objetivo sólido y expulsan a los átomos de su superficie.

Para pulverizar materiales, se utilizan varios tipos de técnicas, como: haz de iones, magnetrón de radiofrecuencia (RF), láser pulsado, plasma de resonancia electrón-ciclotrón, diodo, corriente continua y pulverización reactiva o deposición. Todas estas técnicas tienen la ventaja de depositar recubrimientos de alta pureza y espesor uniforme con fuerte adhesión en sustratos planos, capacidad de recubrir sustratos sensibles al calor y microestructura compacta. Sin embargo, son técnicas costosas; producen recubrimientos amorfos y la aplicación de altas temperaturas evitan la incorporación simultánea de agentes biológicos.

La mayoría de estos métodos son físicos y no producen recubrimientos bioactivos unidos químicamente a los sustratos, sino capas unidas mecánicamente que pueden despegarse (44). Estos problemas podrían superarse si los propios materiales metálicos formaran la capa de apatita biológicamente activa en sus superficies.

➤ *Técnicas húmedas*

Las técnicas de deposición húmeda se producen a partir de soluciones o suspensiones tanto acuosas como no acuosas y ocurren a temperaturas moderadas. El proceso de deposición se basa en el fenómeno de nucleación heterogénea, la cinética depende de muchos parámetros, como la sobresaturación de la solución, la concentración de los reactivos, la temperatura, la hidrodinámica, la presencia o ausencia de mezclas, nucleadores, inhibidores, etc.

En esta categoría podemos encontrar: deposición electroforética (EPD), deposición electroquímica o catódica (ECD), sol-gel y biomimético, recubrimiento por inmersión y centrifugación (Dip coating y Spin coating), deposición hidrotérmica, deposición térmica del sustrato, remojo alternativo, micro arco de

oxidación (MAO), entre otras. Algunas de las desventajas en general son: problemas para recubrir grandes superficies; algunos procesos requieren procesamiento en atmósfera controlada; materias primas caras; alta permeabilidad; baja resistencia al desgaste; dificultad para controlar la porosidad y para producir recubrimientos sin grietas, etc.

Algunos métodos que son tendencia actualmente incluyen la foto funcionalización, recubrimientos biomiméticos de fosfatos de calcio, recubrimiento de agentes osteogénicos, factores de crecimiento, recubrimiento de medicamentos bioactivos como bifosfonatos, gentamicina y recubrimientos de nano titanio y nano hidroxiapatita (38).

2.4. Recubrimientos bioactivos sobre titanio para mejorar oseointegración

Dado que los implantes a base de metal son materiales inertes, es decir, no promueven respuesta biológica entre el material y el tejido, además carecen de osteoconductividad y osteoinductividad, el enfoque común es recubrir la superficie del implante con materiales bioactivos para promover la comunicación entre el hueso y el implante y proporcionar un entorno adecuado para la unión ósea (36). Estos materiales bioactivos, de composición análoga al tejido óseo, forman fuertes enlaces químicos con este debido a su similitud estructural y química con el hueso (45, 46).

Para mejorar el proceso de oseointegración variedad de recubrimientos superficiales han sido explorados. Se ha reportado que los biovidrios y otras biocerámicas como los fosfatos de calcio se unen al hueso y favorecen la proliferación de nuevas células. Los materiales bioactivos son generalmente bioestables o bioreabsorbibles y debido sus pobres propiedades mecánicas, generalmente se aplican como recubrimientos en sustratos metálicos para mejorar la resistencia química, la durabilidad y la biocompatibilidad.

2.4.1. Fosfatos de calcio

Los fosfatos de calcio (CaP) son los principales componentes minerales del hueso y los dientes y juegan un papel esencial en nuestra vida cotidiana (37). A diferencia de la gran mayoría de los polímeros naturales y sintéticos utilizados en aplicaciones biomédicas, los CaP están presentes en el cuerpo humano (47). El hueso y otros tejidos calcificados (figura 3) pueden considerarse compuestos anisotrópicos naturales que consisten en biominerales incrustados en una matriz de proteínas, otros materiales orgánicos y agua.

El tejido óseo es el componente principal del hueso y está formado por un 2% de células y un 98% de matriz extracelular o matriz ósea. La matriz comprende la fase biomineral, que es uno o más tipos de fosfatos de calcio (65 al 70%), el agua representa del 5 al 8% y la fase orgánica, que está principalmente en forma de colágeno, representa la porción restante.

Esta familia de minerales contiene iones de calcio (Ca^{2+}) junto con ortofosfatos (PO_4^{3-}), metafosfatos o pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y en forma ocasional iones de hidrógeno o hidróxido. En la figura 4 se resumen las principales fases de fosfato de calcio, así como algunas de sus propiedades.

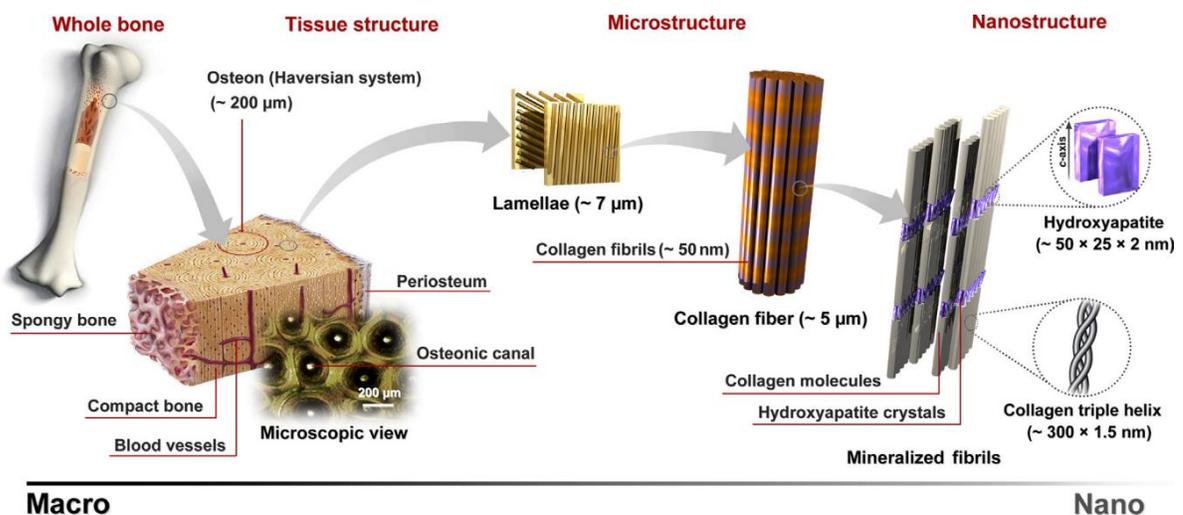


Figura 3. Estructura jerárquica del hueso en varias escalas de longitud (48).

Los cristales de fosfato cálcico dihidratado (DCPD) o brushita, son monoclinicos y exhiben mayor solubilidad que la mayoría de las otras fases de CaP. Esta fase es precursora de la hidroxiapatita (HA) de fase más estable, por lo cual varios estudios se han centrado en el uso de recubrimientos DCPD como un paso inicial para obtener HA. En entornos con un pH mayor de 6–7, la brushita se vuelve inestable y se transforma.

Los cristales de fosfato cálcico anhidro (DCPA o DCP) o monetita, son triclinicos y estables a temperaturas más altas y niveles de pH más bajos en el rango de pH 4–5. La solubilidad de DCPA es ligeramente inferior a la de DCPD. Estudios clínicos que implican la implantación de gránulos de DCPA en los alvéolos de los humanos aumentaron la regeneración ósea, lo que demuestra la biocompatibilidad y osteoconductividad de esta fase.

Los cristales de fosfato octocálcico (OCP) son triclinicos estructuralmente y existen en capas alternas de capas de apatita y capas hidratadas. OCP a menudo se observa como una etapa intermedia en la precipitación de HA y apatitas similar al hueso. Se ha sugerido y demostrado experimentalmente que la HA no puede formarse directamente a partir de la solución y, por lo tanto, requiere una fase intermedia, que con mayor frecuencia se indica como OCP. Los estudios in vitro han demostrado que OCP tiene una excelente biocompatibilidad (49).

Ca/P molar ratio	Compound	Formula
0.5	Monocalcium phosphate monohydrate (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.5	Monocalcium phosphate anhydrous (MCPA or MCP)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1.0	Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD), mineral brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.0	Dicalcium phosphate anhydrous (DCPA or DCP), mineral monetite	CaHPO_4
1.33	Octacalcium phosphate (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.5	α -Tricalcium phosphate (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.5	β -Tricalcium phosphate (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.2–2.2	Amorphous calcium phosphates (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3\text{--}4.5$; 15–20% H_2O
1.5–1.67	Calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA or Ca-def HA) ^e	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)
1.67	Hydroxyapatite (HA, HAp or OHAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1.67	Fluorapatite (FA or FAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
1.67	Oxyapatite (OA, OAp or OXA) ^f , mineral voelckerite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$
2.0	Tetracalcium phosphate (TTCP or TetCP), mineral hilgenstockite	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Figura 4. Fases de los fosfatos de calcio (49, 50)

2.4.2. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es la fase cristalina termodinámicamente más estable dentro de la familia de los fosfatos de calcio en el fluido corporal y posee la mayor similitud con la parte mineral del hueso. En su forma natural (CDHA, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$) suele ser hidroxiapatita carbonatada, no estequiométrica y deficiente en calcio con una relación molar Ca/P que varía de 1.50 a 1,67 (48).

Durante décadas, la HA sintética ha sido de interés debido a su excelente biocompatibilidad, su afinidad con los biopolímeros y su alto potencial osteogénico. Está bien documentado que la HA puede promover el crecimiento de hueso nuevo a través del mecanismo de osteoconducción sin causar ninguna toxicidad local o sistémica, inflamación o respuesta de cuerpo extraño.

La HA cristaliza en el sistema hexagonal (grupo espacial $P6_3/m$) con los siguientes parámetros cristalográficos: $a = 9.418 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, $b = 120^\circ$ (JCPDS No. 9-432) (51, 52). La red de HA consiste en iones Ca^{2+} , PO_4^- y OH^- distribuidos en dos mitades simétricas especulares de la celda unitaria (figura 5).

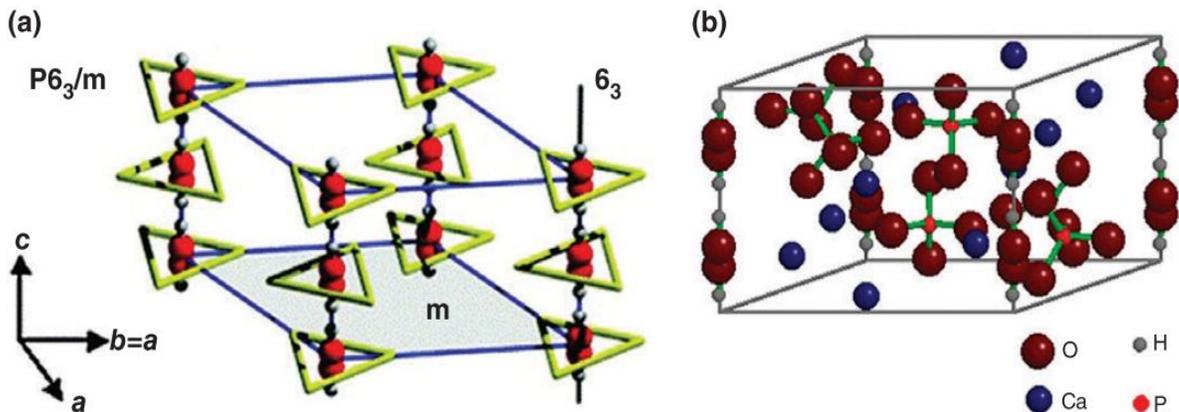


Figura 5. Estructura molecular de la HA: (a) modelo computacional de la estructura cristalina hexagonal con simetría $P6_3$. Los iones de calcio están en los vértices de los triángulos alrededor de cada grupo hidroxilo (rojo). (B) perspectiva de la celda unitaria. (52).

En una sola celda unitaria de HA podemos encontrar 14 iones de calcio; de los cuales seis están ubicados dentro de la celda unitaria, y los ocho iones periféricos restantes son compartidos por celdas unitarias adyacentes. De los diez iones

fosfato, 2 permanecen dentro y ocho en la periferia. Los ocho grupos OH^- permanecen en el borde de la celda, compartidos por 4 celdas unitarias cada uno. Por lo tanto, en promedio, cada celda de HA contiene 10 iones de Ca^{2+} , 6 iones de PO_4^- y 2 iones de OH^- .

Un elemento clave de esta estructura radica en su capacidad para formar soluciones sólidas y para aceptar una gran cantidad de sustituyentes aniónicos y catiónicos. Las sustituciones pueden ocurrir en la HA para los iones de Ca^{2+} , los grupos PO_4^- o los grupos OH^- . Se reporta que los cationes (zinc, magnesio, potasio, estroncio, lantano, cadmio, plomo, cobre, hierro) se sustituyen en la red en los sitios de calcio, Ca (II) y Ca(I) y los aniones (F^- , Cl^- , SiO_4^- , CO_3^{2-}) se sustituyen en la red en sitios de hidroxilo o fosfato (figura 6). El volumen del sitio Ca (I) es más pequeño que el sitio Ca (II). Los radios de los cationes sustituidos controlan su localización en estas dos posiciones.

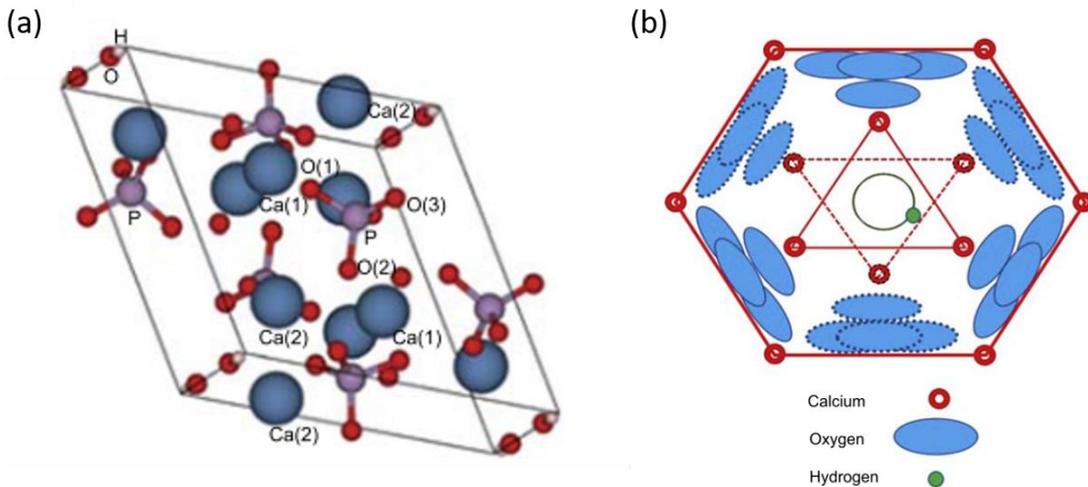
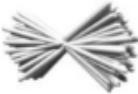


Figura 6. (a) Distribución de los sitios de iones Ca^{2+} , 6Ca (II) y 4 Ca(I). (b) Representación esquemática de la celda unitaria de HA. Las líneas punteadas representan el nivel inferior (53).

Este material presenta diferentes propiedades dependiendo de su modo de preparación (48, 54). La técnica de precipitación química es el método más económico y simple para la preparación de varias arquitecturas de nanomateriales de HA. Las nanopartículas de HA pueden exhibir diversas morfologías como se muestran en la figura 7, de las cuales, las morfologías esféricas y con forma de aguja son las más comunes y adecuadas para diversas aplicaciones tecnológicas

(55). De hecho, el hueso natural está compuesto de nanopartículas de HA con forma de aguja.

Shape	Name(s) in literature	Approx. size range	Method(s) of synthesis*
	irregular, formless, sphere	5 nm–200 μm	ss, mch, cc, hl, sg, hth, em, sch, ht, bs, cp
	sphere, microsphere, nanosphere, ball	10 nm–1000 μm	mch, cc, sg, hth, em, sch, ht, bs, cp
	rod, needle, tube, filament, fiber, wire, whisker, prism, worm, hexagonal prism, platelet, lath, strip	length: 10 nm–150 μm, diameter: 3 nm–50 μm, aspect ratio: 2–1200	ss, mch, cc, hl, sg, hth, em, sch, ht, bs, cp
	plate, flake, sheet	length: 40 nm–50 μm, width: 20 nm–35 μm, thickness: 5 nm–3 μm	cc, hth, bs, cp
	self-assembled nanorods, bundles of nanorods, oriented bundle, oriented raft, enamel prism-like structures, clusters of nanotubes, oriented array of bundled needles, packed nanorods	length: 200 nm–80 μm, width: 100 nm–50 μm (organized nanorods of 10 nm–13 μm diameter and 200 nm–75 μm length)	cc, hl, hth, bs, cp
	dandelion, chrysanthemum, flower, feathery structure, bundle of fibers, self-assembled nanorods, rosette	1–8 μm (organized nanorods of 80–500 nm diameter and 600 nm–5 μm length)	hth, em, bs, cp
	leaf, flake, sheet, plate	800 nm–10 μm (organized nanoplates of 20–100 nm thickness)	cc, hl, cp
	flower	700 nm–60 μm (organized petals of 20 nm–10 μm width and 180 nm–50 μm length)	cc, hth, bs
	porous microsphere, mesoporous sphere	0.5–7 μm (pores of 20–150 nm)	hth, cp
	bowknot, self-assembled nanorods	1.5–2.5 μm (organized nanorods of 100–150 nm diameter and 1–2 μm length)	cp
	dumbbell	2–3 μm (organized nanoparticles of ~50 nm size)	cc

* ss: solid-state synthesis, mch: mechanochemical method, cc: conventional chemical precipitation, hl: hydrolysis method, sg: sol-gel method, hth: hydrothermal method, em: emulsion method, sch: sonochemical method, ht: high-temperature processes, bs: synthesis from biogenic sources, cp: combination procedures.

Figura 7. Diferentes morfologías de las nanopartículas de HA dependiendo del tipo de preparación (48).

2.4.3. El papel de las sustituciones iónicas en hidroxiapatita

Es válido destacar que, a pesar de la similitud entre las apatitas biológicas y las apatitas estequiométricas, estas exhiben diferencias significativas. En términos de composición, la apatita ósea contiene cantidades significativas de iones incorporados en su red o adsorbidos en la superficie del cristal, caracterizados por una baja cristalinidad y un tamaño de cristal pequeño.

Cada sustitución puede influir en las características de la red, lo que tiene un alto impacto en su estabilidad, grado de cristalinidad, tamaño de cristal y morfología, su solubilidad y, en la liberación de iones en el medio biológico (36). La HA sintética tiene un mayor grado de cristalinidad y, en consecuencia, mayor estabilidad estructural.

Varios de estos iones pueden tener un papel biológico significativo, influyendo directamente en la respuesta de las células huésped y/o ejerciendo un papel terapéutico, generalmente de forma dependiente de la dosis, por lo tanto, su presencia y cantidad en el entorno periimplantario es significativa (41).

El reemplazo de iones Ca^{2+} con cationes que tienen diferente carga y tamaño iónico puede desequilibrar la carga y los parámetros de la red. Los cationes bivalentes sustituyen estos iones sin alterar la carga, pero las sustituciones de cationes monovalentes/trivalentes conducen a un desequilibrio de carga que puede superarse creando vacantes suplementarias o mediante la sustitución de otros cationes y aniones (53). La sustitución de HA con cationes de mayor diámetro puede expandir el volumen de la celda. Sin embargo, este fenómeno no ocurre cuando los cationes monovalentes más grandes sustituyen los iones Ca^{2+} , ya que crea vacantes suplementarias que reducen el diámetro del canal y, en consecuencia, reducen el parámetro del eje.

Cuando se sustituyen por cationes bivalentes más pequeños o más grandes se genera una contracción y expansión de los parámetros de la red de HA respectivamente. Por lo general, los cationes más grandes prefieren ocupar el sitio (II). Sin embargo, otros factores como la carga de aniones y la fuerza de enlace

también influyen en la selección de la posición. Los cationes de menor tamaño que el calcio, disminuyen el volumen de cristal de HA, mientras que los cationes de mayor tamaño lo aumentan.

Las técnicas de deposición húmeda son los métodos más investigados para fabricar recubrimientos de HA sustituidos con iones, debido a la posibilidad de incorporarlos fácilmente durante una etapa preliminar de síntesis química húmeda, la posibilidad de cubrir morfologías complejas y los costos relativamente bajos.

2.4.4. Requerimientos para recubrimientos de HA

Para realizar con éxito sus funciones una vez implantados, los depósitos de HA deben cumplir una serie de requisitos con relación a determinadas características regulados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y las normas internacionales ISO. Los requerimientos que un recubrimiento debe cumplir se muestran en la figura 8 en términos de: espesor, composición de fase, cristalinidad, relación Ca/P, microestructura, porosidad, textura superficial y rugosidad (36). Todos estos parámetros influyen en las propiedades mecánicas resultantes de los depósitos, como la cohesión, la unión, la resistencia a la tracción y al corte, el módulo de Young, la tensión residual y la vida de fatiga.

Properties	Specification
Thickness	Not specific
Crystallinity	62% minimum
Phase purity	95% minimum
Ca/P atomic ratio	1.67–1.76
Density	2.98 g/cm ³
Heavy metals	<50 ppm
Tensile strength	>50.8 MPa
Shear strength	>22 MPa
Abrasion	Not specific

Figura 8. Requerimientos que deben cumplir los recubrimientos de HA según la FDA (50).

Varios autores han sugerido que un recubrimiento de HA ideal para implantes ortopédicos sería uno con baja porosidad, fuerte resistencia cohesiva, buena adhesión al sustrato, alto grado de cristalinidad y alta estabilidad química y de fase (56). Otros, sin embargo, indican que un recubrimiento amorfo puede ser más beneficioso para el crecimiento óseo temprano que un recubrimiento con alta cristalinidad. Además, algunas propiedades deben conciliarse entre sí debido a la naturaleza del proceso de fabricación.

2.5. Método biomimético

El método biomimético empleado para la obtención de recubrimientos de fosfatos de calcio sobre la superficie del titanio fue desarrollado por *Kokubo y cols.* en 1990 (16) y ha ganado popularidad a lo largo de los años. El mismo implica la inmersión de las muestras en una solución que simula en su composición a la fase inorgánica del plasma sanguíneo humano (SBF-fluido biológico simulado). Además, mimetiza las condiciones fisiológicas del cuerpo, temperatura a 37 °C y pH de 7.4 (38).

El método en su primera variante (57) presentaba como principal limitante que se necesitaban tiempos prolongados de exposición (7-21 días) para obtener los recubrimientos. Varios autores han refinado la técnica y han propuesto modificaciones a diferentes factores que influyen significativamente en el proceso (49).

Las ventajas que ofrece esta técnica son: simplicidad económica, se puede aplicar sobre materiales porosos sensibles al calor, no conductores y con geometrías complejas, además permite la incorporación de agentes bioactivos y proteínas (58). Una de las principales desventajas que presenta es la baja adhesión entre el sustrato y el recubrimiento. Con este método se ha reportado la obtención de recubrimientos densos con estructura cristalina (figura 9) y con espesores de capa menores a 30 μm .

Los mecanismos de precipitación de CaP a partir de soluciones acuosas han sido estudiados, y el proceso ha resultado ser bastante complicado. La obtención de

fases biológicamente relevantes de CaP (OCP, CDHA y HA) ocurre a través de la formación de una o varias fases intermedias y/o precursoras, como DCPA, DCPD y/o OCP.

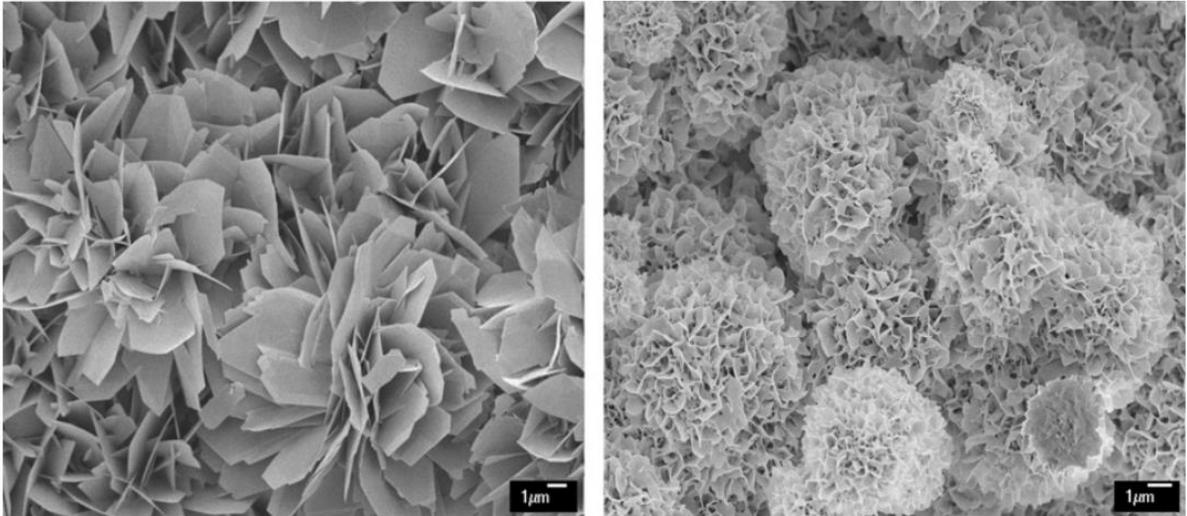


Figura 9. Morfología de recubrimientos de fosfatos de calcio obtenidos por el método biomimético (49)

2.5.1. Influencia de los tratamientos de activación superficial previos

Para la obtención de recubrimientos biomiméticos de CaP, se necesita una preparación específica de la superficie debido a que la bioactividad de las superficies de titanio no es lo suficientemente alta como para inducir la deposición. Se debe crear una capa superficial de óxidos de titanio, hidróxidos y/o titanatos antes de la deposición (50).

Se ha informado que algunos grupos funcionales inducen nucleación heterogénea de apatita en SBF (59). Los grupos Ti-OH en geles de titanio (TiO_2) forman apatita en SBF y los grupos Ti-OH en TiO_2 con estructura de anatasa son más efectivos para la nucleación de apatita que aquellos con estructuras de rutilo o amorfo (60).

Se han utilizado varias estrategias para producir grupos hidroxilo abundantes en la superficie y mejorar la capacidad de unión ósea de los implantes de titanio (61, 62).

Cuando las superficies previamente tratadas se exponen a los fluidos corporales *in vivo*, los grupos OH^- se adsorben a los iones de titanio. Esto conduce a una

desprotonación de la superficie y se forman grupos negativos de Ti-O sobre ella. Estos sitios negativos atraen iones Ca^{2+} del fluido corporal que se unen a la superficie. Por lo tanto, se forma una capa de titanato de calcio amorfo y la superficie se va cargando positivamente a medida que la capa crece debido al aumento de iones Ca^{2+} . Posteriormente esta capa atraerá iones de fosfato cargados negativamente, que se unen a la superficie, y se forma una fase metaestable de CaP. Con el transcurso del tiempo, esta capa cristaliza en apatita similar al hueso porque es termodinámicamente más favorable que el fosfato de calcio amorfo adopte una estructura cristalina en un ambiente húmedo (63). Con tal fin, varios métodos efectivos para los pretratamientos reportados hasta la fecha se describen a continuación.

2.5.1.1. Tratamientos ácidos

El tratamiento químico por ataque ácido consiste en el desprendimiento de partículas de metal de la superficie, mediante su inmersión en ácidos fuertes, como el ácido fluorhídrico (HF), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl) o el ácido nítrico (HNO_3). Esta técnica ganó popularidad entre los fabricantes para preparar superficies de titanio texturizadas (64). Es un método sustractivo mediante el cual se generan variaciones topográficas en la superficie de titanio. La topografía de la superficie obtenida por ataque ácido puede modularse de acuerdo con el tratamiento previo, por ejemplo, chorro de arena, usando mezclas de ácidos, usando diferentes temperaturas y usando diferentes tiempos de grabado.

El tratamiento ácido tiene la ventaja de controlar el grado de porosidad de la superficie. De igual forma el doble grabado con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico permite obtener una superficie uniforme rugosa con microporos, lo que aumenta el área de contacto entre el implante y los tejidos que lo sostienen, y proporciona un buen anclaje y oseointegración (65).

El ataque ácido provoca la formación de una delgada capa de óxido sobre la superficie. Dicha capa se encuentra constituida principalmente por dióxido de titanio (TiO_2), aunque pueden aparecer residuos de la mezcla ácida como iones

fluoruro (F⁻) e hidrógeno libre. Estas impurezas pueden permanecer en la capa de óxido incluso después de realizar un posterior tratamiento térmico, por lo cual el tratamiento ácido es generalmente combinado con un segundo tratamiento para mejorar las propiedades bioactivas de las superficies.

2.5.1.2. Tratamientos de oxidación

Los tratamientos de oxidación empleando soluciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producen una capa de gel de titanio delgada y amorfa que se encuentra compuesta fundamentalmente por una mezcla de peróxocomplejos de titanio (66). A menudo se utilizan bajas concentraciones de los ácidos sulfúrico y clorhídrico para incrementar el poder oxidante del peróxido. Estos tratamientos se han realizado empleando diferentes tiempos de exposición que van desde 20 min hasta 1 hora y varias temperaturas.

La morfología obtenida con este tipo de tratamiento se muestra en la figura 10 donde se observa la obtención de superficies porosas y la presencia de grietas. La capa obtenida de estructura amorfa cristaliza en la fase anatasa del dióxido de titanio al ser calentada a temperaturas superiores a 300 °C, con lo cual se obtiene una superficie altamente bioactiva, mientras que el rutilo comienza a ser dominante a temperaturas mayores de 700 °C (67). En medio acuoso, la anatasa es capaz de protonarse, favoreciendo la formación de grupos Ti-OH sobre su superficie. La presencia de estos grupos funcionales facilita la nucleación y posterior deposición de fosfatos de calcio como se ha explicado anteriormente.

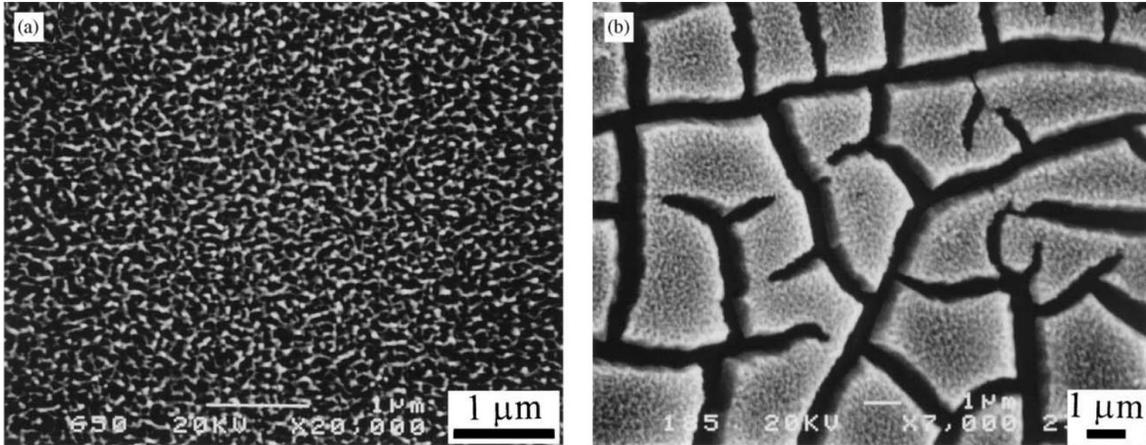


Figura 10. Imágenes SEM de las capas de gel de titania formadas en las superficies de Ti después del tratamiento con la solución de H₂O₂ / HCl a 80 °C durante (a) 20 min; (b) 60 min (67).

2.5.1.3. Tratamientos alcalinos

Ha sido reportado que el tratamiento alcalino en solución de hidróxido de sodio (NaOH) produce una capa de gel de titanato de sodio en la superficie del titanio (66). Esta capa induce la deposición de apatita en SBF y, por lo tanto, se considera bioactiva. Los titanatos formados más reportados son el tri (Na₂Ti₃O₇), el penta (Na₂Ti₅O₁₁) y el hexatitanato de sodio (Na₂Ti₆O₁₃), siempre con estructuras amorfas. En la aplicación de este tratamiento se emplean generalmente disoluciones concentradas de NaOH entre 5 y 10 mol/l y una exposición a 60 °C durante 24 horas. Posteriormente se aplican tratamientos térmicos a 600 °C durante 1 h para la cristalización de la estructura.

Una vez formada esta capa de titanato de sodio se espera que la superficie obtenida sea capaz de liberar, mediante una reacción de intercambio iónico, iones Na²⁺ en una disolución acuosa, favoreciendo la formación de grupos Ti-OH.

En la figura 11 se muestra la morfología de la superficie del sustrato posterior a la aplicación de tratamiento alcalino. Esta se caracteriza por ser una capa libre de grietas, uniforme y con forma de pluma. Típicamente, las cuchillas interconectadas de 70 nm de espesor han creado redes porosas en forma de pluma con un tamaño hueco medio de 200 nm según reportan *Rastegari y Salahinejad* en 2019 (68).

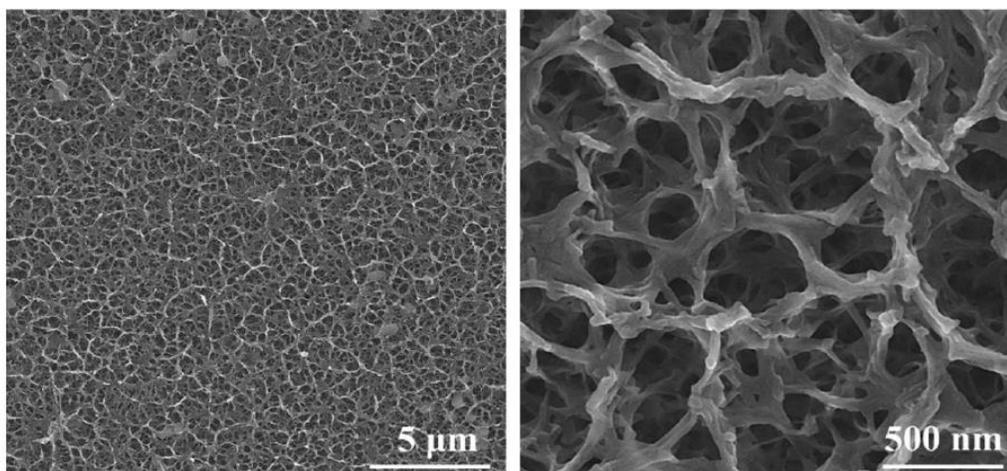


Figura 11. Morfología obtenida posterior a la aplicación de tratamiento alcalino en solución NaOH (5 M) a 60 °C durante 24 h, y tratamiento térmico a 60 °C durante 24 h (68).

Se ha demostrado que la bioactividad del gel de titanato de sodio depende en gran medida de la liberación de iones del gel (69), y su capacidad de formación de apatita se pierde por completo cuando el titanio se almacena en un ambiente húmedo durante un largo período de tiempo, debido a la liberación de iones Na^{2+} del titanato (12).

Por tal motivo se estudia el efecto de la incorporación de iones Ca^{2+} en las superficies, ya que se espera que el calcio exhiba una mayor capacidad de formación de apatita, puesto que los iones Ca^{2+} liberados aumentan de manera más efectiva el producto de actividad iónica de la apatita en el fluido corporal circundante que los iones de sodio (figura 12).

En estudios realizados por *Kokubo y cols* (12), las superficies tratadas con NaOH evidenciaron una capacidad de formación de apatita relativamente baja en SBF, sin embargo, la capacidad de formación de apatita aumentó notablemente en el tratamiento térmico posterior. El metal tratado con NaOH- CaCl_2 mostró una capacidad de formación de apatita ligeramente mayor que el metal tratado con NaOH. Su capacidad de formación de apatita disminuyó significativamente con el tratamiento térmico posterior, pero aumentó notablemente después de un tratamiento con agua caliente o autoclave aplicado posterior al tratamiento térmico.

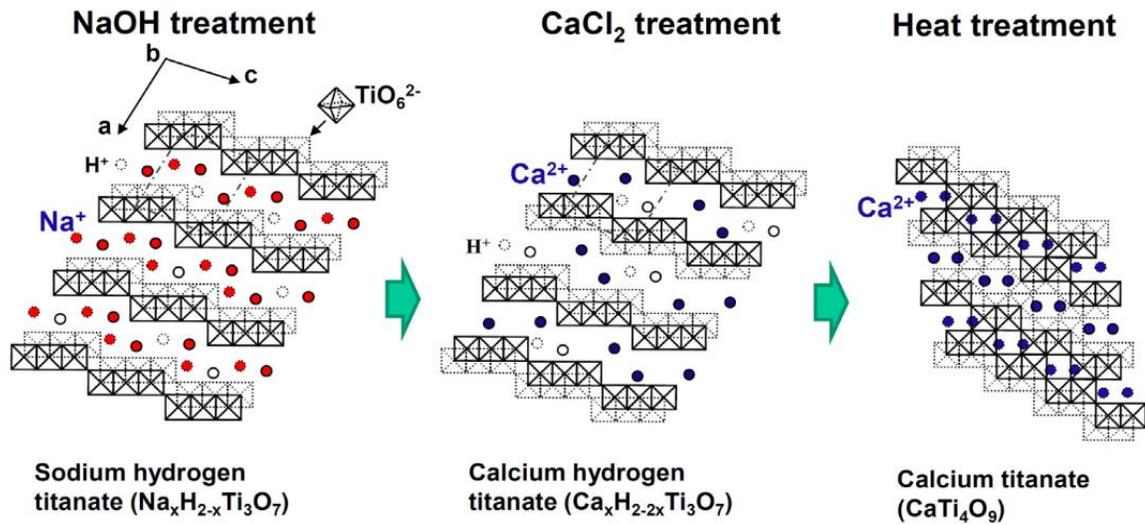


Figura 12. Estructuras de titanato de hidrógeno y sodio, titanato de hidrógeno y calcio y titanato de calcio proyectadas en un plano perpendicular al eje b cristalográfico (70).

2.5.2. Influencia de la composición y concentración de las disoluciones

El método biomimético, en su forma inicial, utilizaba disoluciones similares en composición al plasma sanguíneo humano, manteniendo la misma proporción de los constituyentes del plasma. Existen reportes del empleo de diferentes composiciones de SBF (71), no obstante, no se aprecian grandes diferencias en su composición. Generalmente se utilizan contenidos de calcio y fósforo que permiten establecer una relación $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-} = 2,5/1$.

El uso de estas composiciones en las disoluciones implica que se requieran de tiempos de tratamiento prolongados para que los sustratos base titanio queden totalmente recubiertos. Con el objetivo de disminuir los tiempos de exposición algunas variantes han sido reportadas. La primera consiste en incrementar la concentración de iones calcio y fosfato en las disoluciones y la segunda se basa en mejorar la bioactividad de las superficies a recubrir mediante la aplicación de diferentes tratamientos de activación.

En la práctica, solo aquellas disoluciones en las que se incrementa de forma apreciable el contenido de calcio y fosfato intensifican el proceso de deposición de los fosfatos de calcio y disminuyen significativamente el tiempo necesario para obtener el recubrimiento.

Las disoluciones sobresaturadas en calcio (SCS) se pueden dividir en dos grandes grupos: las que mantienen los componentes del plasma sanguíneo (o la mayoría de estos), incrementando su contenido y las que eliminan varios de sus componentes e incrementan el contenido de las fuentes portadoras de calcio, fósforo y en algunos casos de HCO_3^- .

La concentración de calcio en el SBF original sólo alcanzaba los 2,5 mmol/l, mientras que en trabajos posteriores se reporta la utilización de este ion en un intervalo entre 12,5 mmol/l (SBF x 5) y 25 mmol/l (SBF x 10) (26, 72). La tendencia a incrementar la concentración de iones calcio en la disolución se justifica porque dicho aumento puede contribuir a acelerar las reacciones químicas que originan disminuyendo los tiempos de formación del recubrimiento de varios días a tan solo un día o incluso unas pocas horas.

Generalmente, el incremento de la concentración de iones hidrógeno-fosfato y fosfato (HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) en la disolución se realiza paralelamente al aumento del contenido de iones calcio (manteniendo la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-} = 2,5/1$). No obstante, algunos investigadores han desarrollado disoluciones en las que no se mantiene dicho parámetro.

También el contenido de iones HCO_3^- puede influir significativamente sobre la velocidad de deposición de las capas de fosfatos de calcio y sobre la cristalinidad y composición de fases presentada por el depósito. El uso de bajos contenidos de este ion o su ausencia repercute en la obtención de estructuras cristalinas, mientras que su incremento puede provocar la formación de estructuras amorfas. La inclusión de HCO_3^- en la disolución también puede favorecer la aparición de iones CO_3^{2-} en el recubrimiento y la formación de hidroxiapatita carbonatada (2).

2.5.3. Influencia del pH

El pH es uno de los factores que influye sobre el espesor y la composición química y física de los recubrimientos, así como también sobre la velocidad de la deposición de los recubrimientos. La precipitación de hidroxiapatita ligeramente carbonatada (CDHA) es termodinámicamente favorable cuando el pH de la disolución es superior a 5,0; mientras que la precipitación de hidroxiapatita (HA)

comienza a partir de valores de pH de 5,4. El fosfato octacálcico (OCP) se obtiene cuando el pH es superior a 6,3 y el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) no precipita en la disolución.

En diferentes trabajos se reporta el uso de niveles de pH iniciales, tanto básicos como ligeramente ácidos cuando se utilizan disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato (73, 74). En algunas variantes de tratamiento, el medio se transforma de ácido al inicio del proceso a básico al finalizar la deposición.

El pH inicial de la disolución también puede afectar el tamaño de las partículas formadas y la porosidad. El incremento de los valores del pH de la disolución puede propiciar el surgimiento de recubrimientos densos, mientras que su disminución en ocasiones favorece incrementos en la porosidad de las capas.

2.6. Influencia de tratamientos térmicos posteriores

Posterior a la deposición se pueden aplicar diversos tipos de tratamientos para proporcionar cristalización/recristalización de las fases obtenidas, así como para mejorar su fijación y evaporar las trazas de disolventes atrapado dentro de los depósitos. Por ejemplo, el tratamiento térmico posterior al depósito (recocido) conduce a la conversión de las fases amorfas depositadas en compuestos más estables, con el aumento simultáneo de su cristalinidad, mejorando la resistencia a la corrosión y reduciendo el estrés residual (50).

2.7. Zinc

El zinc es un oligoelemento importante en el desarrollo y el crecimiento normal del sistema esquelético humano. Es un elemento traza en los tejidos mineralizados humanos, en particular en los huesos, que contiene la mayor parte de la cantidad total de zinc presente en el cuerpo (0-39 ppm) (53). Por lo general, es el segundo metal de transición más abundante en el organismo después del hierro.

A pesar de su baja concentración, tiene un papel biológico clave, ya que actúa como cofactor de varias enzimas incluidas las relacionadas con la replicación de ARN y ADN y la síntesis de proteínas, es capaz de influir en el metabolismo de los ácidos nucleicos, mejora la capacidad de adsorción de las proteínas y

promueve la formación y regeneración ósea al favorecer la actividad de los osteoblastos y disminuir la de los osteoclastos (41). El zinc puede sustituir al calcio actuando así como un inhibidor de la cristalinidad (36) y también su deficiencia provoca una disminución en densidad ósea (53).

2.7.1. Recubrimientos bioactivos con zinc

Numerosos estudios han informado que las propiedades de HA podrían mejorarse cuando se le incorporan varios elementos como Na, Sr, Mg, K, Mn, Ag, Ce, Eu, Cu, Zn, Sm, etc. A lo largo de los años, se ha llevado a cabo una amplia investigación para el desarrollo de capas uniformes, reproducibles y confiables utilizando diversas técnicas avanzadas de deposición.

En 2017 *Predoi y cols* (75) realizaron la síntesis y caracterización de HA dopada con pequeñas concentraciones de Zn empleando el método de coprecipitación. Los resultados obtenidos por los estudios XRD y FTIR demostraron que el dopaje de hidroxiapatita con bajas concentraciones de zinc condujo a la formación de una estructura hexagonal con parámetros reticulares característicos de la hidroxiapatita. Los autores demostraron que el tamaño del cristalito y los parámetros de la red dependen de las sustituciones de Ca^{2+} con Zn^{2+} en la estructura apatítica. En los XRD de Zn-HA obtenidos, los picos de difracción se ampliaron al aumentar la concentración de zinc, sugiriendo que la cristalinidad de la apatita disminuye significativamente con el aumento de la concentración de zinc.

Dos años más tarde, *Predoi y cols.* (22) sintetizaron Zn-HA por medio de la técnica de sol-gel, y las capas fueron depositadas en sustratos de titanio mediante spin coating. Posteriormente se aplicaron tratamientos a 500 °C y 700 °C. Los resultados de XRD revelaron los picos de difracción de la hidroxiapatita hexagonal en todas las muestras investigadas y la influencia de la temperatura de recocido en el recubrimiento se vio claramente. No se detectaron picos de impurezas de Zn metálico en los patrones.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de tratamientos aplicados

El procedimiento experimental llevado a cabo para el desarrollo de este trabajo de investigación se muestra en la figura 13. El trabajo estuvo dividido en dos secciones principales, durante la primera se realizaron los tratamientos previos de modificación del sustrato y en segundo lugar se aplicaron los tratamientos para la obtención de los recubrimientos.

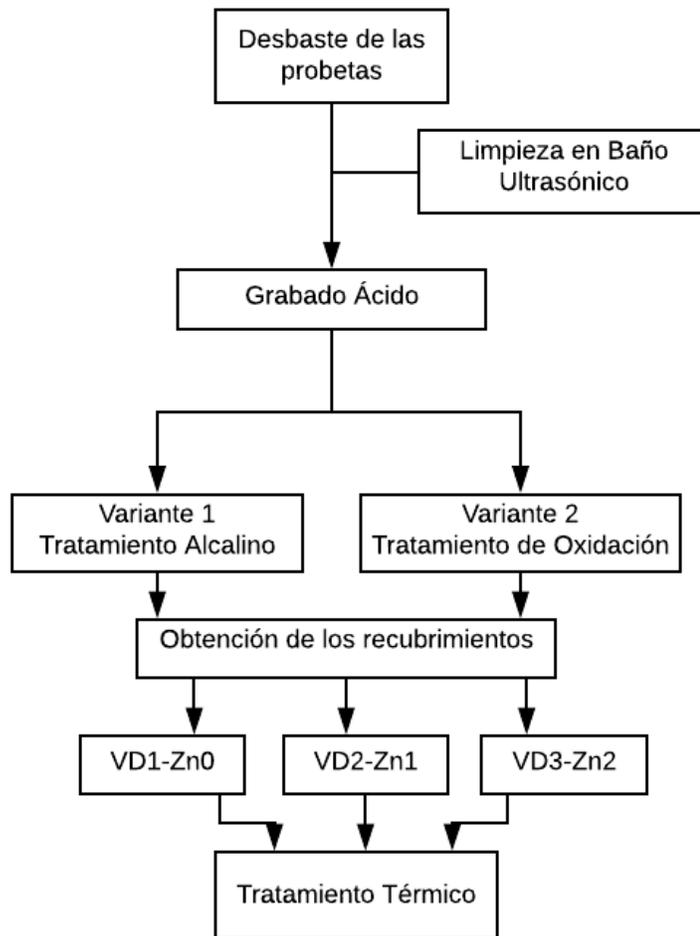


Figura 13. Diagrama que representa el procedimiento realizado durante la experimentación.

3.2 Materiales empleados para la realización de los ensayos

Los materiales utilizados en este estudio incluyen: aleación de titanio de grado médico Ti6Al4V ELI, ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98 %, Fermont Lab, CAS 7664-93-9), ácido clorhídrico (HCl, 38 %, Fermont Lab, CAS 7647-01-1), peróxido de hidrógeno purificado (H₂O₂, 30 %, Fermont Lab, CAS 7722-84-1), cloruro de calcio anhidro (CaCl₂, Fermont Lab, CAS 10043-52-4), hidróxido de sodio (NaOH, Fermont Lab, CAS 1310-73-2), fosfato monosódico (NaH₂PO₄, Fermont Lab, CAS 10049-21-5), bicarbonato de sodio (NaHCO₃, Fermont Lab, CAS 144-55-8), cloruro de zinc (ZnCl₂, Jalmek Científica, CAS) y agua destilada (CTR Scientific, CAS 7732-18-5).

Las muestras de Ti6Al4V empleadas para la investigación presentaban forma de discos de 19 mm de diámetro y 3 mm de espesor. El corte de las mismas se realizó mediante una cortadora automática de disco de diamante (Struers Accutom-5).

3.3 Preparación Inicial de las Probetas

En una primera etapa posterior al corte, las muestras fueron desbastadas con el objetivo de homogenizar la superficie en una pulidora de placas rotatorias (Struers LaboPol-1) empleando lijas de papel de carburo de silicio (SiC) de 80, 120, 220, 320 y 500 mesh. Posteriormente utilizando un baño ultrasónico se lavaron en acetona, alcohol y agua desionizada durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.4 Aplicación de los tratamientos de modificación superficial

Los reactivos analíticos empleados se pesaron empleando una balanza analítica digital (Ohaus Pioneer). Todos los tratamientos se aplicaron empleando una plancha de calentamiento con agitación (Thermo Scientific Cimarec⁺ Series).

3.4.1 Grabado Ácido (GA)

Las probetas desbastadas fueron sometidas a un tratamiento de modificación superficial por ataque ácido siguiendo el procedimiento descrito por *Wang y cols.* (5) empleando una mezcla al 67 % de HCl/H₂SO₄ con relación v/v 1:1, durante 20 minutos a una temperatura de 80 °C. Posteriormente se retiraron de la disolución

ácida con ayuda de una pinza y se enjuagaron con abundante agua destilada. El secado se realizó a temperatura ambiente.

3.4.2 Tratamientos sucesivos en disoluciones de peróxido de hidrógeno y de cloruro de calcio ($H_2O_2/HCl+TT+CaCl_2$)

Posterior al grabado ácido un grupo de probetas seleccionadas fueron tratadas utilizando una mezcla de H_2O_2 y HCl preparada como reportan *Shi y cols.* (11) según el siguiente procedimiento: Se colocaron los tubos de ensayo en un vaso de precipitado sobre la plancha de calentamiento y se le añadió a cada uno 5 ml de la mezcla de H_2O_2 con una concentración 8,8 mol/l y 0,1 mol/l de HCl con relación v/v 1:1. Cuando se alcanzó la temperatura de 80 °C, se procedió a sumergir las muestras por separado en la mezcla oxidante durante 30 minutos. Al finalizar, se extrajeron las probetas, se lavaron en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

A continuación, se aplicó un tratamiento térmico a 400 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de tratamiento las probetas se enfriaron en el horno hasta alcanzar temperatura ambiente.

La segunda parte del proceso consistió en la aplicación de un tratamiento de precalcificación empleando una disolución de $CaCl_2$. Se utilizaron 11,1 g de $CaCl_2$ y 100 ml de agua destilada para preparar una disolución con una concentración de 1 mol/l. Las muestras se sumergieron en la disolución durante 24 horas a una temperatura de 60 °C. Transcurrido el tiempo se extrajeron y enjuagaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Se espera que la aplicación de un tratamiento de precalcificación (Pre-Ca) posterior a la aplicación del tratamiento con peróxido favorezca el proceso de deposición de CaP en esta superficie.

3.4.3 Tratamiento alcalino empleando disoluciones de hidróxido de sodio y de cloruro de calcio ($NaOH+CaCl_2+TT+W$)

Luego del tratamiento en solución ácida, otro de grupo de muestras fueron tratadas empleando disolución de $NaOH$ con concentración de 10 mol/l. Para la preparación de la disolución se utilizaron 40 g de $NaOH$ y 100 ml de agua destilada. El tratamiento se realizó a través del siguiente procedimiento: en un

vaso de precipitado colocado sobre la plancha se ubicaron los tubos de ensayo que contenían 5 ml de la disolución. Cuando se alcanzó la temperatura de 60 °C se sumergieron las probetas por separado y se mantuvieron bajo estas condiciones durante 24 h. Al concluir el proceso, se extrajeron y se enjuagaron con abundante agua destilada.

Posteriormente se utilizaron 11,1 g de CaCl_2 y 100 ml de agua destilada para preparar una disolución con una concentración de 1 mol/l. Las muestras que ya habían sido tratadas en disolución de NaOH fueron sumergidas por separado en la disolución de CaCl_2 en los tubos de ensayo a 40 °C durante 24 h. A continuación, se extrajeron las muestras, se enjuagaron con agua destilada, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Luego se colocaron en la mufla donde se les aplicó un tratamiento térmico durante 1 hora a 600 °C. Finalizado el tiempo de tratamiento se dejaron enfriar lentamente en el horno hasta que se alcanzó temperatura ambiente.

Finalmente, se aplicó un tratamiento de inmersión en agua desionizada durante 24 horas a una temperatura de 80 °C. Se lavaron y dejaron secar a temperatura ambiente. En la figura 14 se presentan imágenes de la aplicación de los tratamientos de modificación superficial descritos.

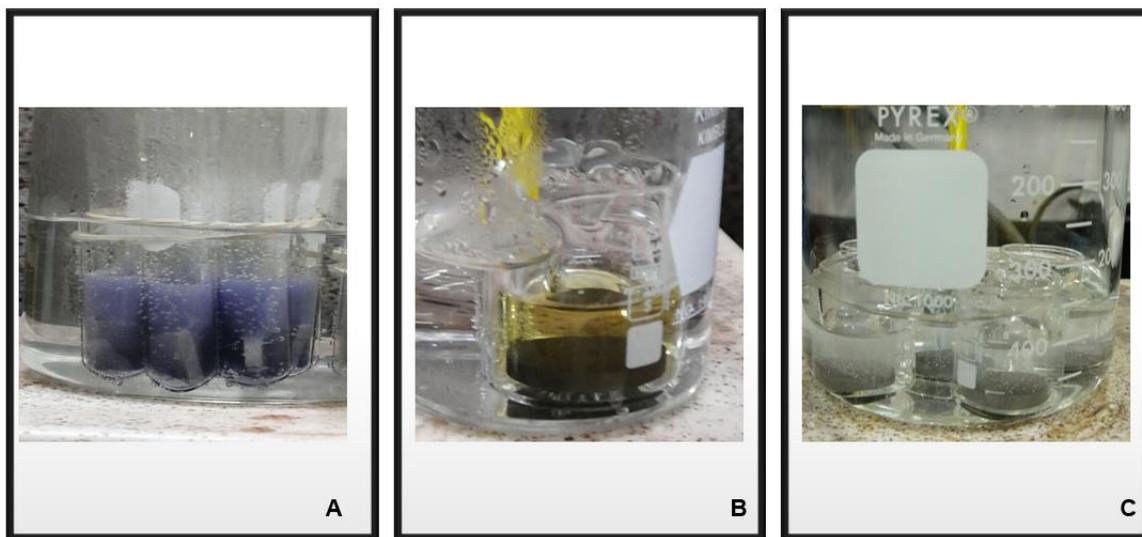


Figura 14. Imágenes de las probetas de Ti6Al4V durante la aplicación de los tratamientos de modificación superficial. A: GA, B: $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}+\text{TT}+\text{CaCl}_2$, C: $\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W}$.

3.5 Preparación de las disoluciones con alto contenido de calcio y fosfato

Una vez realizados las modificaciones previas se procedió a la aplicación del tratamiento para la obtención de los recubrimientos. Se trabajaron disoluciones que presentaban una concentración de iones calcio 4 veces superior al reportado para el SBF original (71).

Se realizaron tres variantes de depósitos para las cuales se prepararon soluciones con alto contenido de calcio y fosfato (SCS) empleado sales de cloruro de calcio (CaCl_2), fosfato monosódico (NaH_2PO_4), bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (76) y cloruro de zinc (ZnCl_2) como fuente portadora de iones zinc. Las concentraciones y las masas de las sales se muestran a continuación en las tablas 1 y 2 respectivamente.

TABLA I
MASAS DE LAS SALES EMPLEADAS PARA PREPARAR 500 ML DE SOLUCIÓN

VARIANTE	MASA DE SALES (mg)				RELACIÓN
	CaCl_2	NaH_2PO_4	NaHCO_3	ZnCl_2	Ca/Zn
1	555	150	80	-	---
2	555	150	80	22	33.4
3	555	150	80	82	8.35

TABLA II
CONCENTRACIÓN EN MOL/L DE LAS SALES EMPLEADAS PARA PREPARAR 500 ML DE SOLUCIÓN

VARIANTE	CONCENTRACIÓN DE SALES (mmol/l)				RELACIÓN
	CaCl_2	NaH_2PO_4	NaHCO_3	ZnCl_2	Ca/Zn
1	10	2.5	1.9	-	----
2	10	2.5	1.9	0.3	33.4
3	10	2.5	1.9	1.2	8.35

Se depositaron 500 ml de agua destilada en un vaso de precipitado y se colocó en la plancha calefactora. La temperatura se fijó en 36.5 °C y se mantuvo una

agitación de 200 rpm. Primeramente, se añadieron las sales de CaCl_2 y NaH_2PO_4 dejando transcurrir 5 minutos entre la adición de cada una. Pasados 5 minutos de la adición de NaH_2PO_4 se disminuyó la velocidad a 100 rpm y se procedió a sumergir las probetas en la solución. Transcurridos 30 minutos de la adición de la última sal se procedió a adicionar NaHCO_3 y a los 3 minutos se añadió el ZnCl_2 (para las variantes de tratamiento 2 y 3 mencionadas en la tabla). Finalmente, se procedió a extraer las muestras a las 4 horas posterior a la inmersión de las probetas y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las imágenes durante el proceso de deposición para las tres variantes de solución se muestran en la figura 15.

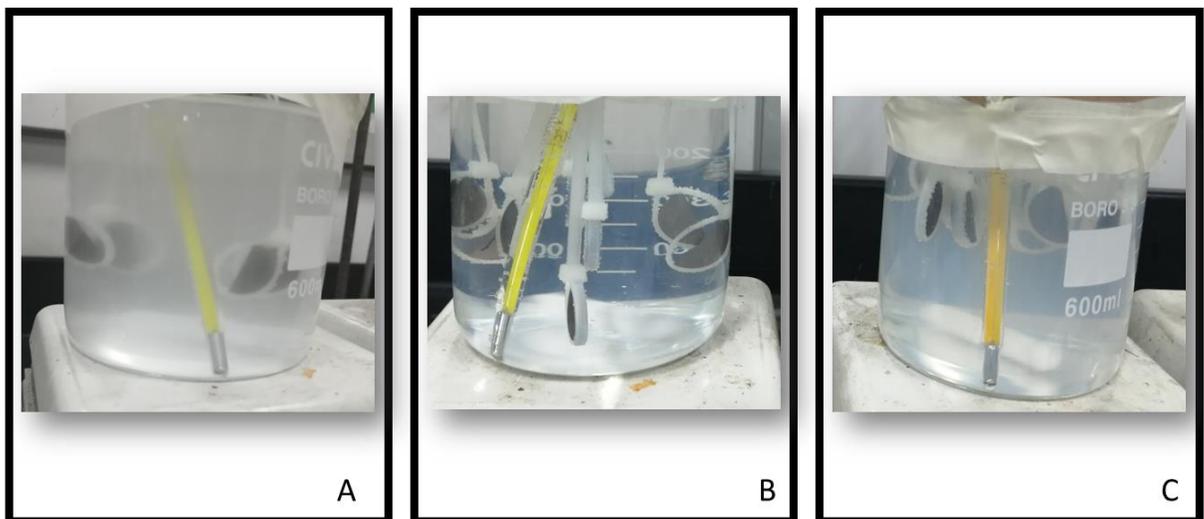


Figura 15. Imágenes de las probetas de Ti6Al4V durante la aplicación de los tratamientos para la obtención de los recubrimientos: A) VD1-Zn0, B) VD2-Zn1, C) VD3-Zn2.

3.6 Tratamiento pos-deposición

Posterior a la obtención de los recubrimientos las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico empleando una Mufla (Felisa FE-340) siguiendo la rampa de calentamiento que se describe a continuación.

1. Se calentó el horno hasta alcanzar una temperatura de 500 °C.
2. Se mantuvieron las probetas bajo esta temperatura 30 min
3. Se aumentó la temperatura hasta alcanzar los 800 °C
4. Se mantuvieron las probetas en esta temperatura durante 1 h.

5. Las probetas se enfriaron en el horno hasta alcanzar temperatura ambiente.

3.7 Diseño experimental

Se pretende evaluar la influencia de las relaciones Ca/Zn empleadas en el proceso de deposición sobre la:

- ✓ Morfología de los recubrimientos
- ✓ Contenido de Zn en la capa
- ✓ Composición de fase de los recubrimientos

3.8 Técnicas de Caracterización de las superficies modificadas

Con el fin de evaluar la calidad de los tratamientos de modificación superficial realizados sobre las probetas y los recubrimientos de fosfatos de calcio obtenidos se emplearon las técnicas de caracterización que se describen a continuación.

3.8.1 Microscopia Electrónica de Barrido

Para la caracterización morfológica de las diferentes superficies obtenidas se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM, HITACHI SU8000). El haz de electrones incidente tenía un voltaje de aceleración de 2 kV y se utilizó un detector de electrones secundario en la lente.

3.8.2 Espectroscopia por energía dispersiva de Rayos X

La composición química elemental de las superficies obtenidas se detectó mediante análisis semicuantitativo empleando un Detector de Energía Dispersiva de Rayos X EDAX acoplado a un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, JEOL JSM-6510LV). El voltaje de aceleración del haz de electrones incidente aplicado fue de 20 kV.

3.8.3 Difracción de Rayos X

Las fases cristalinas de las superficies obtenidas se investigaron empleando difracción de Rayos X (XRD, PANalytical Empyrean). Los espectros se registraron en el intervalo de 10-90° en 2 θ , operando a 45 kV y 40 mA, con una

velocidad de 0,013°/ 10 segundos. Se utilizó una fuente de radiación de Cu K α (λ = 0,154 nm).

3.8.4 Espectrometría de fotoelectrones inducidos por Rayos X

La química de superficie se detectó usando Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS, K-alpha™ Thermo Scientific™) con irradiación de Al K α ($h\nu=1486.68\text{eV}$). Las energías de unión para cada espectro se calibraron con base a los espectros C1s de 284.6 eV. Se realizó un análisis de espectro completo y de alta resolución para los elementos (P, Zn, Na, Ca, O y C) en cada una de las superficies y posteriormente se repitió el mismo análisis luego de realizar un decapado con iones Ar $^+$ a una velocidad de 1.19 nm/seg durante 30 seg. Se empleó el software Thermo Scientific™ Avantage™ para el procesamiento de los resultados.

3.8.5 Rugosidad superficial

La rugosidad de las superficies se determinó mediante el empleo de un sistema de análisis superficial 3D Alicona IF EdgeMaster. Con este sistema de medición óptica empleando una magnificación 10x se determinaron: la rugosidad media de la superficie (R_a), la altura media del pico al valle del perfil de rugosidad de 10 puntos (R_z , promedio aritmético de los cinco picos de perfil más alto y los cinco valles de perfil más bajo en toda la traza de medición) y la altura máxima de pico a valle del perfil de rugosidad ($R_{m\acute{a}x}$).

Se realizaron cuatro mediciones por muestra y se evaluó una muestra por tratamiento.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Introducción

En este capítulo se exponen, analizan y discuten los resultados alcanzados durante el desarrollo de la investigación. Se realiza la caracterización del material empleado como sustrato, de las superficies obtenidas posterior a la aplicación de los tratamientos de activación previos y luego de las tres variantes de recubrimientos estudiadas. Se evalúa la morfología, composición elemental y de fases y rugosidad superficial. Se analiza la influencia de las relaciones Ca/Zn empleadas y del tratamiento térmico sobre la morfología superficial de las muestras recubiertas y sometidas a diferentes tratamientos activación.

4.2. Caracterización del material empleado como sustrato

4.2.1. Morfología

Previo a la aplicación de los tratamientos de activación se caracterizó la superficie del material empleado como sustrato en la investigación. En las imágenes de FESEM mostradas en la figura 16 se presenta la superficie del material posterior al proceso de desbaste realizado. Se puede observar un relieve formado por crestas y valles alineados en la dirección en que se desplazaron las partículas abrasivas durante el desbaste.

4.2.2. Composición elemental y de fases

Se realizó un análisis semicuantitativo por energía dispersiva de rayos X para determinar la composición elemental y corroborar el tipo de material empleado como sustrato. Los resultados evidenciaron los picos fundamentales correspondientes al titanio, así como la presencia de las señales correspondientes a los elementos aluminio y vanadio.

El estudio por difracción de rayos X arrojó un patrón de difracción donde se identificó la presencia de las fases alfa y beta correspondientes a este tipo de

aleación. El espectro EDS obtenido, así como el patrón de difracción de la superficie se presenta en la figura 17.

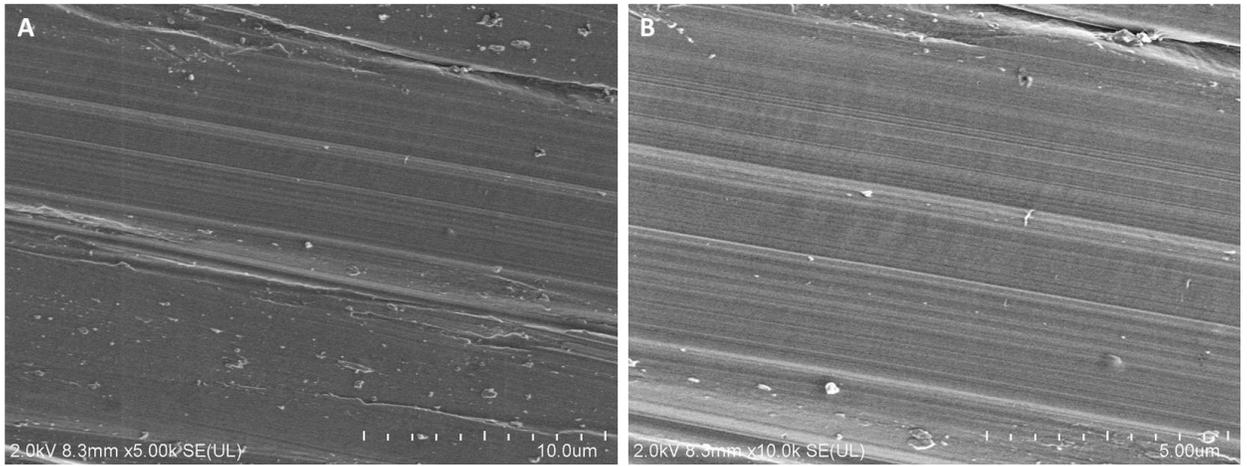


Figura 16. Imágenes FESEM de la superficie del material empleado como sustrato empleando magnificaciones de 5000x y 10000x.

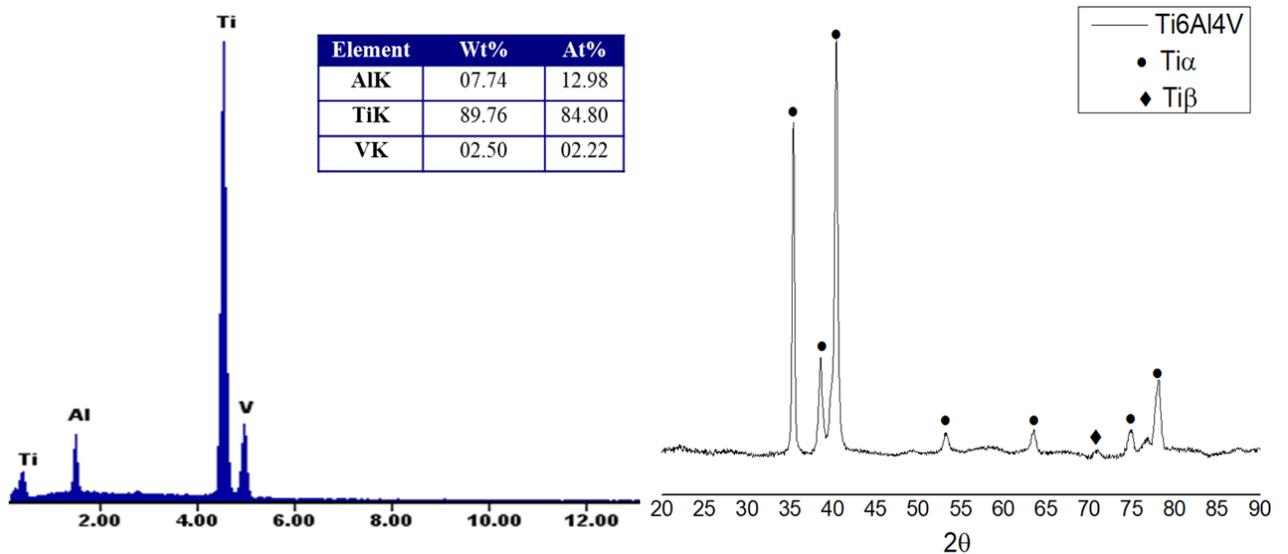


Figura 17. Espectro EDS y patrón XRD del material empleado como sustrato.

4.3. Caracterización morfológica y de composición elemental y de fases del sustrato activado

La modificación superficial de las muestras de Ti6Al4V se realizó mediante métodos químicos. Como primer paso se realizó un tratamiento de grabado ácido (mezcla de ácidos). Para la activación de la superficie de la aleación de titanio estudiada se emplearon dos variantes de tratamientos. La Variante 1 consistió en

la aplicación de los siguientes tratamientos sucesivos: en disolución de H_2O_2/HCl , tratamiento térmico ($400\text{ }^\circ\text{C}-1\text{h}$) y en disolución de $CaCl_2$. En la Variante 2 se aplicaron tratamientos sucesivos en disoluciones de $NaOH$ y de $CaCl_2$, tratamiento térmico ($600\text{ }^\circ\text{C} -1\text{h}$) y tratamiento en agua desionizada.

Posterior a la aplicación de los tratamientos superficiales descritos, las probetas tratadas presentaron cambios de coloración en su superficie como consecuencia del efecto satisfactorio del tratamiento como se puede observar en la figura 18.

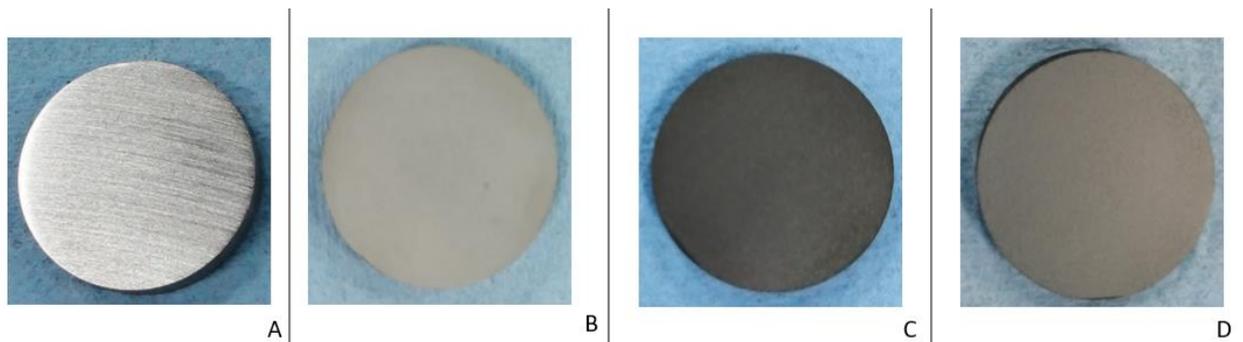


Figura 18. Cambios de coloración en la superficie de las probetas posterior a los tratamientos aplicados, A: Desbaste, B: GA, C: $H_2O_2/HCl+TT+CaCl_2$, D: $NaOH+CaCl_2+TT+W$.

4.3.1. Efecto del tratamiento en grabado ácido (GA)

➤ *Morfología*

El tratamiento de limpieza superficial utilizando la mezcla de ácidos H_2SO_4 y HCl permitió obtener una superficie libre de óxidos nativos y otras impurezas, en la cual se observa la ausencia de las crestas y valles formados en el proceso de desbaste.

En las micrografías presentadas a distintas magnificaciones en la figura 19, destaca la formación de una estructura de red porosa a lo largo de toda la superficie. La obtención de superficies micro porosas es deseada ya que ha sido reportado que los mismos aumentan el área de contacto con el medio. Las cavidades generadas con el tratamiento presentan bordes muy agudos y diversas geometrías.

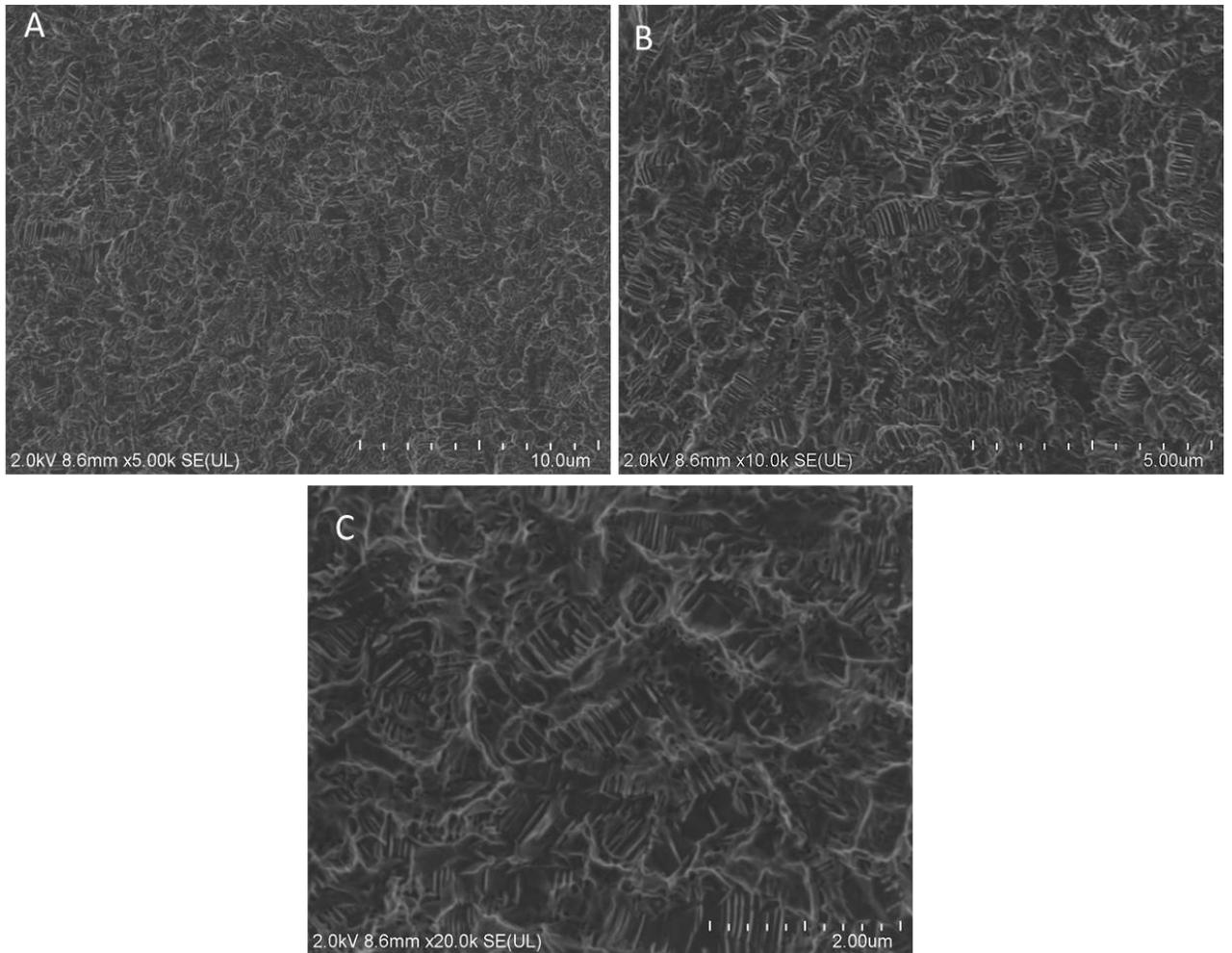


Figura 19. Imágenes FESEM de la superficie del Ti6Al4V posterior a la aplicación del tratamiento en grabado ácido. A) 5000x, B) 10000X y C) 20000X.

➤ *Composición elemental y de fases*

El análisis semicuantitativo de la composición elemental realizado posterior al tratamiento en grabado ácido reveló un espectro cuyas señales principales corresponden a los picos de Ti, Al y V identificados anteriormente (figura 20).

Además, se identificó una señal correspondiente al elemento oxígeno. La presencia de este elemento pudiera ser indicativo de la formación de una delgada capa de óxido.

El patrón de difracción de rayos X obtenido posterior a la aplicación del tratamiento se muestra en la figura 20. Se identificaron las fases correspondientes al titanio y a hidruros de titanio. Estudios previos (2) han demostrado la formación de TiH_2

durante el tratamiento en H₂SO₄. A pesar que se pensó que podría haberse formado una nueva capa de óxido en la capa de TiH₂ debido al contacto con la humedad en el aire, por XRD no se pudo confirmar la existencia de esta capa, posiblemente debido a que sea una capa delgada con baja cristalinidad.

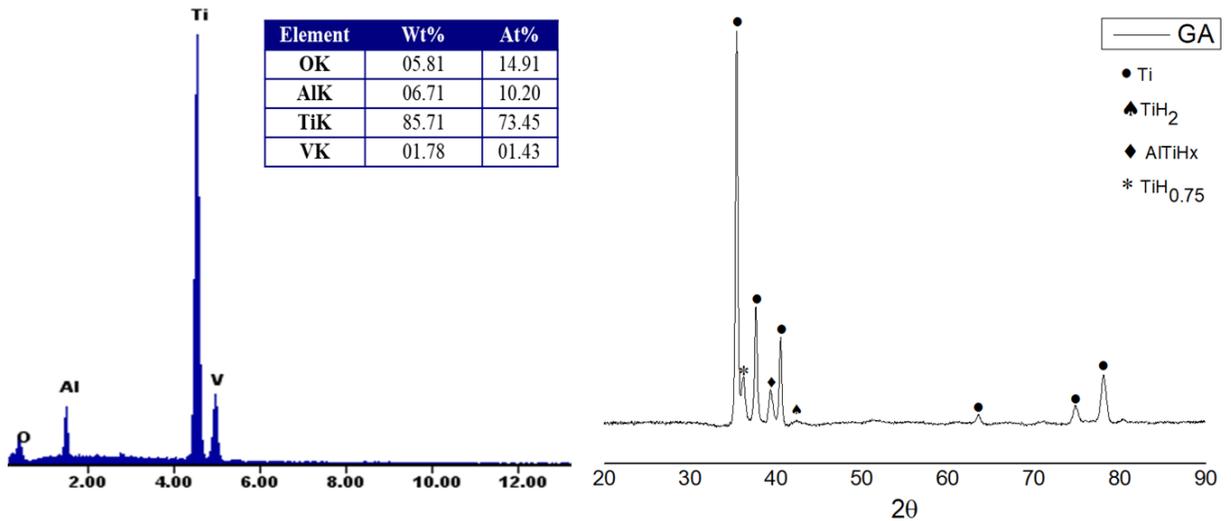


Figura 20. Espectro EDS y patrón XRD del material sometido a tratamiento en grabado ácido.

4.3.2. Efecto de la Variante 1 de tratamiento de activación superficial (H₂O₂/HCl+TT+CaCl₂)

➤ *Morfología*

La Variante 1 de activación superficial, empleando tratamientos de oxidación, térmicos y de precalcificación produjo importantes cambios en la topografía y morfología superficial de las probetas en relación al tratamiento ácido, como se puede observar en la figura 22.

En las imágenes A, B y C se muestran las superficies tratadas con peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico a diferentes magnificaciones. Se observa una morfología con distribución homogénea en toda la superficie en forma de laminillas o ramilletes, con presencia de precipitados globulares, formando aglomerados. Destaca en la superficie la presencia de microgrietas, las cuales han sido reportadas anteriormente como resultado de este tratamiento.

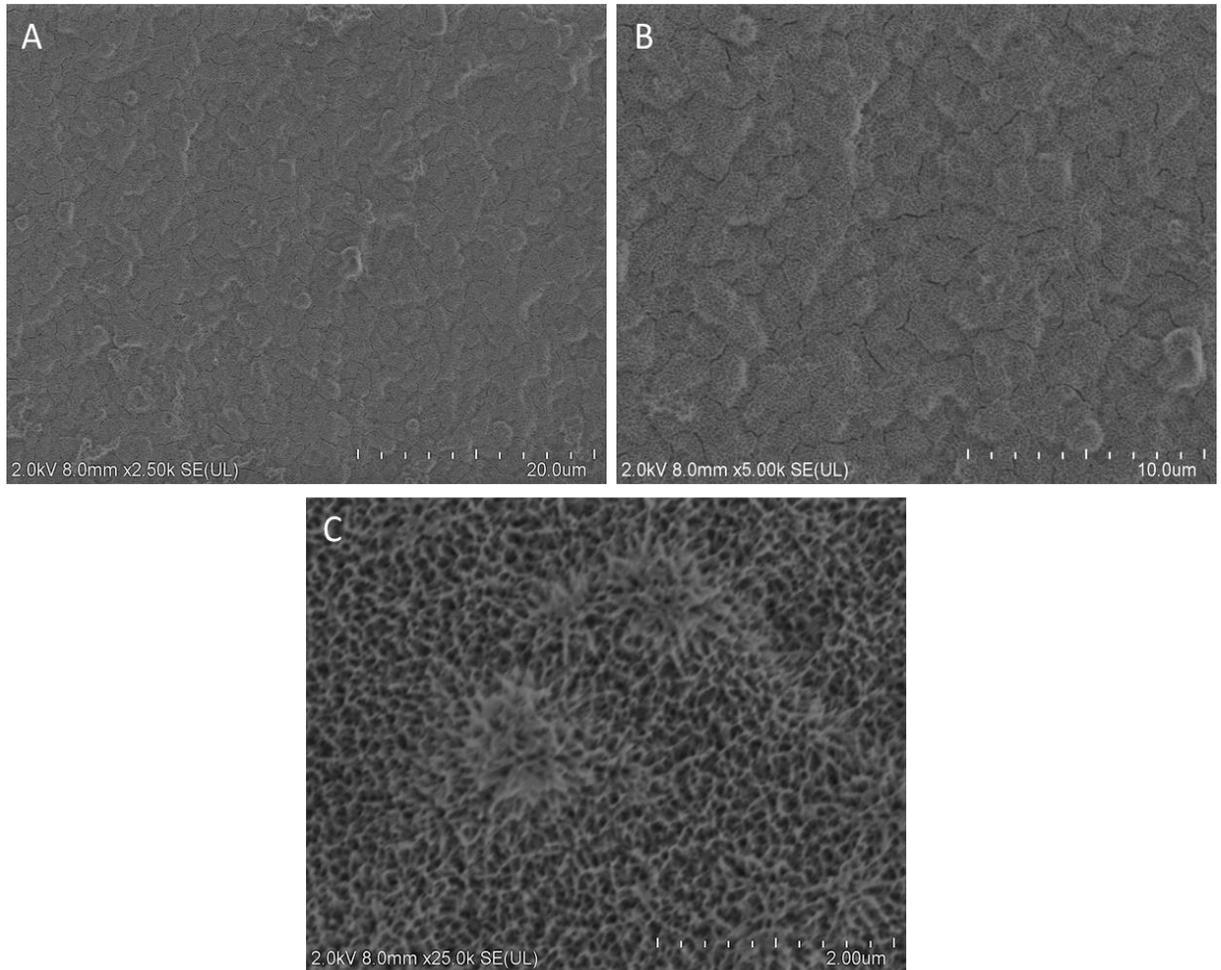


Figura 21. Imágenes FESEM de la superficie de las muestras de Ti6Al4V luego de aplicada la Variante 1 de tratamiento: A, B y C: H₂O₂/HCl. Se emplearon magnificaciones de 2500x, 5000x y 25000x respectivamente.

En la figura 22 se presentan las micrografías (D, E y F) a diferentes magnificaciones correspondientes a la superficie posterior al tratamiento térmico aplicado a 400 °C durante 1 hora. El tratamiento térmico no afectó la morfología previamente obtenida, sin embargo, aumentó el espesor de las grietas, indicando una densificación de la capa de titanato obtenida.

El resultado del tratamiento de precalcificación empleando solución de CaCl₂ se presenta en las imágenes G, H e I a diferentes magnificaciones. En estas superficies no se observan cambios significativos en la morfología de la capa obtenida con respecto a los tratamientos previos aplicados.

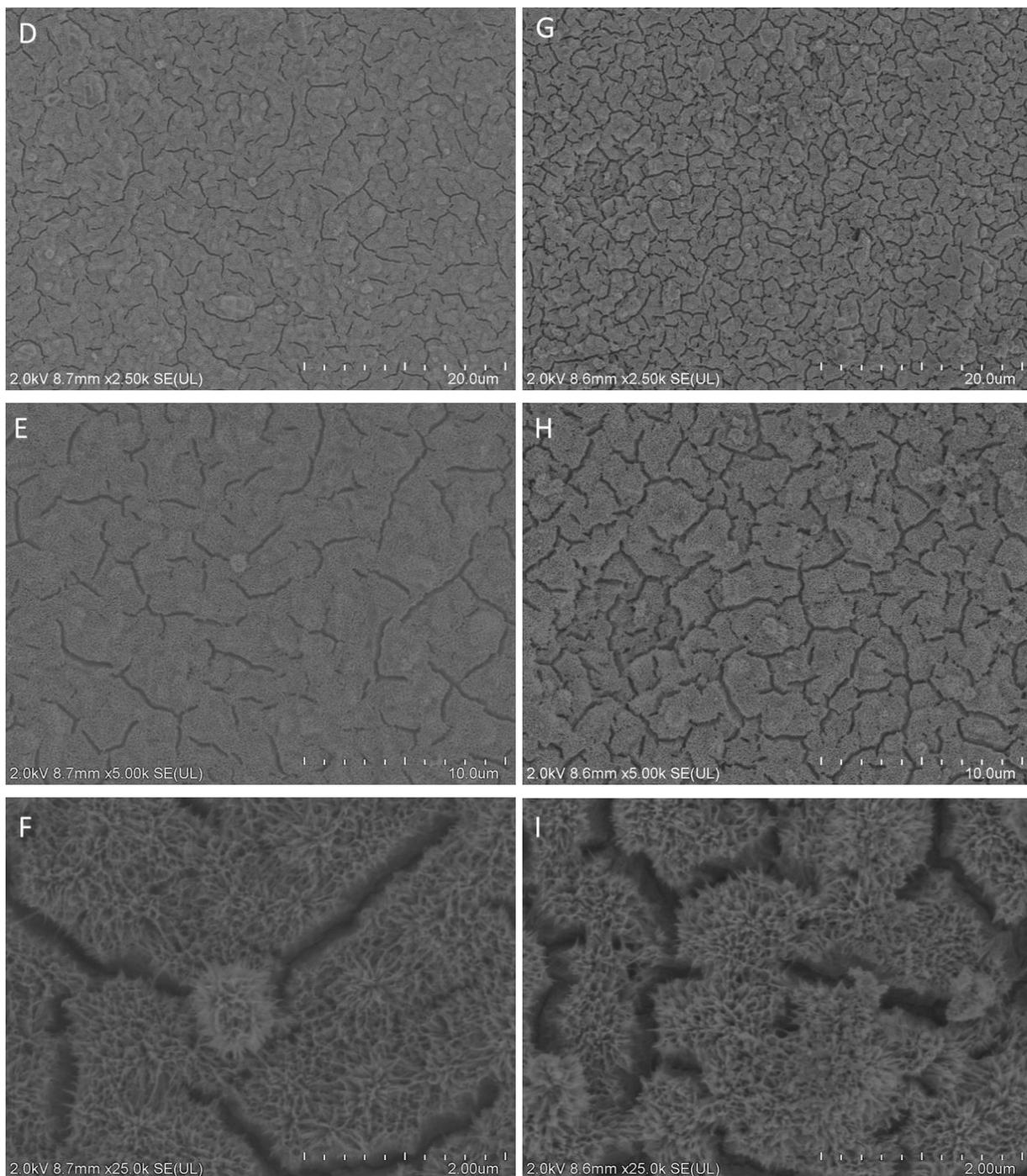


Figura 22. Imágenes FESEM de la superficie de las muestras de Ti6Al4V luego de aplicada la Variante 1 de tratamiento: D, E, F: TT (400 °C-1h); G, H, I: CaCl₂. Se emplearon magnificaciones de 2500x, 5000x y 25000x respectivamente.

➤ *Composición elemental*

El análisis por EDS de la composición elemental realizado posterior a la aplicación de los tratamientos de la Variante 1 de modificación superficial se presenta en la

figura 23. Los espectros adquiridos muestran las señales correspondientes a los picos principales del material base (Ti, Al y V). Se identificó también la presencia de oxígeno y se asoció al proceso oxidativo al que fueron sometidas las probetas. El porcentaje atómico de este elemento aumentó ligeramente posterior a la aplicación del tratamiento térmico.

Para el caso de las probetas que fueron sometidas a tratamiento en disolución de CaCl_2 , se identificó una señal perteneciente al elemento calcio, resultado que confirma la integración química de este en la capa de titanato presuntamente obtenida.

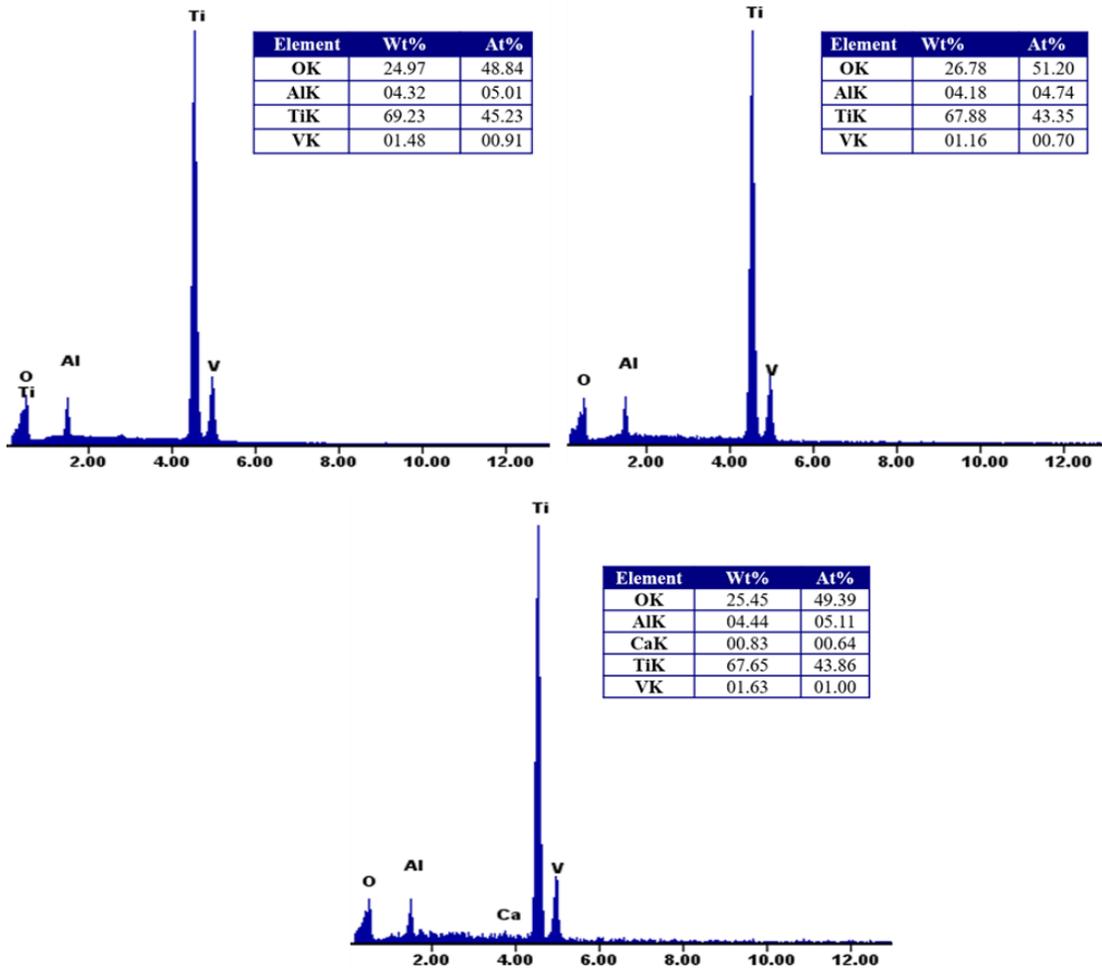


Figura 23. Espectros EDS de las muestras sometidas a los tratamientos de la Variante 1 de activación superficial.

Como el porcentaje atómico detectado de este elemento se encuentra por debajo del 1%, se realizó un análisis superficial por medio de espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X para corroborar la presencia Ca en la capa obtenida.

El resultado del análisis se presenta en la figura 24 donde se muestra el espectro XPS completo de la superficie, en el cual se identificaron los picos correspondientes a Ti, O, C y Ca.

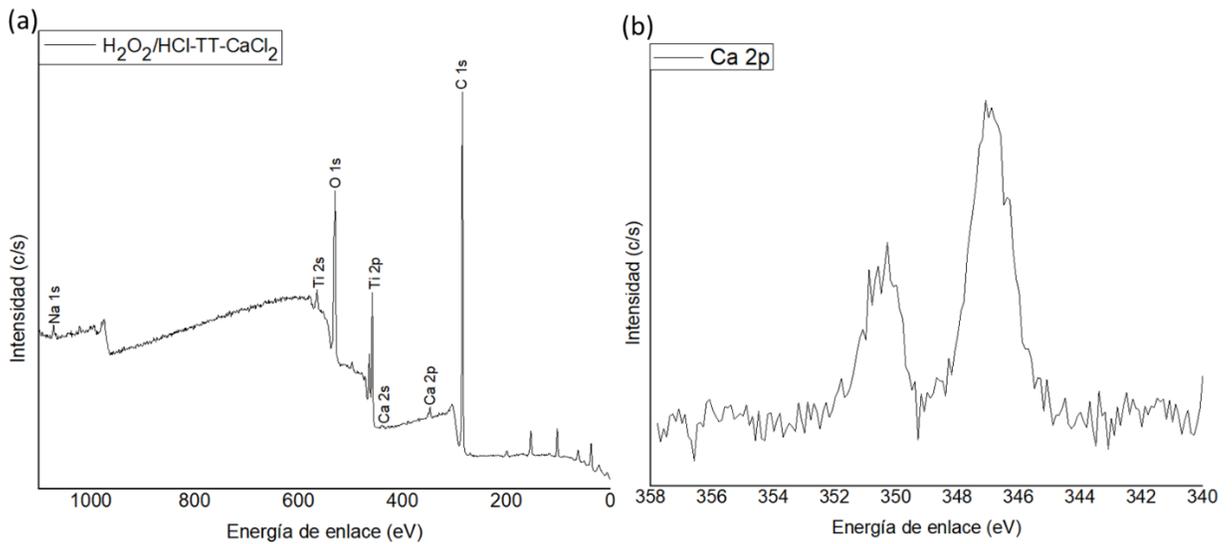


Figura 24. Espectro XPS completo (A) y espectro de alta resolución del Ca 2p (B) de la superficie de Ti6Al4V sometida a los tratamientos de la Variante 1.

➤ *Composición de fases*

Los patrones de difracción obtenidos de la superficie de las muestras posterior a la aplicación de los tratamientos de la Variante 1 se presentan en la figura 25. Ha sido reportado que de la reacción entre la probeta de Ti y la solución de H₂O₂ se obtiene como resultado la formación de una capa de gel de titanio amorfo en la superficie del titanio. En el patrón de difracción obtenido solo se identificaron las fases asociadas al titanio y desapareció el pico asociado al hidruro de titanio obtenido posterior al GA.

El tratamiento térmico aplicado posteriormente a 400 °C transformó el gel del estado amorfo al cristalino lo que se confirma con la presencia del pico en $2\theta = 25^\circ$

identificado como dióxido de titanio con estructura cristalina anatasa. El tratamiento en solución de CaCl_2 no alteró las fases presentes en el material.

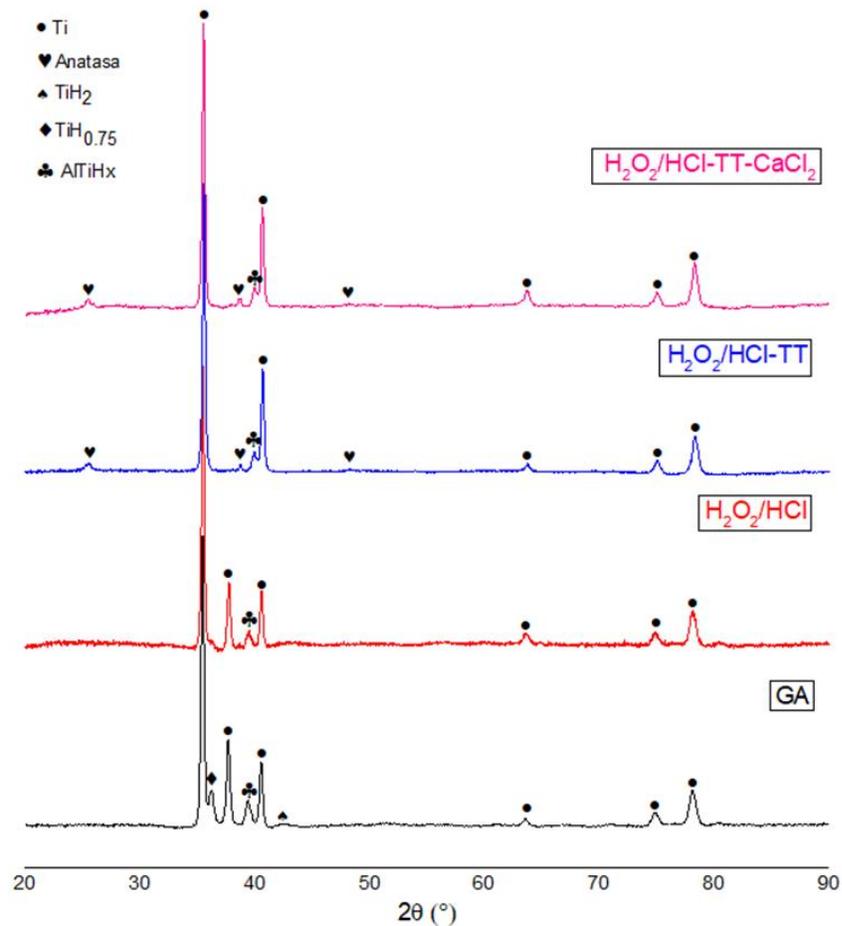


Figura 25. Patrones XRD de las superficies de las muestras de Ti6Al4V sometidos a diferentes tratamientos (Variante 1).

4.3.3. Efecto de la Variante 2 de tratamiento de activación superficial ($\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W}$)

➤ *Morfología*

En la figura 26 se muestran las micrográficas de las superficies de las muestras que fueron tratadas con la Variante 2 de activación superficial. Las imágenes A, B y C se obtuvieron posterior al tratamiento alcalino en disolución de hidróxido de sodio y las identificadas como D, E y F fueron tomadas luego de aplicado el tratamiento térmico. Se observó que, con la aplicación sucesiva de tratamientos en esta variante, la estructura de la red formada no fue esencialmente modificada.

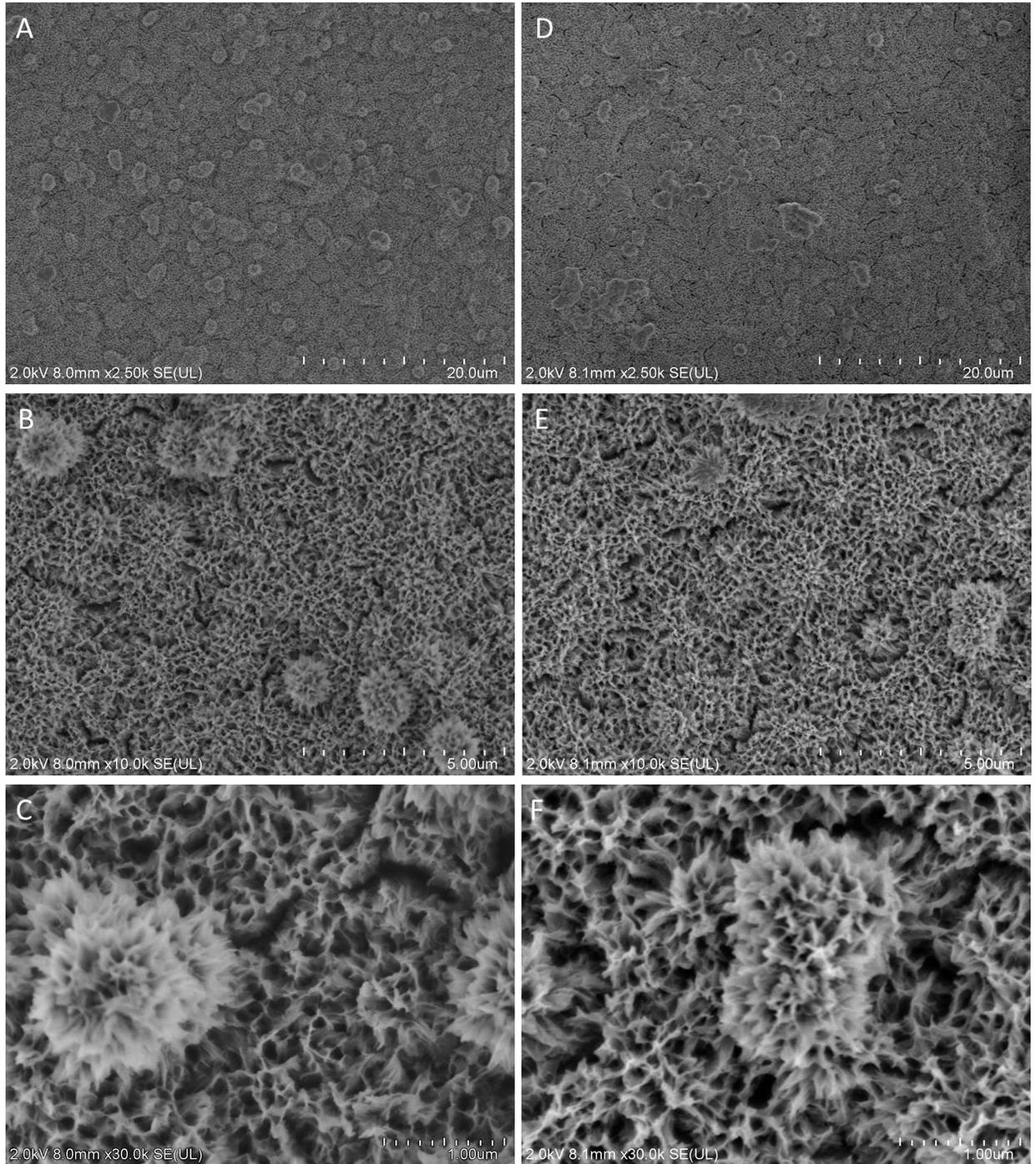


Figura 26. Imágenes FESEM de la superficie de las muestras luego de aplicada la Variante 2 de tratamiento. A, B, C: NaOH; D, E, F: TT (600 °C-1h). Se emplearon magnificaciones de 2500x, 10000x y 30000x respectivamente.

La superficie de titanato de sodio se caracteriza por ser una capa libre de grietas, uniforme y con forma de pluma que coincide con la reportada por *Rastegari* (68)

para un tratamiento similar (menor concentración de solución) . Además, exhiben elevada porosidad, y precipitados en formas globulares formando aglomerados.

➤ *Composición elemental*

En el análisis semicuantitativo de composición elemental realizado posterior al tratamiento en NaOH se detectaron las señales correspondientes a los picos principales del material base (Ti, Al y V). Además, el espectro (figura 27) exhibe señales pertenecientes a los elementos oxígeno y sodio indicativo de la posible formación de una capa de titanato de sodio. Esta capa ha sido reportada en la literatura como responsable de favorecer la formación de recubrimientos en fluidos biológicos.

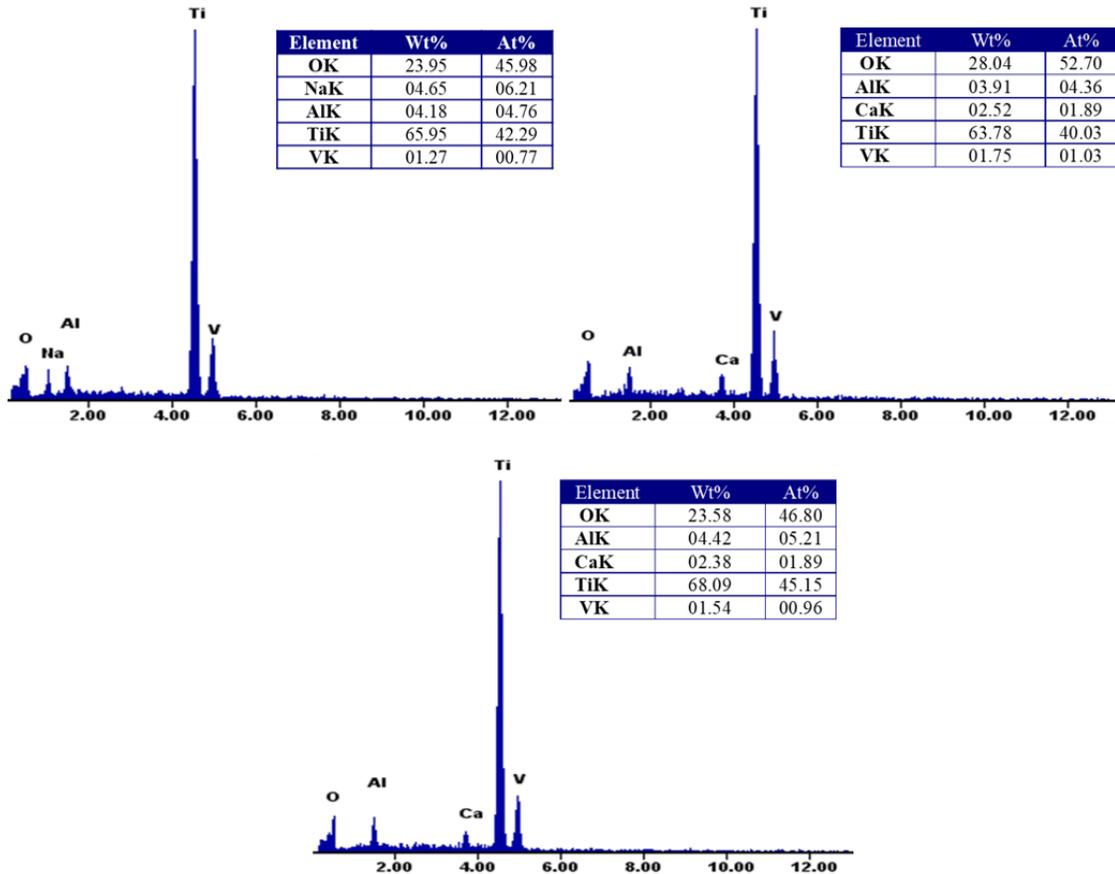


Figura 27. Espectros EDS de las muestras sometidas a los tratamientos de la Variante 2 de activación superficial. 1-NaOH, 2-NaOH-CaCl₂-TT, 3-NaOH-CaCl₂-TT-H₂O.

Con el tratamiento alcalino aproximadamente 6 at% de iones Na²⁺ se incorporó a la superficie. Para las probetas que fueron sometidas a tratamiento en disolución

de CaCl_2 , se evidenció una señal perteneciente al calcio y no se encontró la señal del sodio, resultado que confirma la sustitución iónica de iones Na^{2+} por iones Ca^{2+} en la capa de titanato de calcio presumiblemente obtenida. El tratamiento térmico aplicado posteriormente y el tratamiento en agua desionizada no modificaron los elementos presentes en la muestra. El número de iones Ca^{2+} no se modificó con el tratamiento térmico posterior, aunque disminuyó ligeramente con el tratamiento posterior con agua.

El análisis por XPS realizado en la superficie se muestra en la figura 28. Se pueden apreciar los picos asociados a los elementos Ti, O, C y Ca.

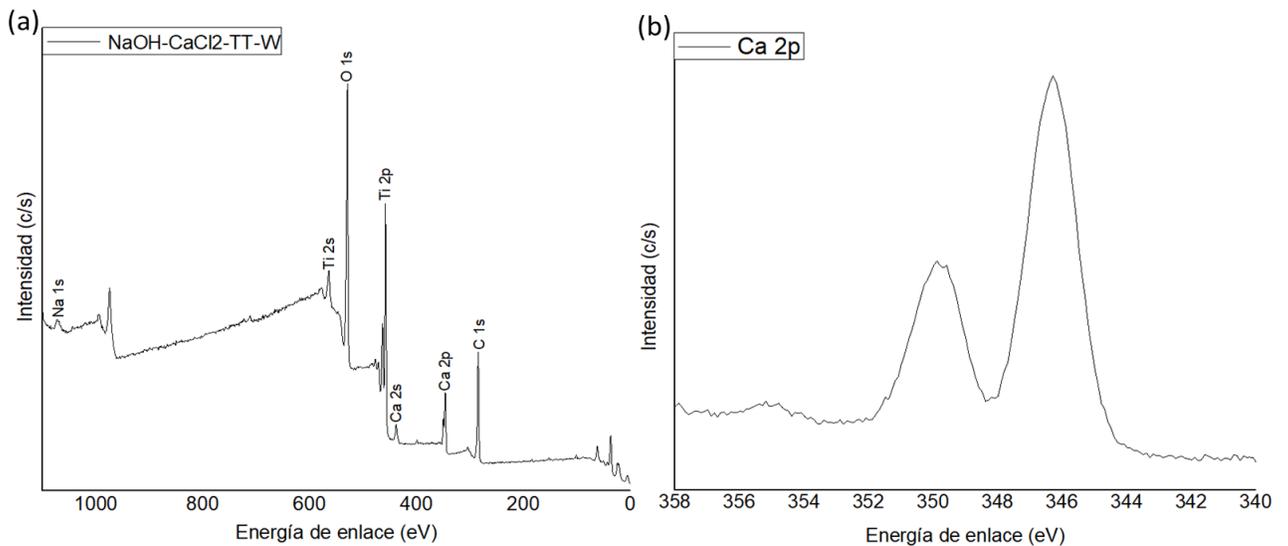


Figura 28. Espectro XPS completo (A) y espectro de alta resolución del Ca 2p (B) de la superficie de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ sometida a los tratamientos de la Variante 2.

➤ *Composición de fases*

Los patrones de difracción de cada superficie sometida a los tratamientos de la Variante de modificación 2 se presentan en la figura 29. Se realiza una comparación en relación al patrón obtenido posterior al tratamiento de grabado ácido.

Algunos autores han informado que después de sumergir en una solución alcalina, se forma una capa de gel de óxido de titanio con iones Na^{2+} en la superficie de Ti. El patrón XRD obtenido de esta superficie muestra las fases pertenecientes al titanio y picos de baja intensidad asociados al titanato de sodio e hidrógeno.

Posterior a la incorporación de calcio, se identificó un pico de baja intensidad asociado a la formación de titanato de calcio e hidrógeno.

Kokubo y cols. (12) reportan que el tratamiento térmico transformó el titanato de hidrógeno y calcio en un titanato de calcio de baja cristalinidad y rutilo, sin embargo nuestro resultado se contradice al no identificar ninguna fase asociada a esas estructuras en el patrón de XRD. El tratamiento posterior en agua no modificó las fases obtenidas.

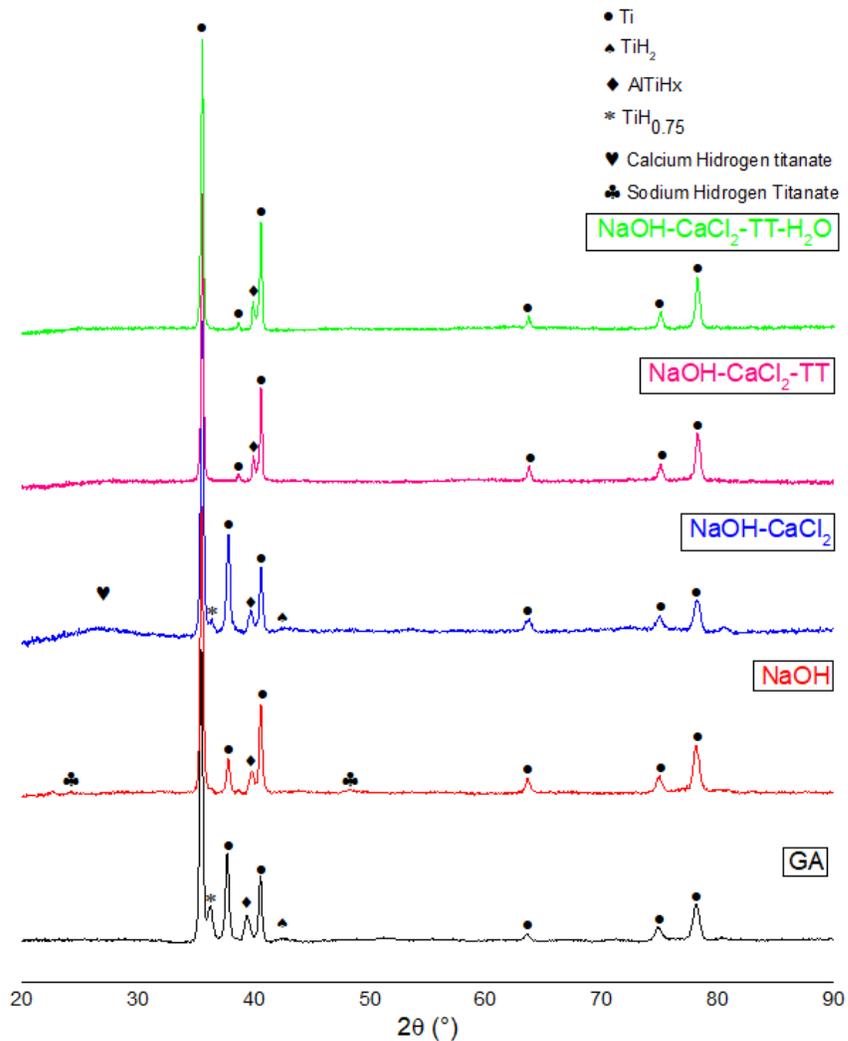


Figura 29. Patrones XRD de las superficies de las muestras de Ti6Al4V sometidos a diferentes tratamientos (Variante 2).

4.4. Efecto de la aplicación de los tratamientos de activación sobre la rugosidad superficial

Una de las variables que influyen significativamente en el buen comportamiento de un implante es su rugosidad superficial. Las irregularidades en su superficie producen una mejor fijación en el hueso que las superficies lisas. Se determinó el valor promedio de la rugosidad en las superficies de las muestras luego de la aplicación de los tratamientos. Los valores obtenidos para los tres parámetros de altura superficial evaluados se presentan en la tabla 3.

TABLA III
PARÁMETROS MEDIOS DE RUGOSIDAD Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Tratamiento	R _a (μm) \pm DE	R _z (μm) \pm DE	R _{máx} (μm) \pm DE
Desbaste	0.54 \pm 0.09	3.28 \pm 0.53	3.94 \pm 0.49
Grabado Ácido	0.29 \pm 0.03	1.60 \pm 0.17	1.90 \pm 0.19
Variante 1	0.33 \pm 0.02	2.10 \pm 0.32	2.72 \pm 0.68
Variante 2	0.37 \pm 0.03	2.24 \pm 0.29	2.85 \pm 0.68

En todos los casos los valores de R_a obtenidos fueron menores en comparación con el desbaste. El tratamiento en H₂SO₄/HCl presentó los menores valores de R_a y R_z con relación a las variantes de activación aplicadas sucesivamente. La rugosidad de la superficie para tratamientos de grabados ácidos ha sido reportada en el rango de 0.1 μm a varias micras (77).

En la figura 30 se presenta el efecto de los tratamientos de modificación estudiados sobre la rugosidad. Se comparan los valores obtenidos posterior al desbaste con los valores alcanzados tras la aplicación del grabado ácido y de las variantes 1 y 2 de activación.

De las variantes aplicadas los mejores resultados de rugosidad se evidenciaron en las superficies tratadas con NaOH-CaCl₂-TT-H₂O.

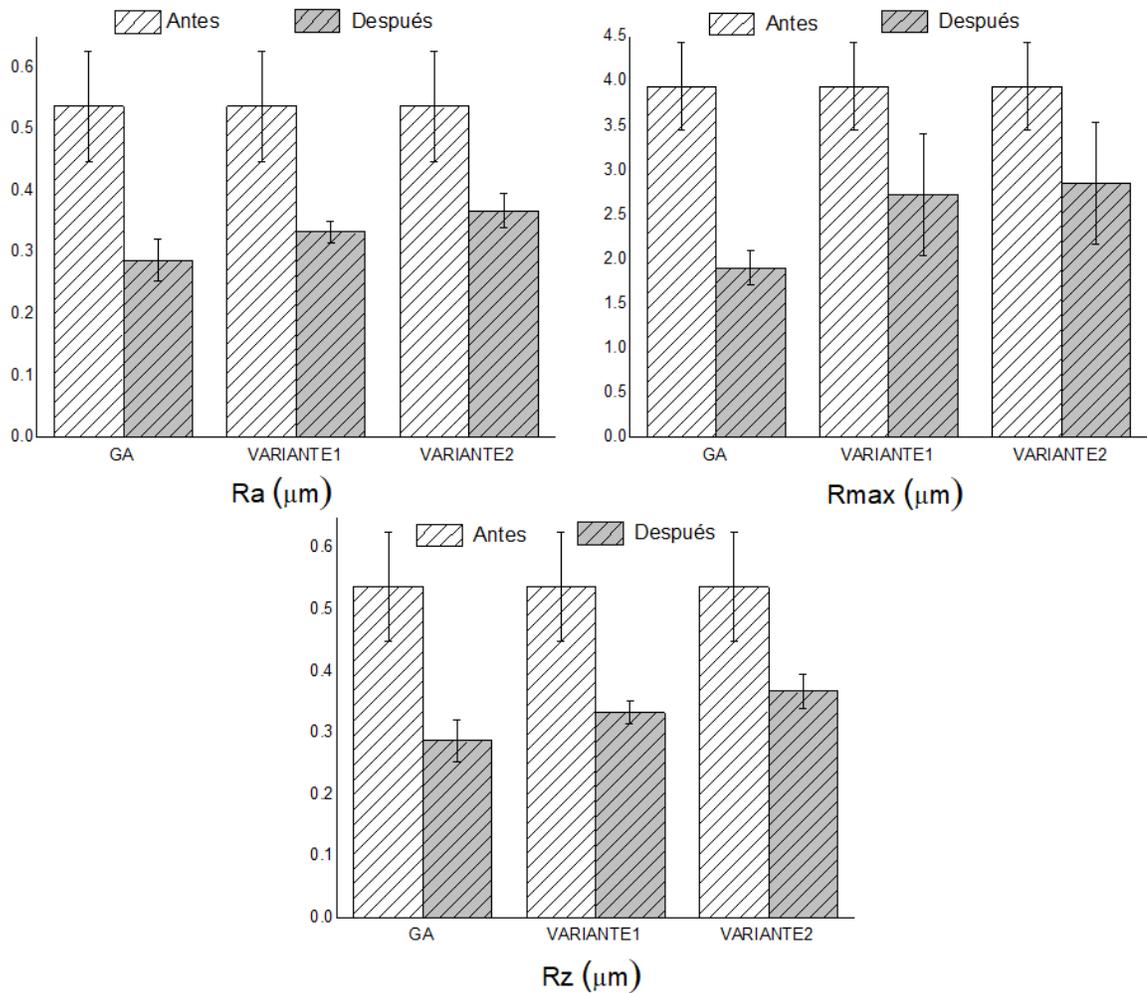


Figura 30. Efecto de los tratamientos aplicados sobre la rugosidad superficial.

4.5. Efecto de los tratamientos aplicados sobre la composición elemental

El gráfico de la figura 31 exhibe la influencia de los tratamientos de activación aplicados sobre la composición elemental de las superficies obtenidas. Se determinó que la Variante 2 de tratamiento (NaOH-CaCl₂-TT-W) fue la que mayor porcentaje de calcio aportó a la superficie del sustrato.

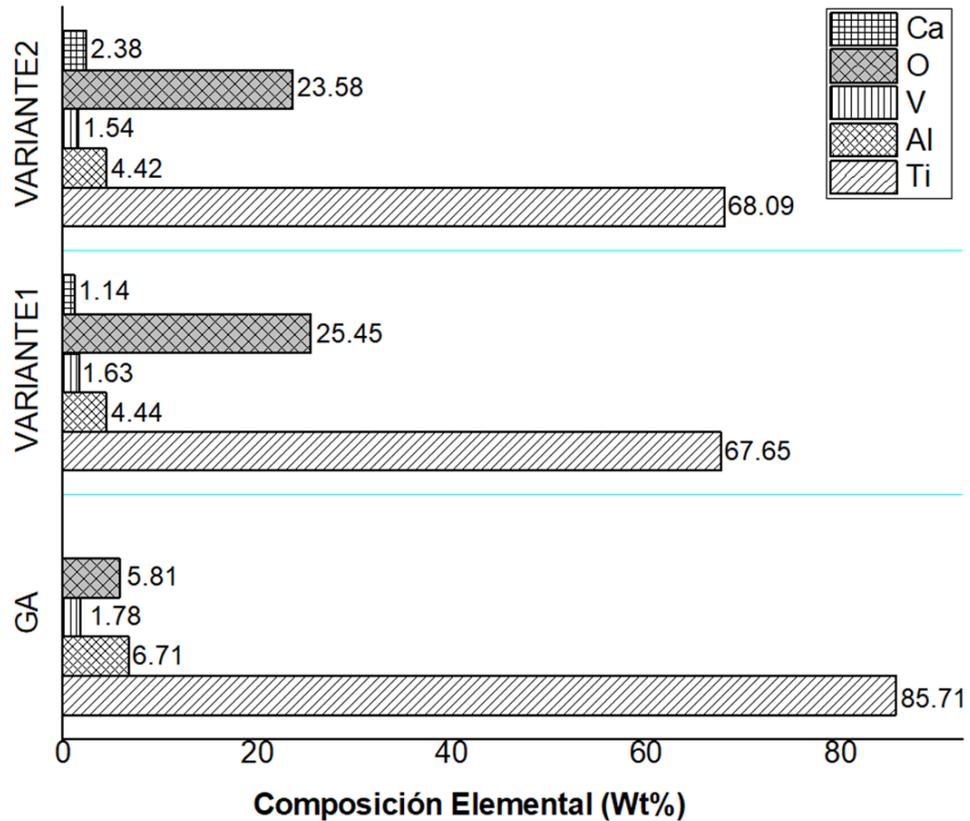


Figura 31. Influencia de los tratamientos de activación aplicados sobre la composición elemental de la superficie del TiAl4V.

4.6. Caracterización de los precipitados obtenidos en la disolución

➤ *Morfología*

La figura 32 muestra la morfología de los polvos obtenidos posterior a los procesos realizados para la obtención de los recubrimientos. Las partículas de polvo de apatita pura se caracterizaron por presentar geometrías irregulares y bordes afilados (A y B). Varios autores han reportado que las partículas precipitadas a temperatura ambiente (alrededor de 30 °C) tienen una morfología similar a varillas o agujas.

El polvo de Zn-CaP (C y D) obtenido en la SCS con mayor relación Ca/Zn presentó partículas esféricas al igual que el polvo obtenido de la disolución con mayor concentración de zinc (E y F). Las nanopartículas se encontraban agrupadas formando aglomerados.

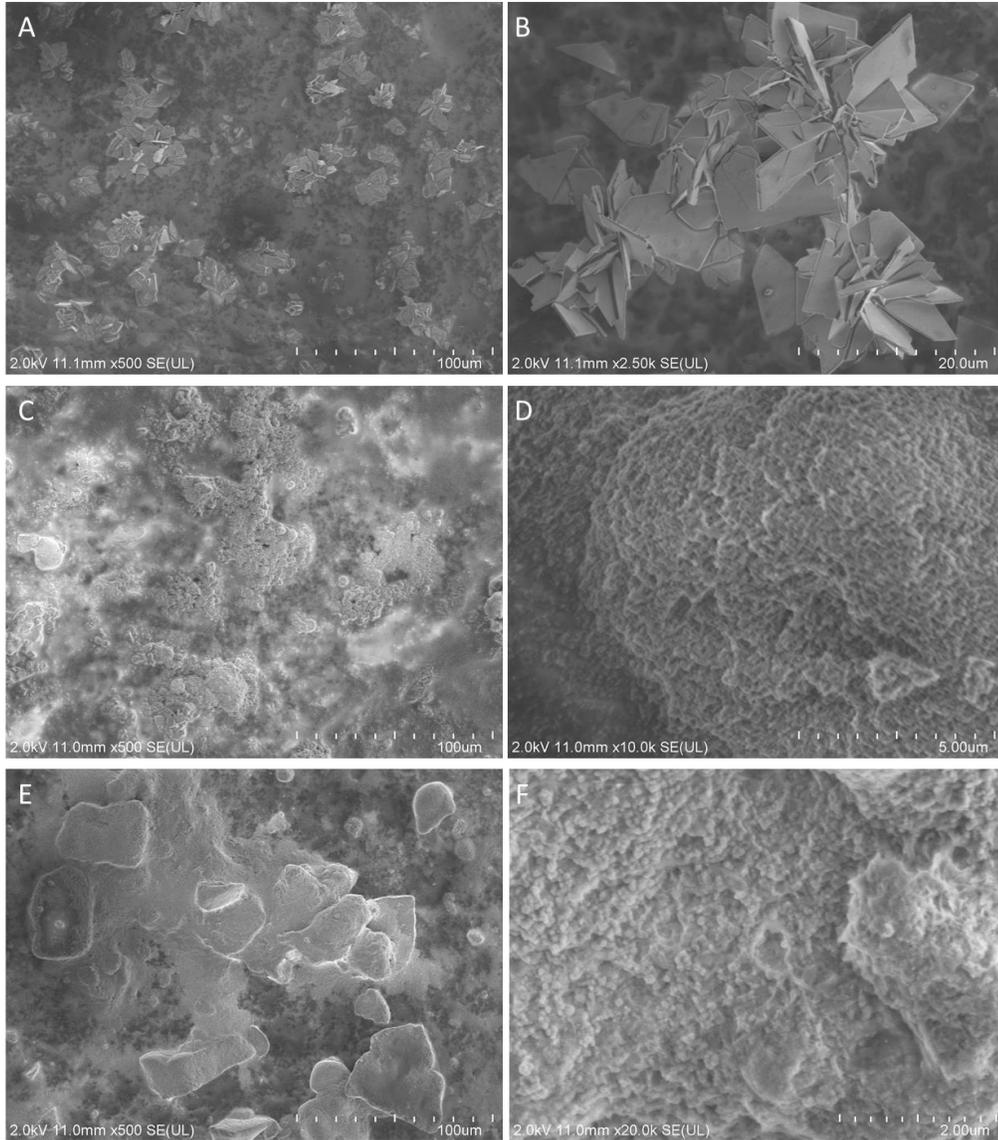


Figura 32. Imágenes FESEM de los polvos de los precipitados obtenidos en las SCS. A, B) VD1-Zn0; C, D) VD2-Zn1 y E, F) VD3-Zn2.

4.7. Caracterización morfológica de los recubrimientos obtenidos

Las probetas de Ti6Al4V activadas superficialmente mediante los tratamientos previos fueron sometidos a tratamientos de 4 horas en disoluciones con alto contenido de iones calcio, fosfato y zinc con el objetivo de obtener los recubrimientos de fosfatos de calcio sobre el sustrato.

Se trabajaron tres variantes de disoluciones, las cuales identificaremos como: variante de depósito 1 sin inclusión de zinc (VD1-Zn0), variante de depósito 2 con menor concentración de zinc (VD2-Zn1) y variante de depósito 3 con mayor

concentración de zinc (VD3-Zn2). Los cambios observados macroscópicamente en la superficie de las probetas se muestran en la figura 33.

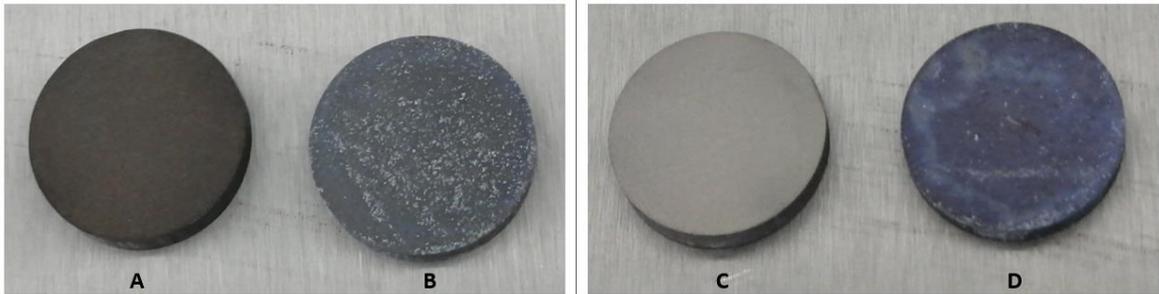


Figura 33. Cambios en la superficie de las probetas posterior al tratamiento para la obtención de recubrimientos. Antes y después del tratamiento de deposición y tratamiento térmico: A y B: variante 1 previa; C y D: variante 2 previa.

4.7.1. Recubrimientos obtenidos en VD1-Zn0

En la figura 34 se presentan las micrografías obtenidas de la superficie de las muestras recubiertas utilizando la VD1-Zn0. Las imágenes A, B, C y D se corresponden con la superficie de las muestras sometidas a la variante 1 de tratamiento previo y las imágenes E y F con la superficie previa posterior a la aplicación de la variante 2.

En general, en ambas superficies destaca principalmente la formación de partículas esféricas como ramilletes, las cuales se encuentran formando aglomerados distribuidos en toda la superficie. Se hizo notar además para las dos variantes previas estudiadas, la presencia de estructuras de mayor tamaño en formas laminares sobre las cuales crecen los ramilletes. La morfología de dichas estructuras es similar a la morfología de los polvos de fosfato de calcio obtenidos posterior al proceso de deposición (figura 32 A, B).

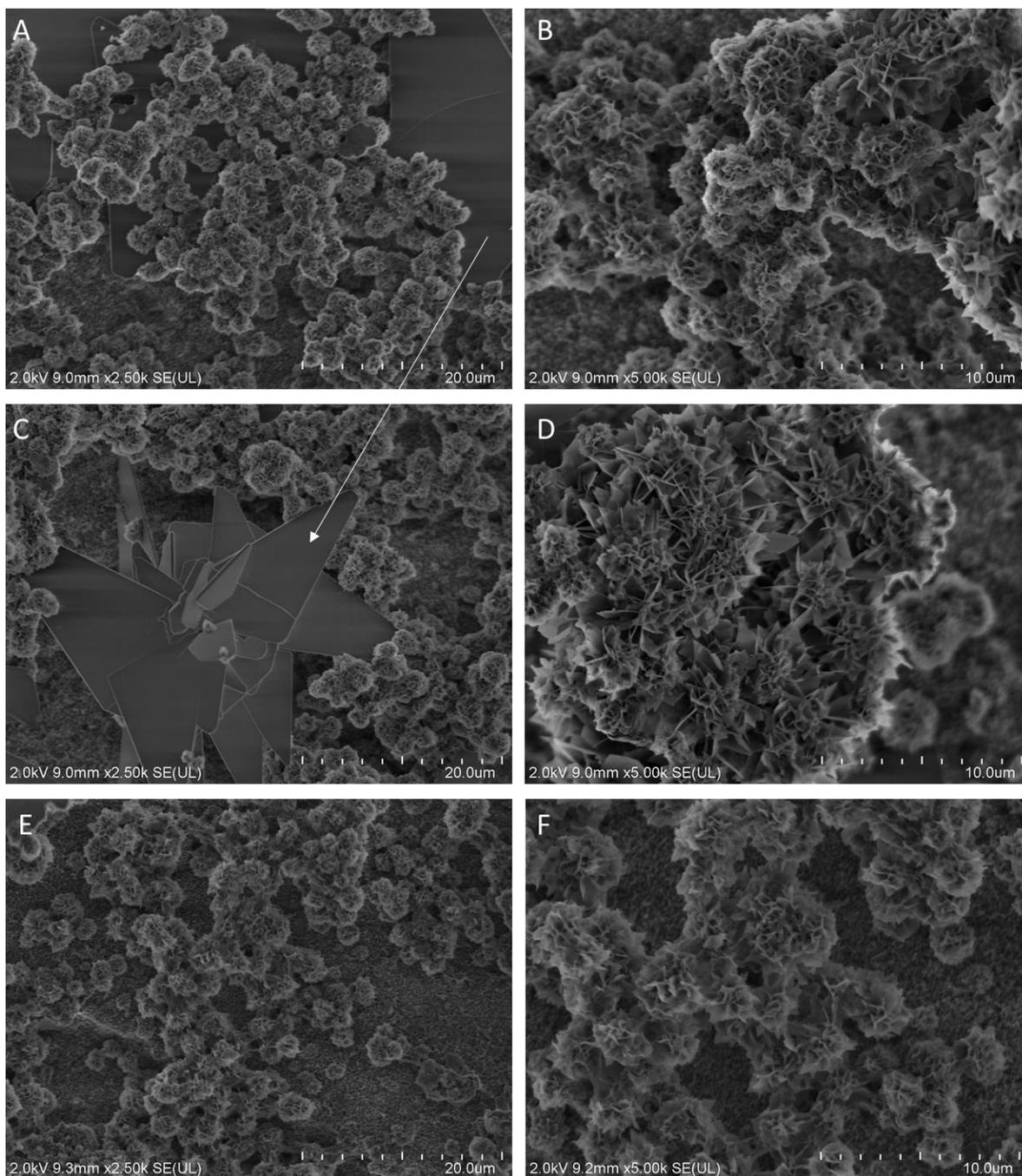


Figura 34. Imágenes FESEM de los recubrimientos obtenidos empleando la primera variante de depósito sin inclusión de zinc. A, B, C y D: Superficie previa ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}+\text{TT}+\text{CaCl}_2$); E y F: Superficie previa ($\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W}$). Se emplearon magnificaciones de 2500x y 5000x.

Las superficies recubiertas con tratamientos térmicos pos-deposición también fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35.

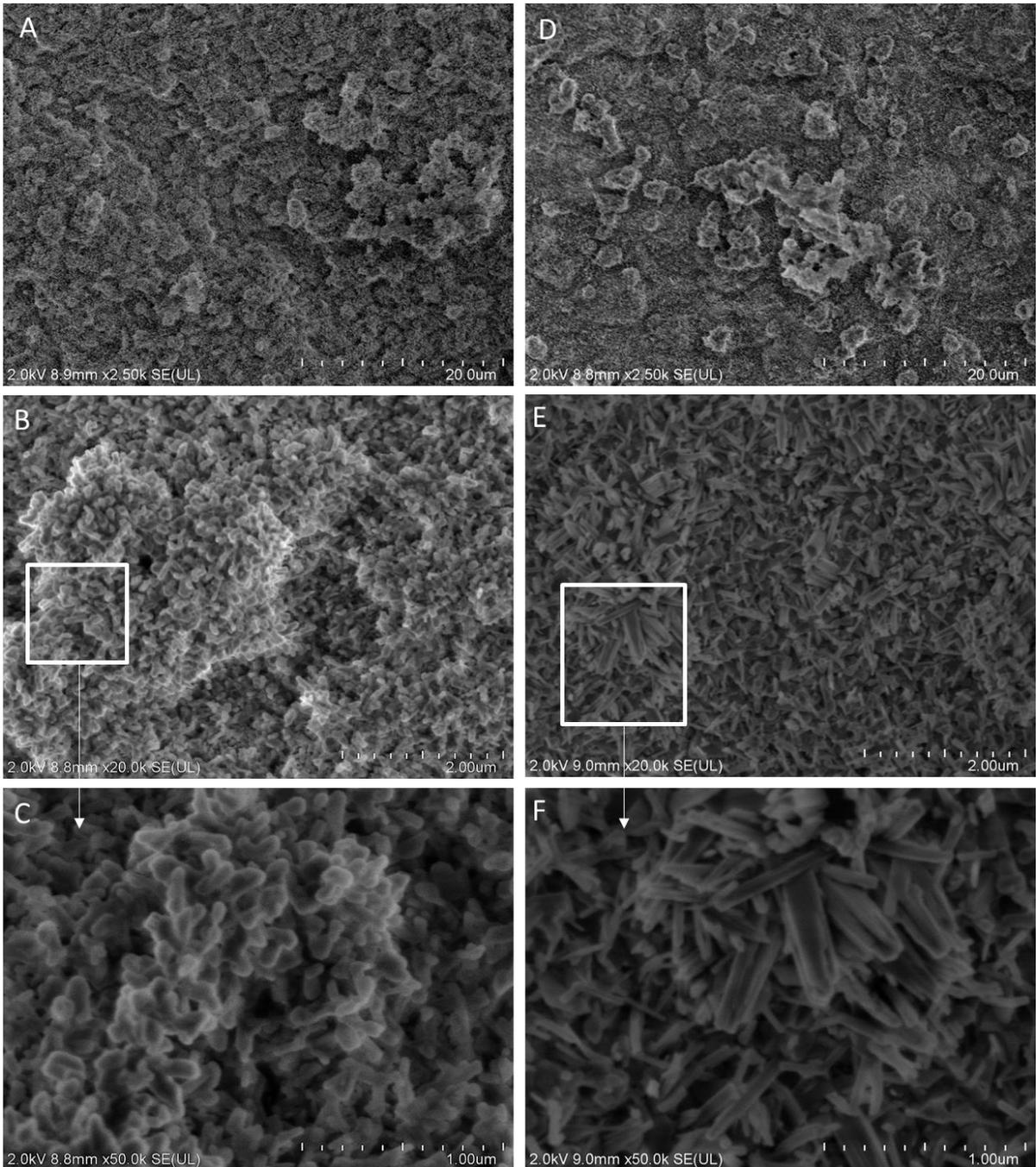


Figura 35. Imágenes FESEM de los recubrimientos obtenidos empleando la primera variante de depósito sin inclusión de zinc y tratamiento térmico pos-deposición. A, B y C: $(\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}+\text{TT}+\text{CaCl}_2)$; D, E y F: $(\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W})$. Se emplearon magnificaciones de 2500x, 20000x y 50000x respectivamente.

Al comparar con las micrografías de los depósitos de la figura 34, se puede observar que el tratamiento aplicado generó una densificación de la capa de apatita obtenida.

Las micrografías A, B y C corresponden a la superficie previa tratada con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}+\text{TT}+\text{CaCl}_2$ y las D, E y F pertenecen a la tratada con $\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W}$. Para ambas variantes previas estudiadas las superficies se encontraron recubiertas homogéneamente. A mayores magnificaciones se observa la formación de cristales orientados en diferentes direcciones en formas de barras para la variante previa 2 y aglomerados con morfologías más redondeadas simulando bastones para la variante 1. No se observa agrietamiento de la capa.

4.7.2. Recubrimientos obtenidos en VD2-Zn1

Las muestras recubiertas mediante la VD2-Zn1 se caracterizaron morfológicamente y los resultados obtenidos se muestran en la figura 36. Las imágenes A, B y C corresponden a las superficies de las muestras previamente tratadas con la variante 1 de tratamiento y las imágenes D, E y F pertenecen a la variante 2. Ambas superficies se recubrieron homogéneamente, destacando la presencia de aglomerados. La morfología del depósito obtenido presenta variaciones en comparación con los depósitos analizados en las superficies anteriores que no contenían iones Zn^{2+} . Se observa una capa estructurada por láminas de pequeñas dimensiones con precipitados que tienden a presentar formas esferoidales.

Fueron analizadas también las superficies posteriores al tratamiento térmico pos-deposición. En las imágenes de la figura 37 se observa similar a la variante de depósito 1 una capa de recubrimiento más densa y porosa extendida a lo largo de toda la superficie.

Ambas superficies contienen principalmente partículas esféricas. Estas partículas consisten en grandes cantidades de partículas de tamaño nano agrupadas. Este resultado puede deberse al hecho de que las partículas de tamaño nanométrico se aglomeran firmemente a agregados porosos micrométricos de varios tamaños durante la síntesis biomimética como reportan *Turk y cols.* (78).

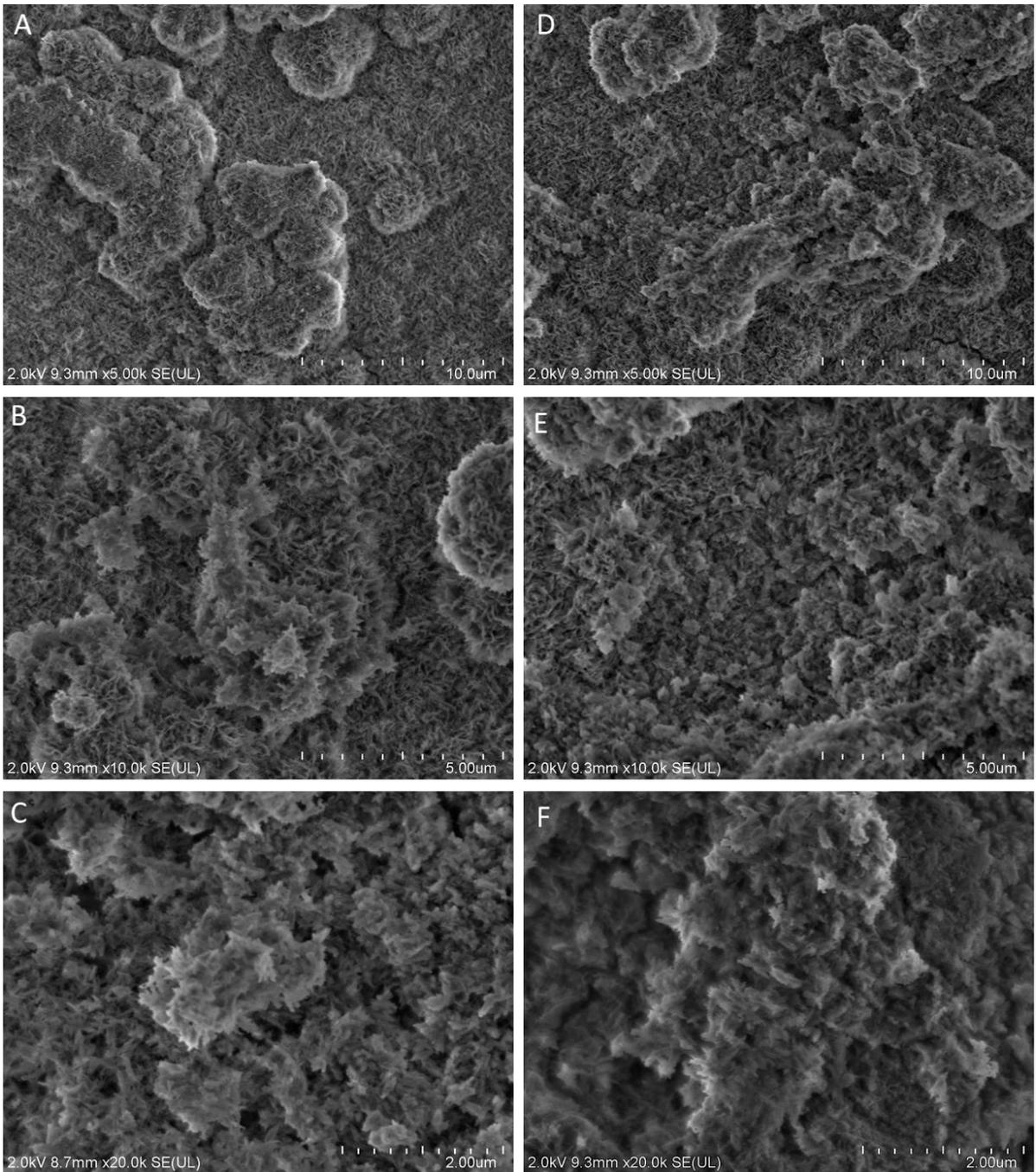


Figura 36. Imágenes FESEM de los recubrimientos obtenidos empleando la segunda variante de depósito con menor concentración de zinc. A, B y C: Superficie previa ($H_2O_2/HCl+TT+CaCl_2$); D, E y F: Superficie previa ($NaOH+CaCl_2+TT+W$). Se emplearon magnificaciones de 5000x, 10000x y 20000x respectivamente.

A mayores magnificaciones se puede apreciar la formación de "cuellos" entre partículas más pequeñas como resultado del proceso de tratamiento térmico

realizado como ha sido reportado por *Ramesh y cols.* cuando sintetizaron polvos HA por diferentes métodos (79).

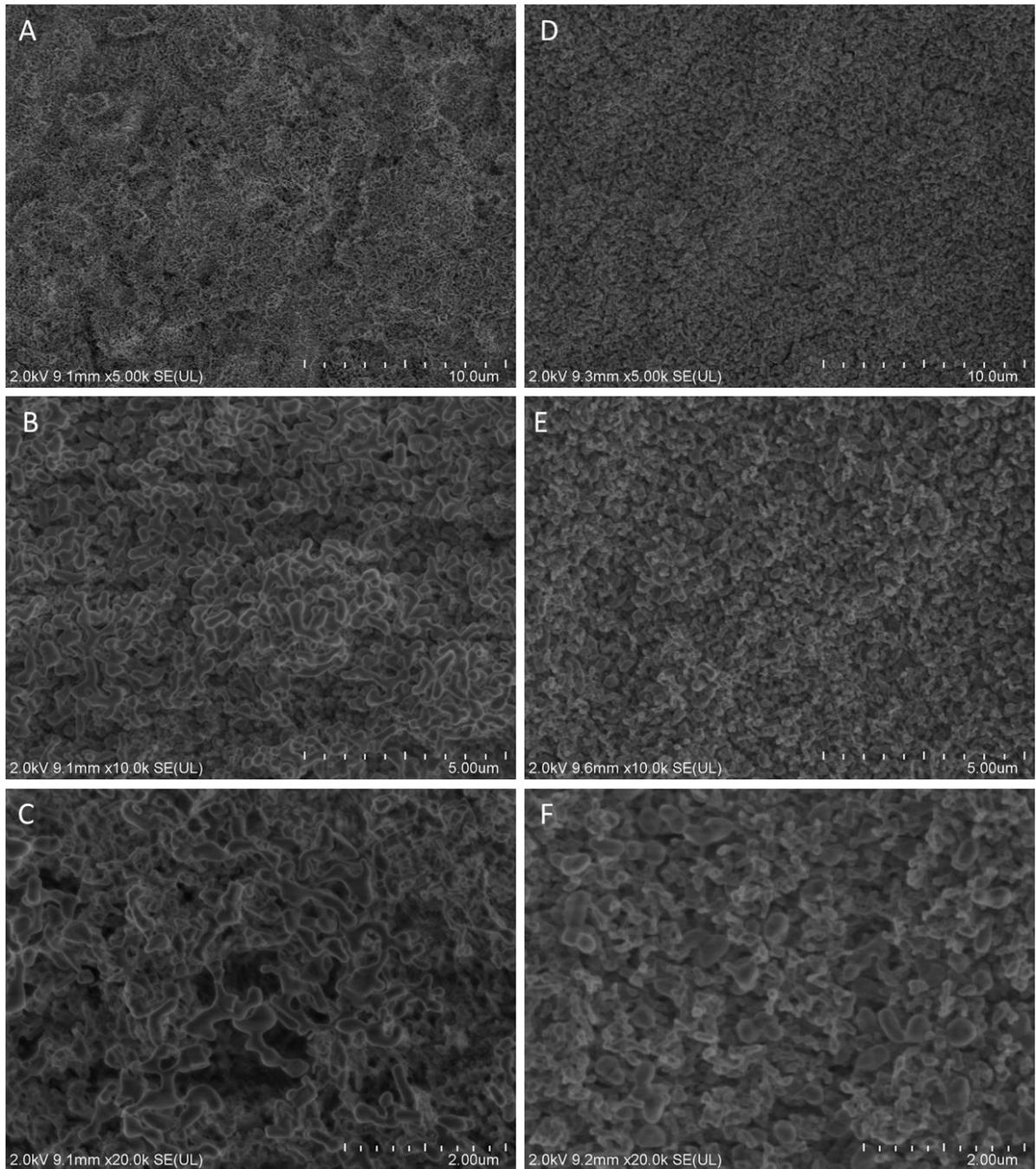


Figura 37. Imágenes FESEM de los recubrimientos obtenidos empleando la segunda variante de depósito con menor concentración de zinc y tratamiento térmico pos-deposición. A, B y C: ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}+\text{TT}+\text{CaCl}_2$); D, E y F: ($\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W}$). Se emplearon magnificaciones de 5000x, 10000x y 20000x respectivamente.

4.7.3. Recubrimientos obtenidos en VD3-Zn2

Se encontró que posterior a la aplicación de la última variante de deposición que presentaba mayor concentración de zinc, las superficies de las probetas de Ti6Al4V modificadas no se recubrieron en su totalidad. En las micrográficas A y D presentadas en la figura 38, se puede observar la morfología de la superficie previa (Variante 1 y Variante 2 respectivamente) en determinadas zonas de la cara de las probetas. Este resultado nos indica que, el aumento en la concentración de iones Zn^{2+} en la solución sobresaturada en calcio y fosfato durante el proceso de deposición realizado, restringió la nucleación y el crecimiento de la capa de apatita. Este hallazgo se puede relacionar con la menor afinidad de Zn con O en comparación con Ca, debido a la menor diferencia de electronegatividad de Zn, que mejoró la barrera de energía para la nucleación y el crecimiento.

A mayores magnificaciones (B, C, E y F) se observa la morfología de la capa obtenida para las dos variantes previas. Se obtiene un arreglo no uniforme de partículas con geometrías esféricas sin ángulos de cara afilados y tamaños nanométricos, y se evidencia la tendencia a formar aglomerados. La tendencia a la aglomeración al aumentar la concentración de Zn^{2+} había sido reportado anteriormente por *Ren y cols.* en 2009 cuando sintetizaron polvos de HA y Zn-HA con diferentes concentraciones por un método químico húmedo (80) y por *Popa y cols.* (81) en 2016 igualmente en forma de polvos.

No se observaron cambios morfológicos entre la variante 1 y la variante 2 previa, de manera que la modificación superficial aplicada no influyó en la morfología y tamaño de las partículas del recubrimiento. Sin embargo, se encontraron menos zonas sin recubrir en la superficie de la variante 2 que en la superficie de la variante 1.

Posterior al tratamiento térmico pos-deposición aplicado (figura 39) como se esperaba tuvo lugar la densificación del recubrimiento obtenido previamente. El aumento de la temperatura del tratamiento térmico favoreció el alargamiento de las partículas y el endurecimiento de la estructura. Las partículas se acercaron

entre sí y las formaciones del cuello se produjeron entre ellas tal como reporta *Yilmaz y cols. (82)*.

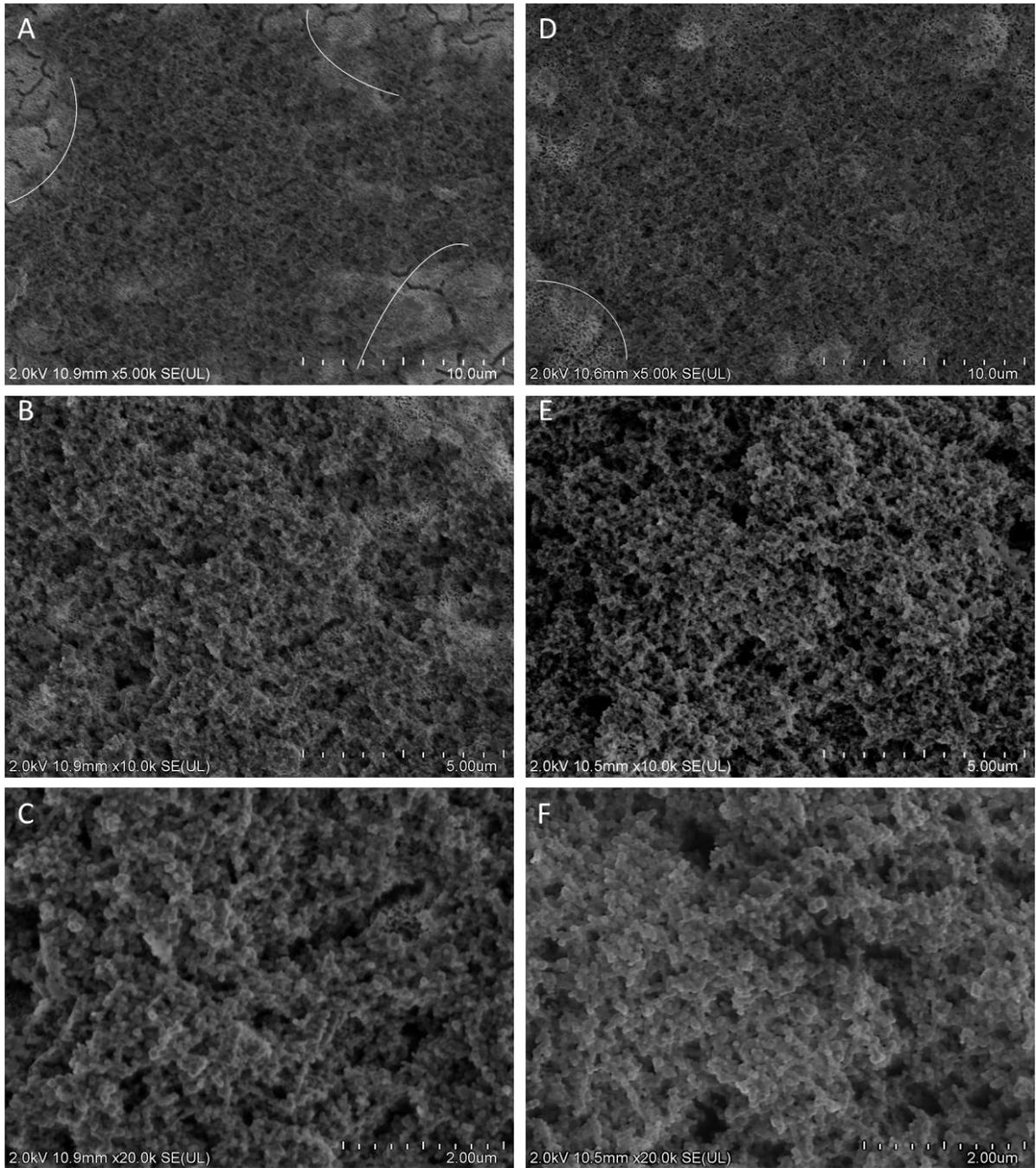


Figura 38. Imágenes FESEM de los recubrimientos obtenidos empleando la tercera variante de depósito con mayor concentración de zinc. A, B y C: ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}+\text{TT}+\text{CaCl}_2$); D, E y F: ($\text{NaOH}+\text{CaCl}_2+\text{TT}+\text{W}$). Se emplearon magnificaciones de 5000x ,10000x y 20000x respectivamente.

La inclusión de zinc aumento el tamaño de grano de la apatita coincidiendo con lo reportado por *Uysal y cols.* (83) en 2014 cuando obtuvo polvos de Zn-HA por el método de precipitación.

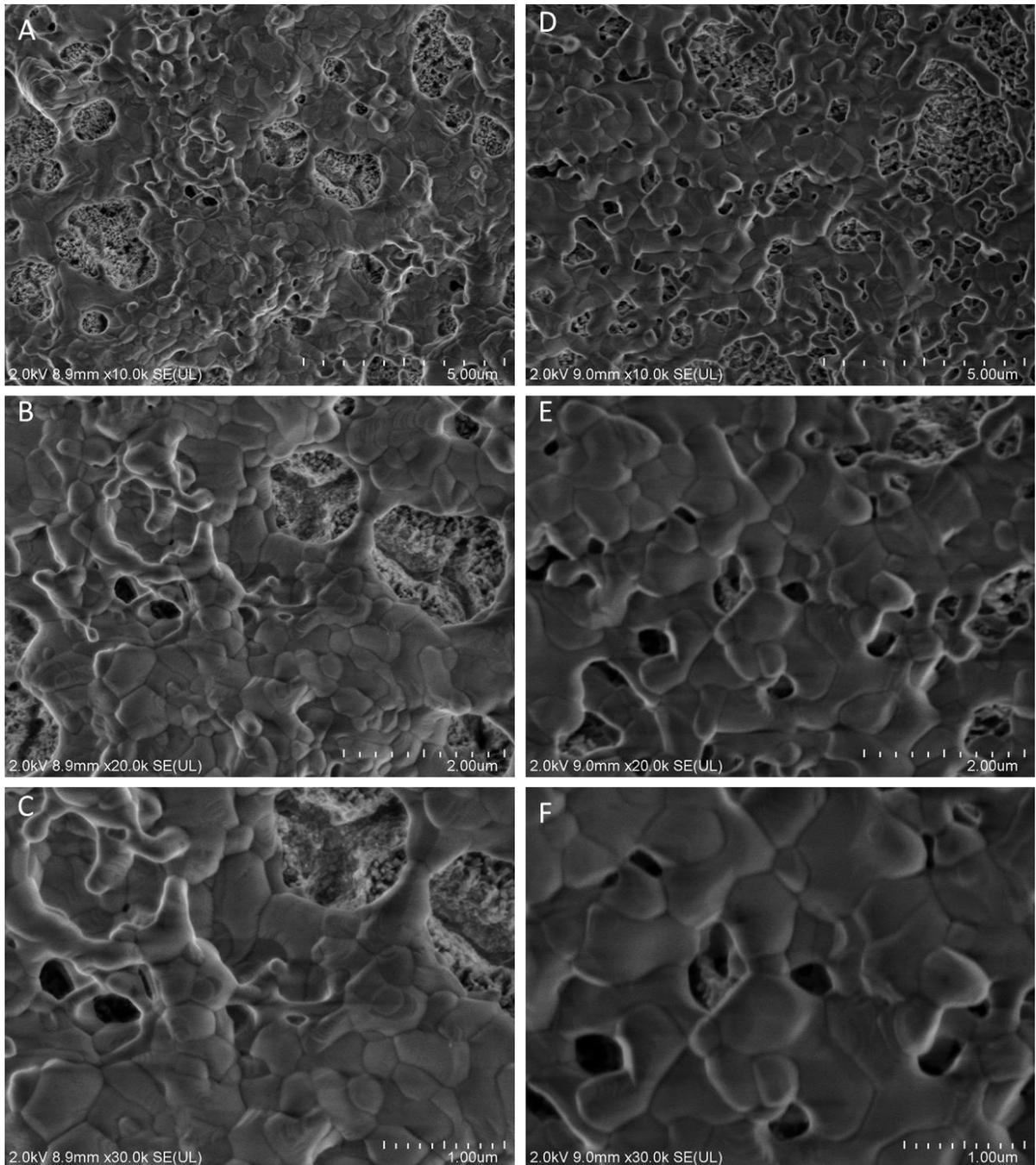


Figura 39. Imágenes FESEM de los recubrimientos obtenidos empleando la tercera variante de depósito con mayor concentración de zinc y tratamiento térmico pos-deposición. A, B y C: ($H_2O_2/HCl+TT+CaCl_2$); D, E y F: ($NaOH+CaCl_2+TT+W$). Se emplearon magnificaciones de 10000x, 20000x y 30000x respectivamente.

4.8. Composición elemental de los recubrimientos obtenidos

La composición elemental de las superficies recubiertas sin zinc para ambas variantes de tratamientos previos se estudió mediante espectrometría de energía dispersiva de rayos X. Los valores promedio en porcentaje atómico de cada elemento presente en las muestras se presentan en la tabla 4. En particular, la relación Ca/P fue de alrededor de 1.40 para la variante previa de tratamiento de activación en H₂O₂/HCl-TT-CaCl₂, siendo menor que las relaciones molares de Ca a P para la HA estequiométrica, es decir, 1.67. Mientras que se obtuvo una relación ligeramente mayor para el caso de la variante de tratamiento previo en NaOH-CaCl₂-TT-W.

TABLA IV
PORCENTAJE ATÓMICO DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS
SUPERFICIES RECUBIERTAS SIN INCLUSIÓN DE ZINC

Muestras	Elementos (At%)							Ca/P
	Ti	Al	O	C	Ca	P	Na	
HA pura (Variante 1)	37.6 1	4.03	37.23	2.40	10.40	7.38	0.91	1.40
HA pura (variante 2)	28.6 3	2.40	42.80	4.09	12.57	8.64	0.34	1.45

Se realizaron análisis puntuales con el objetivo de identificar la composición de las estructuras laminares obtenidas en las superficies (figura 32 C). En la figura 40 se muestra para ambas variantes de tratamientos previos (A variante 1, B variante 2) los espectros EDS obtenidos. Se detectaron además de los picos pertenecientes al material empleado como sustrato, picos correspondientes a los elementos Ca, P y O en concentraciones de 12.83, 8.19 y 40.97 % para la variante 1 previa y 17.52, 9.72 y 50.00 % para la variante 2 previa. También se identificó carbono. La presencia de este último elemento mencionado pudiera deberse a contaminación de la superficie o indicar la formación de hidroxiapatita carbonatada.

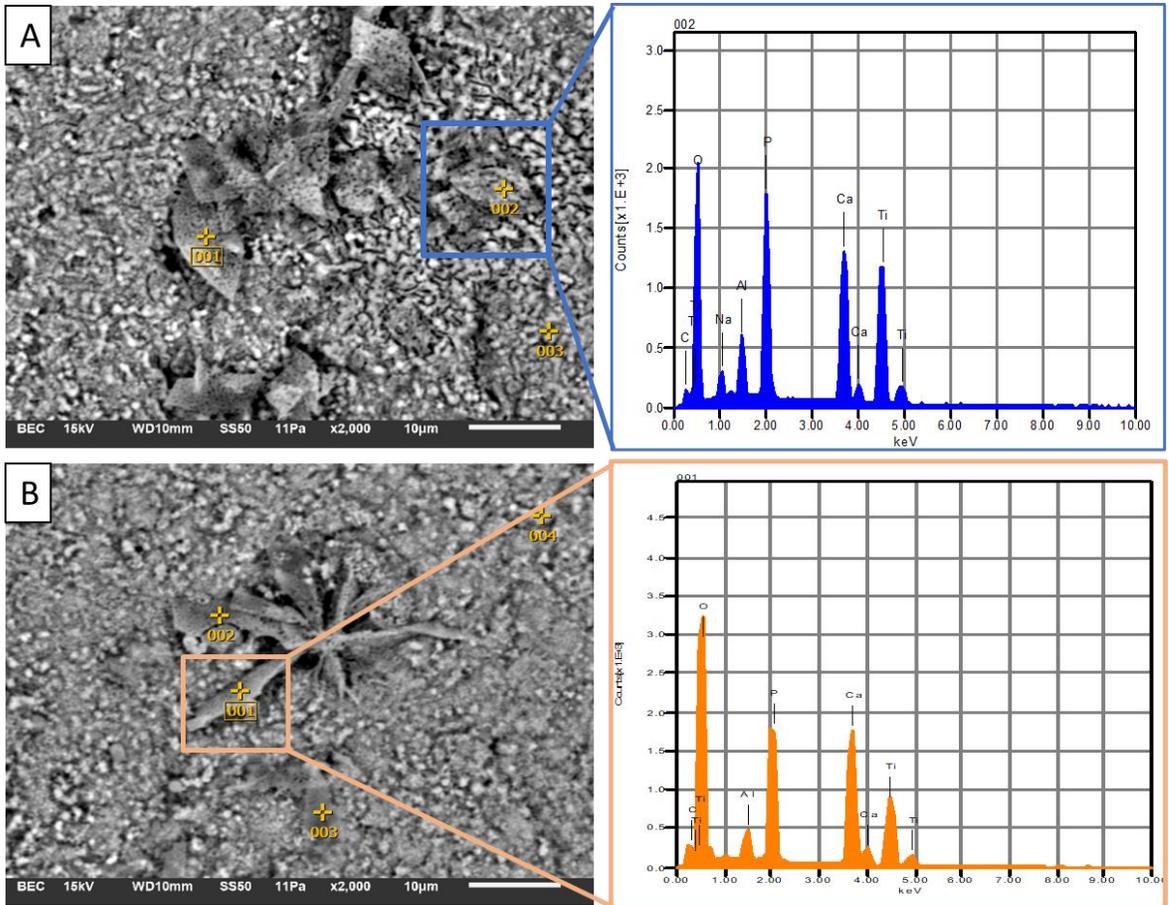


Figura 40. Imágenes SEM y espectros EDS (puntual) de la superficie de Ti6Al4V con recubrimiento de apatitas y tratamientos previos en: A) H₂O₂/HCl-TT-CaCl₂; B) NaOH-CaCl₂-TT-W.

Por otra parte, se analizaron los recubrimientos obtenidos en tratamientos de deposición con incorporación de zinc. En la figura 41 se presentan los espectros obtenidos para la variante previa 1 (A, B) y 2 (C, D) utilizando menor y mayor concentración de zinc respectivamente.

En todos los casos además de los picos característicos Ti, Al, O, Ca y P, también se detectaron picos característicos de Zn, lo que demuestra la incorporación exitosa de Zn en el recubrimiento. En la tabla 5 se presentan los valores obtenidos en cada variante de tratamiento aplicado. El mayor porcentaje de zinc obtenido en la capa de fosfato de calcio (figura 41D) se alcanzó para las muestras que fueron tratadas en SCS con mayor concentración de iones Zn²⁺ y con superficie previa NaOH-CaCl₂-TT-W.

El mapeo elemental realizado para dicha superficie en particular se muestra en la figura 42.

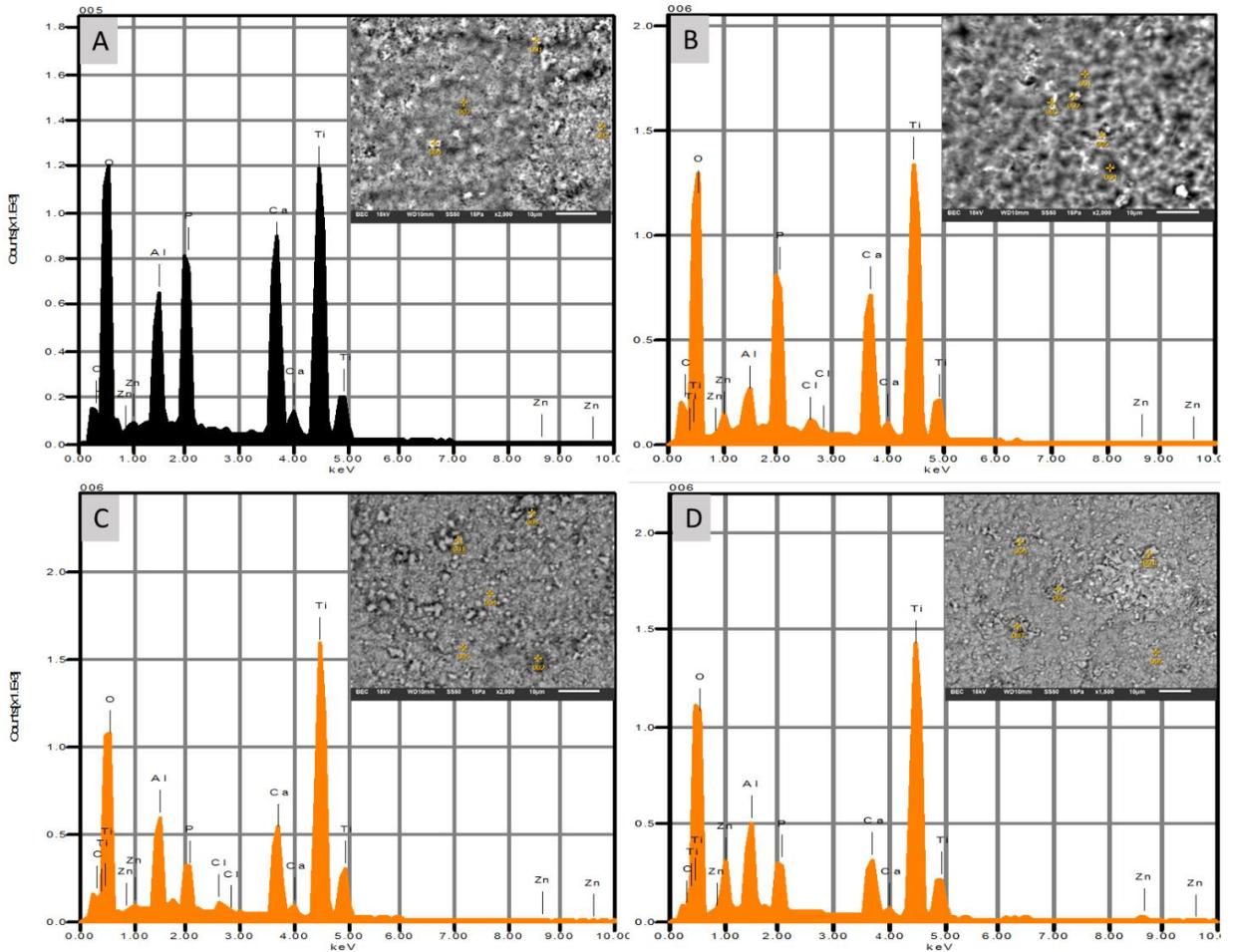


Figura 41. Imágenes SEM y espectros EDS de la superficie de Ti6Al4V con recubrimiento de apatitas con zinc: A) variante previa H_2O_2/HCl -TT- $CaCl_2$ y VD2-Zn1; B) variante previa H_2O_2/HCl -TT- $CaCl_2$ y VD3-Zn2; C) variante previa $NaOH$ - $CaCl_2$ -TT-W y VD2-Zn1; D) variante previa $NaOH$ - $CaCl_2$ -TT-W y VD3-Zn2.

TABLA V
PORCENTAJE ATÓMICO DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS SUPERFICIES RECUBIERTAS CON INCLUSIÓN DE ZINC

Muestras	Elementos (At%)							Ca/P
	Ti	Al	O	C	Ca	P	Zn	
V1.VD2-Zn1	26.08	2.61	39.15	5.27	17.28	9.21	1.21	1.87
V1.VD3-Zn2	36.43	1.26	37.71	5.40	10.52	6.73	1.35	1.56
V2.VD2-Zn1	27.30	2.44	38.70	3.10	18.51	9.59	1.29	1.93
V2.VD3-Zn2	23.90	3.53	60.82	4.22	3.52	2.14	1.87	1.65

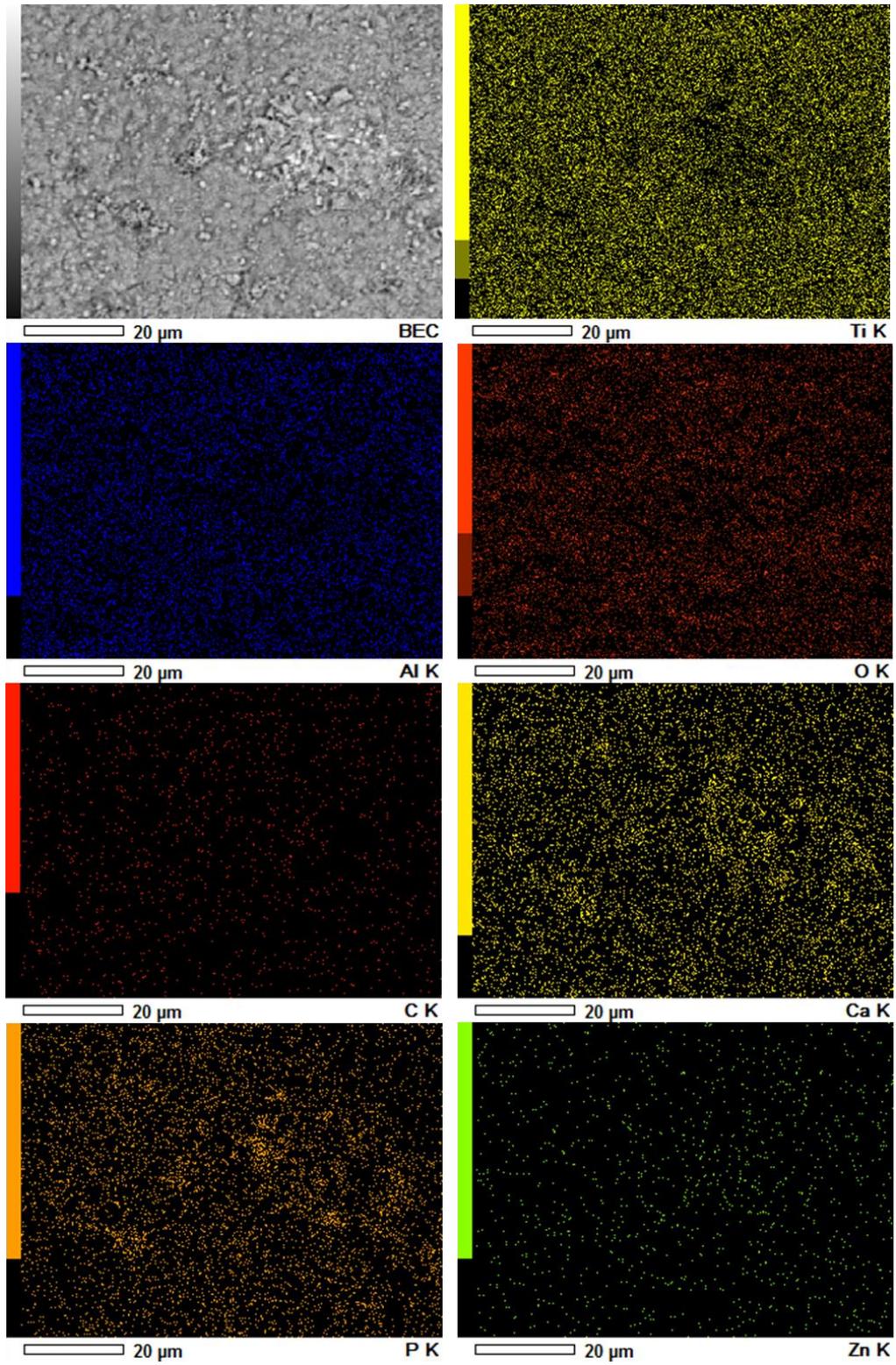


Figura 42. Imágenes del mapeo elemental de la superficie de Ti6Al4V recubierta a través de la VD3-Zn2.

La relación molar de las HA dopadas varía de 1,5 a 1,9 aproximadamente. Las relaciones atómicas Ca/P de las muestras de HA dopadas presentaron valores más altos que las relaciones obtenidas para las muestras sin zinc. Por otra parte, al comparar las relaciones atómicas Ca/P para las muestras obtenidas en las variantes de depósitos con inclusión de zinc, en ambos casos al aumentar la concentración de estos iones en la SCS hubo una disminución en la relación Ca/P de la variante VD3-Zn2 con respecto a la variante VD2-Zn1.

Para las muestras en las que se realizó la incorporación de zinc, los resultados del análisis por XPS confirmaron una vez más la presencia de zinc en los recubrimientos (figura 43). Todos los espectros obtenidos exhibieron señales características de calcio, oxígeno, fósforo y carbono. No hay picos asociados con otra contaminación elemental en los recubrimientos.

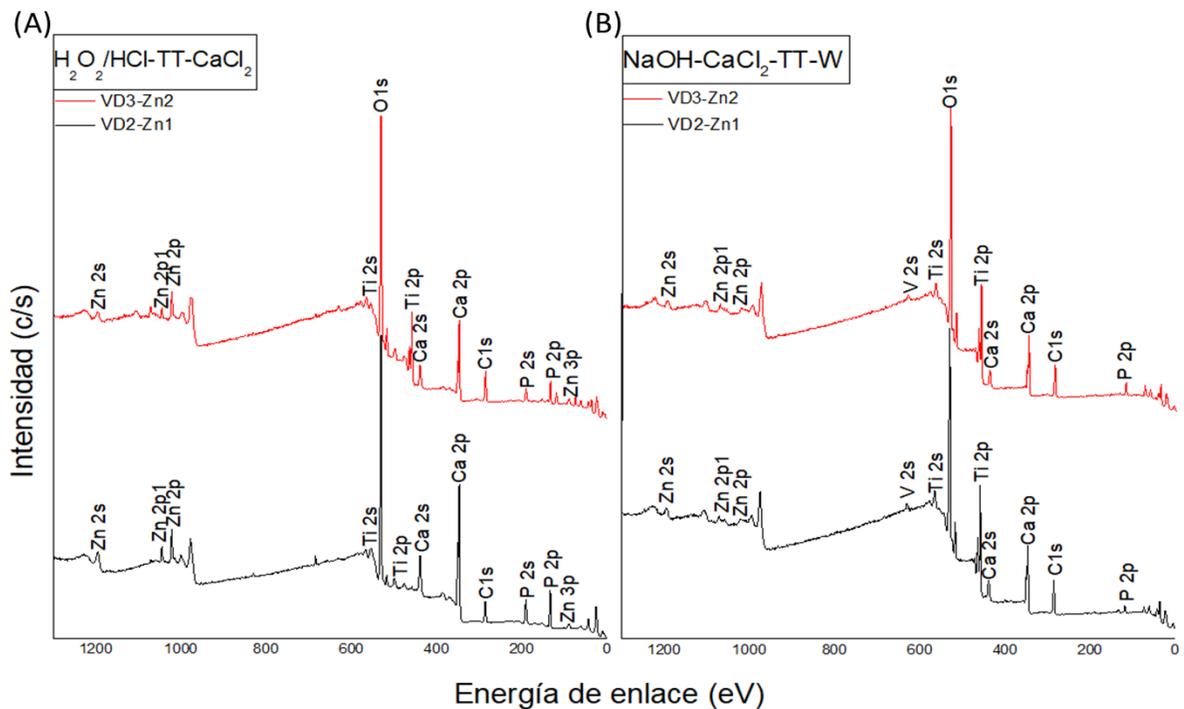


Figura 43. Análisis de energía XPS de las superficies de Ti6Al4V recubiertas con Zn-CaP.

El pico de O1s identificado con una señal centrada en 531.2 eV se asocia a enlaces O – P – O y OH en hidroxiapatita. La Figura 44 muestra los espectros de alta resolución XPS de P 2p, Ca 2p y Zn 2p y en la tabla 6 se proporcionan detalles sobre las energías de enlace de los elementos. Cabe señalar que se detectaron

pequeñas cantidades de sodio (Na) en los análisis de espectros XPS de los materiales de CaP sustituidos con Zn. El pico de Na1 se puede observar alrededor de 1071.0 eV para ambas muestras.

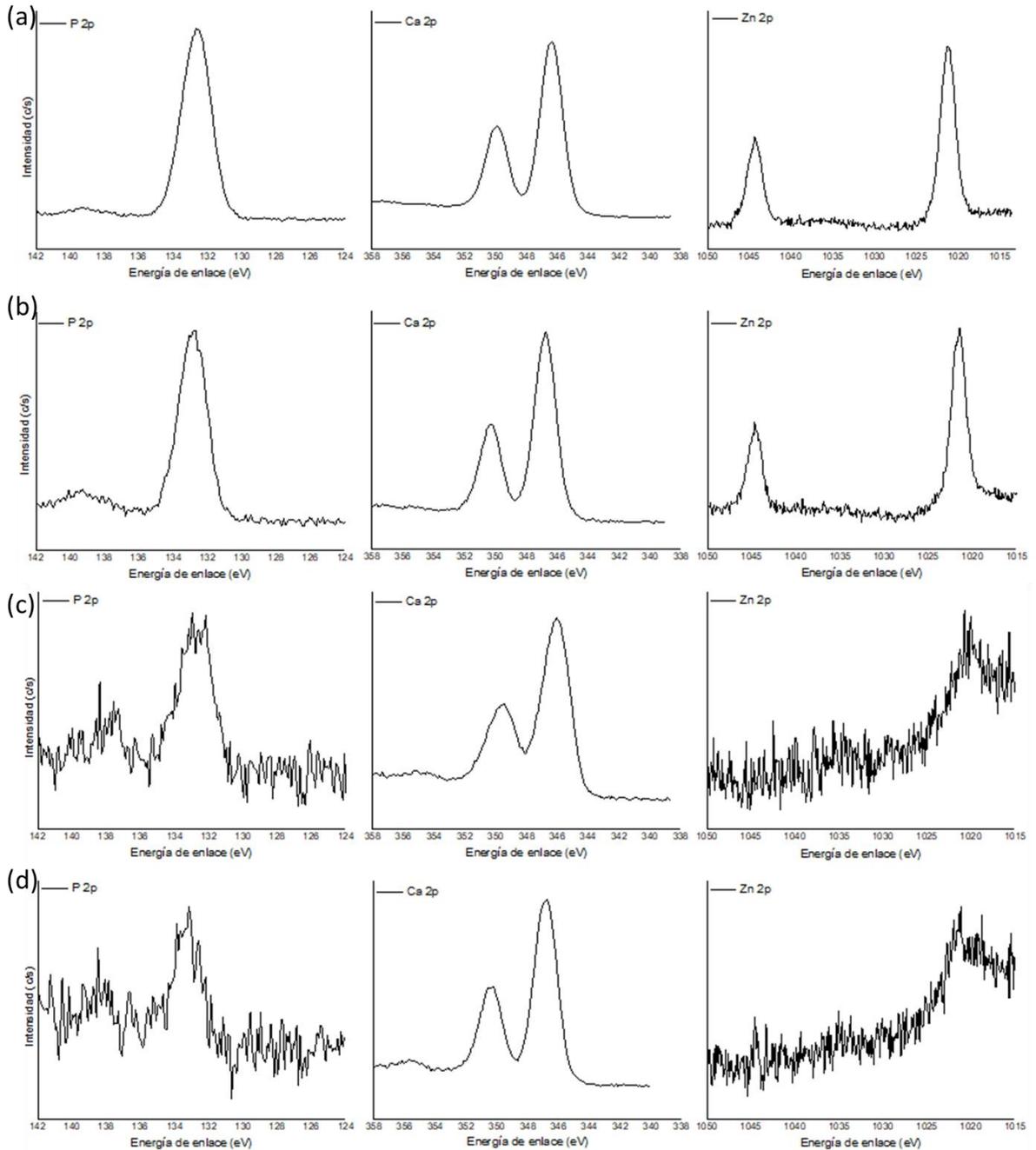


Figura 44. Escaneos XPS de alta resolución (P 2p, Ca 2p y Zn2p) para (a) V1.VD2-Zn1 (b) V1.VD3-Zn2, (c) V2.VD2-Zn1, (d) V2.VD3-Zn2.

Se puede afirmar que el análisis EDS y XPS confirma la incorporación exitosa de pequeñas cantidades de iones Zn^{2+} a través del método biomimético, sin embargo, estudios más profundos han de ser realizados para determinar si hubo intercambio iónico con los iones Ca^{2+} .

TABLA VI
POSICIONES MÁXIMAS DE XPS PARA RECUBRIMIENTOS DE CAP CON
INCORPORACIÓN DE ZINC OBTENIDOS SOBRE Ti6AL4V

Muestras	Posición de los picos-Energía de enlace (eV)					
	C1s	O1s	Ca2p	P2p	Zn2p	Zn2s
V1.VD2-Zn1	284.6	531.2	346.4	132.6	1022.0	1195.7
V1.VD3-Zn2	284.6	530.7	347.2	133.5	1021.9	1194.3
V2.VD2-Zn1	284.6	530.0	346.7	133.5	1020.7	1194.6
V2.VD3-Zn2	284.6	529.3	346.2	133.5	1021.3	1194.0

4.9. Composición de fases de los recubrimientos obtenidos

Los resultados que se describen a continuación provienen de muestras recubiertas con apatita pura y apatita con zinc incorporado tratadas térmicamente empleando la rampa de calentamiento descrita en el capítulo 3. Los patrones XRD de las superficies (figura 45) muestran que todos ellos consisten en hidroxiapatita pura de baja cristalinidad monofásica (sin fases secundarias) para ambas variantes de tratamientos previos estudiadas. Se desea un producto monofásico porque la pureza de fase afecta el comportamiento *in vivo* y la bioactividad de las biocerámicas.

Los picos presentes se definieron como picos de la referencia hexagonal de HA (número de tarjeta JCPDS: 09-432) con un grupo espacial de P 63/m, además se identificaron picos correspondientes al titanio y a rutilo (TiO_2). Después del intercambio iónico (Zn-CaP), no hay picos de difracción presentes en ningún espectro que no sean atribuibles a HA.

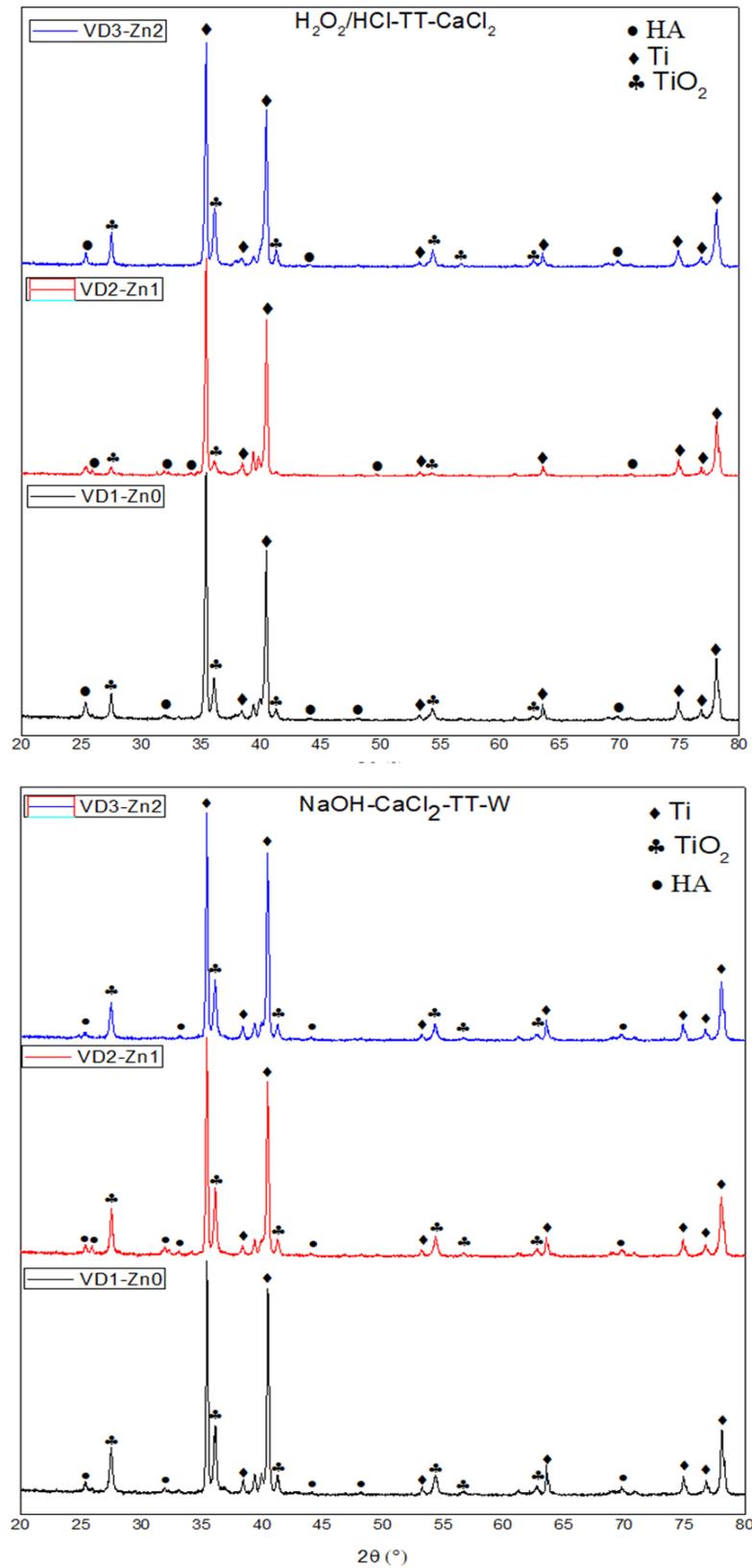


Figura 45. Patrones XRD de las muestras recubiertas con apatita y Zn-apatita y tratamiento térmico para las dos variantes de tratamientos de activación previos.

Los principales patrones de difracción para HA son valores 2θ aproximados de 25.9° , 31.7° y 32.9° . La presencia de picos de difracción de HA que muestran un ligero cambio en la posición de pico para Zn-HA en comparación con HA indica que los iones Zn^{2+} entraron en la red cristalina de HA. Este cambio se muestra para los picos (002) ubicados entre $2\theta = 25$ y 27° .

Se encontró que la posición del pico en los patrones de Zn-HA se había desplazado ligeramente a ángulos más altos en comparación con los patrones XRD de la HA pura. El Zn^{2+} tiene un radio iónico de 74 pm, que es más pequeño que el de los iones Ca^{2+} , es decir, 100 pm. Por lo tanto, la sustitución de Ca^{2+} por Zn^{2+} conduce a una contracción de los parámetros de red de la HA. El cambio de los picos XRD con respecto a la HA libre de Zn (JCPDS No. 09-0432) apoya la sustitución de Zn en los recubrimientos obtenidos. Además, los patrones XRD demostraron ligeros cambios en la intensidad de pico con la incorporación Zn^{2+} .

Estos resultados obtenidos son consistentes con los análisis EDS y XPS mostrados que confirman que los iones de Zn^{2+} se incorporaron en la estructura de HA. Por lo tanto, la adición de dopantes produce perturbaciones y trastornos en la red cristalina de HA.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Se logró modificar y activar la superficie del titanio mediante las variantes de tratamiento aplicadas. Los tratamientos de activación generaron cambios significativos en la morfología de las superficies, así como en su rugosidad superficial. Dentro de las variantes de activación superficial estudiadas, el tratamiento en NaOH-CaCl₂-TT-W fue el que mayor influencia mostró sobre la rugosidad superficial.
2. La variante de tratamiento previo aplicado en NaOH-CaCl₂-TT-W fue la que mayor contenido de calcio aportó a la superficie del Ti6Al4V, resultado que fue comprobado mediante espectroscopia por energía dispersiva de rayos X (EDS) y por espectrometría de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).
3. Se obtuvo empleando solución sobresaturada en calcio y fosfato (SCS) con inclusión de iones zinc recubrimientos de apatitas con zinc incorporado sobre la superficie de Ti6Al4V modificada mediante tratamientos de activación con iones calcio en un periodo de exposición de 4 horas. Los resultados del análisis por EDS y XPS confirmaron la incorporación de zinc en los recubrimientos.
4. Se demostró que al agregar iones dopantes a la solución sobresaturada de iones calcio y fosfato (SCS) la morfología de los recubrimientos presentó un cambio notable. Al aumentar la concentración de iones Zn²⁺ disminuye el tamaño de partícula y se obtiene un arreglo no uniforme de partículas con geometrías esféricas sin ángulos de cara afilados y tamaños nanométricos, y se evidencia la tendencia a formar aglomerados

5. Los recubrimientos obtenidos empleando la variante de depósito con menor relación Ca/Zn (VD3-Zn2) recubrieron la superficie del Ti6Al4V parcialmente, lo que sugiere que el aumento en la concentración de los iones Zn^{2+} restringe la nucleación y el crecimiento de la capa de apatita, por lo que se necesitarían tiempos de deposición mayores a 4 horas o ajustar las concentraciones de los restantes elementos constituyentes en la solución, en aras de obtener recubrimientos en toda la superficie.
6. Para las variantes de depósitos empleadas no se observaron cambios morfológicos entre la variante 1 (H_2O_2 -TT- $CaCl_2$) y la variante 2 previa ($NaOH$ - $CaCl_2$ -TT-W), de manera que la modificación superficial aplicada no influyó en la morfología y tamaño de las partículas del recubrimiento.
7. Los tratamientos térmicos aplicados pos-deposición densificaron la capa de apatita obtenida en todas las variantes empleadas. El aumento de la temperatura del tratamiento térmico favoreció el alargamiento de las partículas y el endurecimiento de la estructura. Las partículas se acercaron entre sí y las formaciones del cuello se produjeron entre ellas.
8. Los patrones XRD de las superficies recubiertas muestran que todos ellos consisten en hidroxiapatita pura de baja cristalinidad para ambas variantes de tratamientos previos estudiadas.
9. Se observó un ligero cambio en la posición de pico para los recubrimientos Zn-HA en comparación con los de HA pura en las dos variantes de depósito estudiadas, indicando que los iones Zn^{2+} entraron en la red cristalina de HA. Estos resultados obtenidos son consistentes con los análisis EDS y XPS mostrados que confirman la incorporación de zinc en la capa.

5.2 Recomendaciones

1. Realizar proceso de deposición variando las concentraciones de los reactivos en la disolución con alto contenido de calcio y fosfato o extendiendo el tiempo de exposición para obtener, empleando mayor

concentración de zinc, recubrimientos de Zn-HA homogéneos en toda la superficie del Ti6Al4V.

2. Realizar un estudio más profundo de los espectros de alta resolución obtenidos por XPS y análisis químico por FTIR.
3. Caracterizar la rugosidad superficial y mojabilidad de los recubrimientos obtenidos.
4. Evaluar in vitro los recubrimientos obtenidos para analizar su comportamiento biológico (propiedades antibacterianas, citotoxicidad y liberación de iones al medio).

REFERENCIAS

1. Aparicio C, Padrós A, Planell Estany JA, Gil F. Superficies de titanio en implantes dentales de carga inmediata. 2008.
2. Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, et al. Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. *Dental Materials Journal*. 2008;27(3):415-21.
3. Kirmanidou Y, Sidira M, Drosou M-E, Bennani V, Bakopoulou A, Tsouknidas A, et al. New Ti-alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: a review. *BioMed research international*. 2016;2016.
4. Queiroz TP, de Molon RS, Souza FA, Margonar R, Thomazini AH, Guastaldi AC, et al. In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clinical oral investigations*. 2017;21(2):685-99.
5. Zhang EW, Wang YB, Gao F, Wei SC, Zheng YF. Enhanced Bioactivity of Sandblasted and Acid-Etched Titanium Surfaces. *Advanced Materials Research*. 2009;79-82:393-6.
6. Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2011;32(13):3395-403.
7. Zhang EW, Wang YB, Shuai KG, Gao F, Bai YJ, Cheng Y, et al. In vitro and in vivo evaluation of SLA titanium surfaces with further alkali or hydrogen peroxide and heat treatment. *Biomedical materials*. 2011;6(2):025001.
8. Multigner M, Fernández-Castrillo P, Ferreira-Barragans S, González-Doncel G, González-Carrasco JL. Influencia del arenado de la aleación Ti6Al4V en la dureza subsuperficial y estado de tensiones residuales. *Revista de Metalurgia*. 2009;45(1):52-7.
9. Ferraris S, Bobbio A, Miola M, Spriano S. Micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium dental implants. *Surface and Coatings Technology*. 2015;276:374-83.
10. Löberg J, Mattisson I, Hansson S, Ahlberg E. Characterisation of titanium dental implants I: critical assessment of surface roughness parameters. *The Open Biomaterials Journal*. 2010;2(1).
11. Shi GS, Ren LF, Wang LZ, Lin HS, Wang SB, Tong YQ. H₂O₂/HCl and heat-treated Ti-6Al-4V stimulates pre-osteoblast proliferation and differentiation.

Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2009;108(3):368-75.

12. Kizuki T, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment. *Acta biomaterialia*. 2010;6(7):2836-42.

13. Asri RIM, Harun WSW, Samykano M, Lah NAC, Ghani SAC, Tarlochan F, et al. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2017;77:1261-74.

14. Szczes A, Holysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in colloid and interface science*. 2017;249:321-30.

15. Liu Y, Kim S, McLeod JA, Li J, Guo X, Sham T-K, et al. The effect of crystal structure of TiO₂ nanotubes on the formation of calcium phosphate coatings during biomimetic deposition. *Applied Surface Science*. 2017;396:1212-9.

16. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of biomedical materials research*. 1990;24(6):721-34.

17. Hu C, Aindow M, Wei M. Focused ion beam sectioning studies of biomimetic hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrates. *Surface and Coatings Technology*. 2017;313:255-62.

18. Koju N, Sikder P, Ren Y, Zhou H, Bhaduri SB. Biomimetic coating technology for orthopedic implants. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2017;15:49-55.

19. Paz A, Martín Y, Pazos LM, Parodi MB, Ybarra GO, González JE. Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita sobre titanio mediante el método biomimético. *Revista de Metalurgia*. 2011;47(2):138-45.

20. Baker KC, Anderson MA, Oehlke SA, Astashkina AI, Haikio DC, Drelich J, et al. Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata. *Materials Science and Engineering: C*. 2006;26(8):1351-60.

21. Resende CX, Dille J, Platt GM, Bastos IN, Soares GA. Characterization of coating produced on titanium surface by a designed solution containing calcium and phosphate ions. *Materials Chemistry and Physics*. 2008;109(2-3):429-35.

22. Predoi D, Iconaru SL, Predoi MV, Buton N, Motelica-Heino M. Zinc Doped Hydroxyapatite Thin Films Prepared by Sol-Gel Spin Coating Procedure. *Coatings*. 2019;9(3):156.

23. Matsunaga K, Murata H, Mizoguchi T, Nakahira A. Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite. *Acta biomaterialia*. 2010;6(6):2289-93.

24. Ding Q, Zhang X, Huang Y, Yan Y, Pang X. In vitro cytocompatibility and corrosion resistance of zinc-doped hydroxyapatite coatings on a titanium substrate. *Journal of materials science*. 2015;50(1):189-202.
25. Prado da Silva MH, Moura FN, Navarro da Rocha D, Gobbo LA, Costa AM, Louro LHL. Zinc-modified hydroxyapatite coatings obtained from parascholzite alkali conversion. *Surface and Coatings Technology*. 2014;249:109-17.
26. Adawy A, Abdel-Fattah WI. An efficient biomimetic coating methodology for a prosthetic alloy. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2013;33(3):1813-8.
27. Negrila C, Predoi M, Iconaru S, Predoi D. Development of Zinc-Doped Hydroxyapatite by Sol-Gel Method for Medical Applications. *Molecules*. 2018;23(11):2986.
28. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dental Materials*. 2018;34(1):40-57.
29. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*. 2013;34(34):8533-54.
30. Gospodinov D, Nikolay F, Dimitrov SJPouor. Classification, properties and application of titanium and its alloys. 2016;55.
31. Kaur M, Singh KJMS, C E. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. 2019.
32. Singh P, Pungotra H, Kalsi NS. On the characteristics of titanium alloys for the aircraft applications. *Materials Today: Proceedings*. 2017;4(8):8971-82.
33. Baltatu MS, Tugui CA, Perju MC, Benchea M, Spataru MC, Sandu AV, et al. Biocompatible Titanium Alloys used in Medical Applications. 2019;70:1302-6.
34. Souza JC, Sordi MB, Kanazawa M, Ravindran S, Henriques B, Silva FS, et al. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta biomaterialia*. 2019.
35. Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontology 2000*. 2019;79(1):178-89.
36. Graziani G, Bianchi M, Sassoni E, Russo A, Marcacci M. Ion-substituted calcium phosphate coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;74:219-29.
37. Miranda G, Sousa F, Costa MM, Bartolomeu F, Silva FS, Carvalho O. Surface design using laser technology for Ti6Al4V-hydroxyapatite implants. *Optics & Laser Technology*. 2019;109:488-95.
38. Guddala NR, Pampana S, Yarram A, Sajjan S, Ramaraju A. Surface modifications of dental implants: An overview. *International Journal of Dental Materials*. 2019;1(1):17-24.

39. Chen J-C, Ko C-L, Lin D-J, Wu H-Y, Hung C-C, Chen W-C. In vivo studies of titanium implant surface treatment by sandblasted, acid-etched and further anchored with ceramic of tetracalcium phosphate on osseointegration. *Journal of the Australian Ceramic Society*. 2019;55(3):799-806.
40. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. 2019;21(S1):4-7.
41. Graziani G, Boi M, Bianchi M. A Review on Ionic Substitutions in Hydroxyapatite Thin Films: Towards Complete Biomimetism. *Coatings*. 2018;8(8):269.
42. Narayanan R, Seshadri S, Kwon T, Kim K. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2008;85(1):279-99.
43. Rau JV, Antoniac I, Filipescu M, Cotrut C, Fosca M, Nistor LC, et al. Hydroxyapatite coatings on Mg-Ca alloy prepared by Pulsed Laser Deposition: Properties and corrosion resistance in Simulated Body Fluid. *Ceramics International*. 2018;44(14):16678-87.
44. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*. 1996;32(3):409-17.
45. Zafar MS, Farooq I, Awais M, Najeeb S, Khurshid Z, Zohaib S. Chapter 11 - Bioactive Surface Coatings for Enhancing Osseointegration of Dental Implants. In: Kaur G, editor. *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses*: Woodhead Publishing; 2019. p. 313-29.
46. Jonauske V, Stanionyte S, Chen S-W, Zarkov A, Juskenas R, Selskis A, et al. Characterization of Sol-Gel Derived Calcium Hydroxyapatite Coatings Fabricated on Patterned Rough Stainless Steel Surface. *Coatings*. 2019;9(5):334.
47. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*. 2016;19(2):69-87.
48. Sadat-Shojai M, Khorasani M-T, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta biomaterialia*. 2013;9(8):7591-621.
49. Shadanbaz S, Dias GJ. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. *Acta biomaterialia*. 2012;8(1):20-30.
50. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;55:272-326.

51. Fihri A, Len C, Varma RS, Solhy A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2017;347:48-76.
52. Mondal S, Dorozhkin SV, Pal U. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2018;10(4):e1504.
53. Khan AS, Chaudhry AA. *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*: Woodhead Publishing; 2019.
54. Mary IR, Sonia S, Viji S, Mangalaraj D, Viswanathan C, Ponpandian N. Novel multiform morphologies of hydroxyapatite: Synthesis and growth mechanism. *Applied Surface Science*. 2016;361:25-32.
55. Wijesinghe WPSL, Mantilaka MMMGPG, Premalal EVA, Herath HMTU, Mahalingam S, Edirisinghe M, et al. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;42:83-90.
56. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2001;58(5):570-92.
57. Qu H, Wei M. The effect of temperature and initial pH on biomimetic apatite coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2008;87(1):204-12.
58. Hu C, Yu L, Wei M. Sectioning studies of biomimetic collagen-hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrates using focused ion beam. *Applied Surface Science*. 2018;444:590-7.
59. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, de Groot KJ. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994;28(1):7-15.
60. Uchida M, Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nakamura T. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2003;64(1):164-70.
61. Ryu HS, Song W-H, Hong S-H. Biomimetic apatite induction on Ca-containing titania. *Current Applied Physics*. 2005;5(5):512-5.

62. Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T. Coating bone-like apatite onto organic substrates using solutions mimicking body fluid. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2007;1(1):33-8.
63. Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta biomaterialia*. 2007;3(6):980-4.
64. Szmukler-Moncler S, Testori T, Bernard J. Etched implants: a comparative surface analysis of four implant systems. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2004;69(1):46-57.
65. Conterno G, Pazos L, Parodi M, Egidi D, Corengia P, editors. *Surface treatment on biomaterials: acid etching on titanium surfaces*. 19th European Conference on Biomaterials Sorrento: Italy; 2005.
66. Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*. 2001;54(2):172-8.
67. Wang X-X, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H₂O₂/HCl solution. *Biomaterials*. 2002;23(5):1353-7.
68. Rastegari S, Salahinejad EJCp. Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for osseointegration by alkaline treatment and chitosan-matrix glass-reinforced nanocomposite coating. 2019;205:302-11.
69. Shi G-s, Ren L-f, Wang L-z, Lin H-s, Wang S-b, Tong Y-q. H₂O₂/HCl and heat-treated Ti-6Al-4V stimulates pre-osteoblast proliferation and differentiation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;108(3):368-75.
70. Kokubo T, Yamaguchi S. Growth of novel ceramic layers on metals via chemical and heat treatments for inducing various biological functions. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015;3:176.
71. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006(15):2907-15.
72. Barrere Fv, Van Blitterswijk C, De Groot K, Layrolle P. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBFx 5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials*. 2002;23(10):2211-20.
73. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for*

Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. 2003;65(2):188-95.

74. Li F, Feng Q, Cui F, Li H, Schubert H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surface and Coatings Technology*. 2002;154(1):88-93.

75. Predoi D, Iconaru S, Deniaud A, Chevallet M, Michaud-Soret I, Buton N, et al. Textural, structural and biological evaluation of hydroxyapatite doped with zinc at low concentrations. *Materials*. 2017;10(3):229.

76. Ramos AP, Ybarra GO, Pazos LM, Parodi MB, Rodríguez L, Hernández ML, et al. Manufacture of nanosized apatite coatings on titanium with different surface treatments using a supersaturated calcification solution. *Química Nova*. 2016;39:1159-64.

77. Alla RK, Ginjupalli K, Upadhya N, Shammam M, Ravi RK, Sekhar R. Surface roughness of implants: a review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 2011;25(3):112-8.

78. Türk S, Altınsoy I, Efe GÇ, Ipek M, Özacar M, Bindal CJMS, et al. Biomimetic synthesis of Ag, Zn or Co doped HA and coating of Ag, Zn or Co doped HA/fMWCNT composite on functionalized Ti. 2019;99:986-98.

79. Ramesh S, Tan C, Tolouei R, Amiriyan M, Purbolaksono J, Sopyan I, et al. Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes. 2012;34:148-54.

80. Ren F, Xin R, Ge X, Leng Y. Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. *Acta biomaterialia*. 2009;5(8):3141-9.

81. Popa CL, Deniaud A, Michaud-Soret I, Guégan R, Motelica-Heino M, Predoi DJJoN. Structural and biological assessment of zinc doped hydroxyapatite nanoparticles. 2016;2016.

82. Yelten-Yilmaz A, Yilmaz S. Wet chemical precipitation synthesis of hydroxyapatite (HA) powders. *Ceramics International*. 2018;44(8):9703-10.

83. Uysal I, Severcan F, Tezcaner A, Evis ZJPiNSMI. Co-doping of hydroxyapatite with zinc and fluoride improves mechanical and biological properties of hydroxyapatite. 2014;24(4):340-9.