The background of the entire page is a scanning electron microscope (SEM) image showing a highly porous, interconnected network of fibers or particles, characteristic of a coating on a substrate. The structure consists of numerous small, rounded, interconnected units that form a dense, porous matrix. The overall appearance is that of a complex, three-dimensional lattice structure.

**RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS
POR ANODIZADO Y
TRATAMIENTOS ALCALINOS
SOBRE TITANIO PARA
IMPLANTES DENTALES**

Inga. Adriana Lemos Barboza

***RECUBRIMIENTOS OBTENIDOS POR
ANODIZADO Y TRATAMIENTOS ALCALINOS
SOBRE TITANIO PARA IMPLANTES
DENTALES***

Tesis de Doctorado

Inga. Adriana Lucila Lemos Barboza

*Presentada ante la Facultad de Ingeniería
de la Universidad Nacional de La Plata
como requisito para la obtención del grado académico de*

Doctor en Ingeniería

**Directora: Dra. Kang Kyung Won
Co-Director: Ing. Carlos Luis Llorente**

Jurados de tesis:

Dra. María Elena Canafoglia

Dra. Andrea M. Tanevitch

Dr. Ricardo W. Gregorutti

La Plata, 16/02/2024

“La cima de una montaña es la base de la siguiente, así que sigue escalando”.

Andre De Shields

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme la posibilidad de vivir esta experiencia tan enriquecedora a nivel profesional y personal.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Kang Kyung Won y al Ing. Carlos Llorente, mis directores, por su paciencia y comprensión a lo largo de todos estos años, los admiro profundamente. También quiero hacer una mención especial al Dr. Pablo Bilmes, quien me acompañó como director durante varios años. Pablo, agradezco sinceramente tu apoyo.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Anahí Azpeitia y al Dr. Claudio Gervasi por su valiosa contribución en la caracterización electroquímica de las diversas superficies planteadas en este trabajo de tesis. Ani, amiga, sos excepcional; confía en tu capacidad porque te sobra. Clau, no tengo más que admiración por vos, y espero continuar aprendiendo de tu experiencia.

A mi querida Facultad de Ingeniería, me llena de orgullo formar parte del distinguido cuerpo docente de la carrera de Ingeniería en Materiales. Mi deseo para todos es que podamos disfrutar de una Universidad Pública, Gratuita y de Calidad, enriqueciendo así nuestra experiencia académica, al igual que la que he tenido durante mi trayectoria en la carrera de grado y postgrado.

Quiero expresar mi gratitud a los miembros del LIMF, mi querido laboratorio, Daniel, Juan, Joaquín, Pablo, Claudia (aunque te hayas jubilado, sigues siendo parte de nosotros), Facu, Sofi, Ange y Juli. Agradezco sinceramente el cariño y compañerismo que nos une. Que podamos disfrutar de muchas más charlas y risas.

Agradecer al Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Odontológica de la FOLP. Quisiera expresar mi reconocimiento a la Dra. Karina Mayocchi y al

Lic. Nahuel Blasetti por introducirnos y orientarnos en el magnífico mundo de las células madre, agradeciéndoles especialmente por su paciencia y por resolver todas mis dudas, especialmente durante la redacción del capítulo 6 de esta tesis. Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento al Sr. Decano de la Facultad de Odontología, el Dr. Gabriel Lazo, por su disposición y respaldo desde nuestra primera reunión. Fue gracias a su apoyo que, junto con mis directores, nos embarcamos en la investigación para ensayar las diferentes superficies con células madre.

A la empresa Kinetical SRL y, de manera especial, al Ing. Nicolás Scarano, por el respaldo y la contribución de los materiales utilizados en la tesis.

A todos los estudiantes, hoy convertidos en colegas, los cuales fueron parte de proyectos relacionados con el tema de tesis. Agradezco la contribución de Agustín Cerliani, Anahí Azpeitia, Evelin Cardozo, Florencia Gatti y Sofía Tsonuda. Y, finalmente, a Juli Kohan, con quien continuó colaborando y brindando apoyo en su investigación de doctorado.

A Ro, mi compañero de vida durante 14 años, quien compartió conmigo una parte de mi formación como Ingeniera y también una parte de mi educación de posgrado. Agradezco tu amor y compañerismo; sé que te alegras sinceramente por este importante logro en mi vida.

A mis amigos Wally, Vivi, Cin, Noe, Car, Mari, Adri T y Guadi, gracias por ser mis maestros de luz, todos los días aprendo de ustedes. Por muchos años de amistad. Los amo.

A mi amada familia papá, mamá, Seba, Mari y Merce gracias por acompañarme y apoyarme en todo lo que emprendo. Soy el ser humano que soy gracias a ustedes. A mi hermano angelito Yocelyn gracias por cuidarme siempre. A mis tías Ara,

Zuni y Tina son unos referentes muy importantes en mi vida. Los amo profundamente.

Dedico esta tesis a cuatro mujeres importantes en mi vida

A mi psicóloga, Liliana Rey. Sos realmente excepcional; en muchas ocasiones salí de las sesiones con lágrimas, ya que llegar a este punto fue un proceso que duró varios años de intenso trabajo personal, y que, a su vez, influyó en la redacción del manuscrito. En numerosas ocasiones, dudaba de mi capacidad para lograrlo, pero gracias a vos, comprendí que no era así. Gracias por guiarme en el camino hacia el éxito. Te quiero mucho.

A Bety, quien ya no está presente en este plano pero que me acompañó en cada momento difícil que tuve que atravesar, quiero agradecerle por todo. Siento que no hay palabras que puedan expresar el amor que siento por vos. Te voy a extrañar toda la vida.

En especial a mi amiga Adri, la hermana que me regaló la vida. Sos una de las personas que más admiro y me siento bendecida de que formes parte de mi vida hace más de 20 años. Gracias por estar siempre a mi lado; sin vos, no lo hubiese logrado. Te amo profundamente, y siento que estas líneas apenas reflejan lo que significas para mí.

Finalmente, quiero agradecerme a mí misma. A pesar de que hubo momentos a lo largo de estos siete años en los que sentía que este día nunca llegaría, nunca me di por vencida. Comprendí que los sueños se hacen realidad, solo es necesario trabajar por ellos, y, sobre todo, trabajar en uno mismo para saber que podemos llegar a la cima de la montaña.

ÍNDICE

RESUMEN	10
CAPITULO 1	13
INTRODUCCION.....	13
1.1 . Introducción General	13
1.2 . Biomateriales Dentales.....	14
1.2.1 Clasificación de los Biomateriales Dentales.....	15
1.2.1.1 . Materiales Dentales de Primera Generación	15
1.2.1.2 . Biomateriales Dentales de Segunda Generación	15
1.2.1.3 . Biomateriales Dentales de Tercera Generación.....	16
1.2.1.4 . Biomateriales Dentales de Cuarta Generación.....	16
1.3 . Propiedades de un Biomaterial Dental.....	17
1.4 . ¿Qué es un Implante Dental?.....	19
1.4.1 Titanio como Material Dental.....	20
1.5 . Tratamientos Superficiales.....	23
1.5.1 Blastinado	24
1.5.2 Anodizado por Plasma Químico.....	26
1.5.3 Tratamiento Alcalino.....	30
CAPITULO 2	33
TECNICAS DE CARACTERIZACION SUPERFICIAL.....	33
2.1. Técnicas de Caracterización.....	33
2.1.1. Difracción de Rayos X	33
2.1.2. Espectroscopía FT-IR.....	35
2.1.3. Espectroscopía Raman	37
2.1.4. SEM-EDS	39
2.1.4.1. Espectrómetro dispersivo en energías (EDS).....	41
2.1.4.2. Rugosidad.....	41
2.1.4.2.1 Dimensión Fractal.....	43
2.1.4.2.2 <i>Topothesy</i>	44
2.1.5. Mojabilidad.....	47
2.1.6. Ensayo de Adhesión Rockwell C.....	49
2.1.7. Potencial Z.....	50

CAPITULO 3	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.1 . Preparación de Muestras.....	52
3.2 . Tratamientos Superficiales	52
3.2.1 Blastinado.....	52
3.2.2 Anodizado por Plasma Químico.....	52
3.2.3 Tratamiento Alcalino.....	53
3.2.4 Tratamiento Térmico.....	53
3.3 . Caracterización.....	54
3.3.1. Topografía Superficial y Rugosidad	54
3.3.2. Composición Superficial.....	54
3.3.3. Espesor de los recubrimientos.....	55
3.3.4. Ensayo de adhesión Rockwell C.....	56
3.3.5. . Potencial Zeta.....	56
3.3.6. Mojabilidad.....	57
3.3.7. Ensayo <i>in-vitro</i> en SBF	57
3.3.8. Ensayo <i>in-vitro</i> con células madre mesenquimales (CMM).....	57
CAPITULO 4.....	59
EFFECTOS DEL TRATAMIENTO ALCALINO EN LAS CARACTERISTICAS SUPERFICIALES Y BIOACTIVIDAD DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO BLASTINIZADOS Y ANODIZADOS POR PLASMA QUIMICO	59
4.1 . Resultados y Discusiones.....	62
4.1.1. Topografía superficial, composición y espesor	62
4.1.2. Composición de Fases.....	67
4.1.2.1. Espectroscopía Raman.....	67
4.1.2.2. Difracción de Rayos X	70
4.1.2.3. ATR-FTIR.....	74
4.1.3. Rugosidad.....	77
4.1.4. Mojabilidad.....	82
4.1.5. Potencial Z.....	85
4.1.6. Ensayo <i>in-vitro</i> en Fluido Biológico Simulado (SBF).....	87

4.2	CONCLUSIONES.....	92
CAPITULO 5..... 94		
CARACTERIZACION SUPERFICIAL DE TRATAMIENTOS TERMICOS POSALCALINOS EN IMPLANTES DENTALES DE TITANIO BIOACTIVOS 94		
5.1	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	95
5.1.1	Topografía Superficial, composición y espesor.....	95
5.1.2	Composición de fases.....	103
5.1.3	Ensayo de adhesión Rockwell C.....	110
5.1.4	Rugosidad.....	112
5.1.5	Mojabilidad.....	115
5.1.6	Potencial Z.....	117
5.1.7	Ensayo <i>in-vitro</i> en Fluido Biológico Simulado (SBF).....	119
5.2	CONCLUSIONES.....	127
CAPITULO 6..... 129		
ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO BIOACTIVO CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES 129		
6.1	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	131
6.1.1	Ensayo <i>in-vitro</i> con células madre mesenquimales (CMM) en superficies bioactivas sin tratamiento térmico.....	131
6.1.2	Ensayo <i>in-vitro</i> con células madre mesenquimales (CMM) en superficies bioactivas con tratamiento térmico.....	135
6.2	CONCLUSIONES.....	141
CONCLUSIONES GENERALES..... 142		
BILIOGRAFIA..... 144		

RESUMEN

El presente trabajo de tesis se enmarca en la investigación de la viabilidad de tratamientos superficiales bioactivos sobre titanio c.p. Gr4 para implantes dentales, con el propósito de producir recubrimientos que puedan mejorar en tiempo y forma su osteointegración y su desempeño funcional. A tal efecto, se propone como objetivo reconocer las características, propiedades y aptitud para su desempeño funcional, de recubrimientos superficiales bioactivos sobre titanio Gr4 para implantes dentales, obtenidos por anodizados por plasma químico (APQ), tratamientos alcalinos en NaOH y tratamientos térmicos.

El éxito o fracaso de un implante depende del contacto directo que se establezca entre el hueso y el implante (osteointegración), así como de la unión de los tejidos blandos que rodean la superficie del implante. Las propiedades superficiales de los biomateriales dentales ya sean físicas, químicas, mecánicas o biológicas, influyen en los procesos de osteointegración y en el desarrollo del sello biológico en la interfaz implante-tejido blando (tejido periimplantario) que previenen enfermedades periimplantarias.

En la actualidad, el titanio es uno de los biomateriales más empleados en la fabricación de implantes dentales, gracias a su combinación óptima de propiedades como biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, alto rendimiento mecánico y módulo de elasticidad relativamente bajo. Sin embargo, es fundamental utilizar materiales reactivos en la fabricación de implantes dentales para lograr una unión con los tejidos vivos a través de reacciones físicas y/o químicas.

En este sentido, se han desarrollado diversos tratamientos superficiales que buscan transformar las superficies de los implantes de titanio de bioinertes a bioactivas.

En el caso específico de los tratamientos superficiales bioactivos, se destacan el blastinado (también conocido como granallado o arenado), que aumenta la rugosidad superficial mediante la proyección de partículas presurizadas; el anodizado por plasma químico, que genera un recubrimiento cerámico bioactivo de óxido de titanio enriquecido con calcio y fósforo; y el tratamiento alcalino, que genera una capa nanoestructurada de hidrogel de titanato de sodio. El propósito final es lograr una unión implante-hueso efectiva, promoviendo la diferenciación celular y la formación de matriz ósea.

Los estudios llevados a cabo, como parte del trabajo de tesis, se centraron en la caracterización de las propiedades superficiales bioactivas obtenidas mediante el tratamiento alcalino en dos superficies diferentes utilizadas en la industria de los implantes dentales: el blastinado con partículas de fosfato de calcio y el anodizado por plasma químico. A tal fin, se utilizaron diversas técnicas de caracterización, como SEM, EDS, Potencial Zeta, Espectroscopía Raman, Difracción de Rayos X, FTIR-ATR, Medición de Ángulo de Contacto y SBF (*Simulated Body Fluid*). En particular, el ensayo SBF se efectuó para evaluar la bioactividad de los implantes dentales, mediante la inmersión del material en un fluido corporal simulado acelular (SBF), que simula las condiciones del plasma sanguíneo humano.

Por otro lado, diferentes estudios revelan que el hidrogel de titanato de sodio presenta una adhesión insuficiente del sustrato al recubrimiento, se recomienda realizar un tratamiento térmico posterior a alta temperatura que transforme el hidrogel de titanato de sodio en un titanato de sodio mecánicamente más estable. En este caso, se caracterizaron las propiedades superficiales obtenidas al realizar un térmico a 400, 600 y 800 °C, posterior al tratamiento alcalino realizado en las superficies blastinadas y anodizadas con plasma químico. Las técnicas de

caracterización utilizadas fueron SEM, EDS, Potencial Zeta, Espectroscopía Raman, Difracción de Rayos X, FTIR-ATR, Medición de Ángulo de Contacto, Ensayo de Adhesión y SBF (*Simulated Body Fluid*).

Se han desarrollado métodos *in-vitro* para estimar el comportamiento de la interfaz tejido blando-implante en cultivos celulares a diferentes tiempos y de esta forma evaluar el comportamiento biológico que desarrollará el tejido periimplantario. Los cultivos con células (fibroblastos gingivales, fibroblastos periodontales, osteoblastos, células madre mesenquimales, etc) directamente sobre la superficie del implante a diferentes tiempos, permite analizar el comportamiento celular (osteogénesis, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular) de las superficies. Finalmente, en este trabajo de tesis, se realizó el cultivo con células madre mesenquimales (CMM) durante 48 horas y se observaron las superficies mediante SEM y EDS.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 . Introducción General

La evolución en el estudio de los biomateriales dentales nace de la necesidad de poder mejorar o solucionar los problemas de salud que se han presentado a lo largo de toda la historia en los entornos orales y maxilofaciales de los seres humanos [1]. Existen registros de problemas dentales que datan desde el año 5000 a.C, una de las afecciones médicas fundamentales de la época era la pérdida de la función masticatoria debido a la ausencia de piezas dentales (edentulismo) ya sea de manera parcial o total [2]. Entre los años 500 a.C y 50 a.C, las civilizaciones egipcias y etruscos utilizaron alambres y bandas de oro, además de huesos de animales para estabilizar y fabricar sustitutos dentales que traten las afecciones periodontales de su población. Alrededor del año 300 d.C, estos mismos pueblos utilizaron dientes tallados en marfil, los cuales fueron fijados con alambres de oro al medio bucal. El oro fue uno de los primeros “biomateriales” utilizados por las antiguas civilizaciones, lo cual no es sorprendente ya que, al ser un metal noble, exhibe una relativa reactividad química y una excelente resistencia a la corrosión en contacto con el cuerpo humano [3]. Alrededor del año 600 d.C, la civilización maya realizó reemplazos de dientes mandibulares con piezas de nácar obtenidas de conchas de mar, esta es una de las primeras evidencias de la utilización de implantes dentales. Durante el siglo XVI y el siglo XIX, en Europa se realizaban alotrasplantes con piezas dentales de personas desfavorecidas o de cadáveres. Durante el siglo XVIII, se inició un estudio más detallado del medio oral (boca y mandíbula), lo que permitió el uso de materiales como plata, porcelana e iridio en implantes dentales. Sin embargo, en ese momento no se tenían en cuenta las alergias e inflamaciones que se producían en las encías, ni se comprendían las

propiedades que debían tener los materiales para ser utilizados en implantes dentales. A pesar de los avances en el uso de diferentes materiales, aún no se había alcanzado un conocimiento completo sobre el tema [4].

Durante la década del 1910, el reemplazo de la función masticatoria se logró a partir del uso de una aleación de Ir-Pt soldada con oro, en la década del 1930 la restauración de dientes individuales se consiguió con el uso de una aleación de Cr-Co-Mo (Vitallium)[4].

1.2 . Biomateriales Dentales

Los biomateriales dentales son aquellos materiales fabricados o diseñados para su empleo en implantes óseos o para el reemplazo del tejido dental [5]. Existen muchos tipos de biomateriales dentales con propiedades características y su elección dependerá de la función (apósitos temporales, restauraciones dentales, materiales de endodoncia, implantes dentales, etc) que van a desempeñar en el medio oral [5], [6]. A lo largo de los años, uno de los principales objetivos en el avance de los implantes dentales ha sido mejorar el proceso de osteointegración entre el dispositivo biomédico y el entorno oral. Idealmente, las propiedades de los biomateriales deberían coincidir estrechamente con las características de los tejidos que se pretenden reemplazar, aunque esto no siempre es factible. Por ello, resulta crucial estudiar dichas propiedades, de manera de poder compararlas con las particularidades de los tejidos orales duros y blandos. Este enfoque contribuye a evitar posibles reacciones adversas en el entorno receptor después de la implantación [5], [6]. La superficie de los implantes deberá poseer resistencia al desgaste y a la corrosión, propiedades de compatibilidad biológica en términos de la química de la superficie, además, acelerar los fenómenos de cicatrización de las heridas, dando lugar a la formación de una capa interfacial y una matriz ósea con propiedades biomecánicas adecuadas.

1.2.1 Clasificación de los Biomateriales Dentales

Con el desarrollo en las investigaciones de científicos y odontólogos a partir de la década de 1950, los biomateriales dentales se comenzaron a clasificar en distintas generaciones, que se explican a continuación.

1.2.1.1 . Materiales Dentales de Primera Generación

El objetivo principal de los biomateriales dentales de primera generación se establecía en lograr propiedades funcionales que coincidieran adecuadamente con las de los tejidos orales sin una respuesta perjudicial del huésped. Se utilizaban materiales industriales disponibles en el mercado los cuales poseían deseables propiedades físicas de uso clínico, bioinertes y biocompatibles [7]. Una de las limitaciones que presentaban estos materiales es que cuando se obstruían (voluntaria o involuntariamente) el organismo intentaba expulsarlo, reabsorberlo o aislarlo con la formación de un tejido fibroso alrededor del implante. Dentro de los materiales de primera generación se encontraban: oro y la amalgama dental Hg-Ag-Sn-Cu (se ha discontinuado su uso debido a los efectos adversos que produce en el cuerpo humano debido a la liberación de mercurio elemental).

1.2.1.2 . Biomateriales Dentales de Segunda Generación

Surgieron de la evolución de los materiales de primera generación y la función que cumplieron era reparar e inducir el efecto terapéutico en los tejidos orales luego de la implantación. Se empezaron a utilizar materiales bioactivos dentro de los cuales se pueden mencionar vidrios y cerámicas bioactivas. [7]. En 1978, el Dr. P. Brånemark introdujo el uso de titanio como material en la fabricación de implantes dentales, los estudios y la implantación de estos dispositivos en sus pacientes comenzó en el año 1965, entre los registros publicados consta que los dispositivos implantados se integraron al hueso en un periodo de 6 meses y permanecieron colocados durante 40 años. Durante el año 1952, el Dr. P.

Brånemark y su equipo de investigación, analizaban el comportamiento del flujo sanguíneo en los fémures de conejos; la investigación se desarrolló a partir de la colocación de cámaras de titanio en los huesos de los mamíferos, concluida la investigación se quisieron extraer las cámaras y notaron que éstas se encontraban firmemente adheridas al hueso de los animales y no se pudieron retirar [8]. A partir de estos estudios se descubrió lo que en la actualidad se conoce como osteointegración, Brånemark definió la osteointegración como *“la conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante que soporta carga”*. Durante todos estos años se avanzó en la geometría de los implantes dentales, pero también a partir del descubrimiento del Dr. Brånemark, las investigaciones se empezaron a focalizar en el estudio de las características superficiales de los implantes que iban a estar en contacto con los tejidos vivos.

1.2.1.3 . Biomateriales Dentales de Tercera Generación

Los biomateriales dentales de tercera generación se diseñan para tener un contacto estrecho con los tejidos vivos, el estudio se centra en las propiedades superficiales de manera de generar una respuesta positiva en el tejido vivo luego de la implantación. Estos materiales inducen respuestas celulares específicas a nivel molecular en el medio biológico promoviendo reacciones químicas específicas entre ambas superficies logrando la regeneración y la biointegración. Estos biomateriales se obtienen a partir de la combinación de un biomaterial dental convencional con moléculas bioactivas, esta combinación estimula una respuesta específica por parte del medio biológico con la formación de células o tejidos [7].

1.2.1.4 . Biomateriales Dentales de Cuarta Generación

Los biomateriales dentales de cuarta generación conocidos como biomateriales inteligentes poseen la capacidad de estimular, manipular simultáneamente y

registrar la actividad bioeléctrica celular *in vitro* [9]. Estos materiales no solo reemplazan el volumen dental ausente, sino también poseen propiedades terapéuticas beneficiosas. Dentro de los materiales que se están analizando *in vitro* se encuentran fosfato de calcio, nanocristales de hidroxiapatita, fosfato de calcio nanoamorfo y vidrio bioactivo nanoparticulado; estos materiales tienen un potencial remineralizante que intercepta la progresión temprana de la lesión. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre estos materiales son *in vitro* y a corto plazo, con lo cual se requieren más investigaciones a largo plazo para conocer su eficacia y seguridad en aplicaciones clínicas [10]–[12].

1.3 . Propiedades de un Biomaterial Dental

Las características principales que debe cumplir un material para su uso en implantes dentales son [4]:

1.3.1 Biocompatibilidad

Es una de las propiedades más importantes involucradas en la elección de un material que va a cumplir una función específica en el medio oral, depende directamente de las propiedades del biomaterial y de las propiedades superficiales y volumétricas del implante [13].

Se ha definido a la **Biocompatibilidad** como “*la capacidad que presenta un material para realizar funciones específicas con respecto a un diagnóstico médico determinado, inducir una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica y la interacción con los sistemas vivos sin tener ningún riesgo de lesión, toxicidad o rechazo por parte del paciente, sistema inmune, efectos locales o sistémicos indeseables o inapropiados*” [14].

Una definición universal de **biocompatibilidad** proporcionada por la FDA (sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*):

“es aquel material que no induce daños mesurables al huésped.
[www.fda.gov/medical-devices].

1.3.2 Bioactividad

Un material bioactivo es aquel que provoca una respuesta química-biológica en la interfaz biomaterial-tejido específica, desarrollando una unión interfacial directa, adherente y fuerte con los tejidos (duros y blandos) [5], [6], [15]. La bioactividad de un material depende de diversos factores, dentro de los más importantes se destacan la composición química (presencia de iones bioactivos), topografía y mojabilidad [5]. Se puede evaluar la bioactividad a partir de ensayos *in vitro* e *in vivo* y uno de los métodos *in vitro* estándar más utilizado es la inmersión del material en fluido biológico simulado (sus siglas en inglés “*Simulated Body Fluid*”) según norma ISO 23317:2012. Luego de un cierto tiempo de inmersión se evalúa la precipitación de Hidroxiapatita (HA) en la superficie del biomaterial a partir de distintas técnicas de caracterización de superficie [16].

1.3.3 Osteointegración

En el año 1977 Per-Ingvar Branemark definió la osteointegración como la *“unión directa, tanto funcional como estructural entre el hueso y la superficie del implante sometido a carga”*. Una definición más actual, la osteointegración es la *“conexión estructural y funcional entre la superficie del hueso y el implante sin la formación de tejido fibroso”* (reacción de cuerpo extraño) [5]. La osteointegración es una propiedad necesaria para la estabilidad del implante a largo plazo, cuando un implante dental se halla osteointegrado no se producen movimientos relativos entre éste y los tejidos vivos. Los eventos que conducen a la osteointegración del implante se inician a través de distintos mecanismos que conducen a la cicatrización del tejido óseo; la cicatrización de esta interfase depende de las condiciones biológicas del hueso (calidad y cantidad ósea),

características de diseño del implante (biocompatibilidad, química de la superficie, rugosidad, etc) y, la distribución de cargas entre el hueso y el implante [5]. Las propiedades superficiales del implante son decisivas en la adhesión y diferenciación de las células en la fase inicial de la osteointegración, así como la regeneración ósea a largo plazo [17]. Dentro de los métodos de evaluación *in-vitro* se encuentran, la diferenciación osteogénica a partir de la medición de la actividad de fosfatasa alcalina. El estudio *in vivo* se realiza mediante la implantación del material dentro del hueso de un animal seguido de una evaluación de la densidad del volumen óseo a partir de la técnica de micro-TC (microtomografía computarizada de rayos X)[5].

1.3.4 Biofuncionalidad

Es aquel material que posee propiedades físicas (densidad, forma, porosidad, rugosidad, etc) y mecánicas (compresión, tracción, corte, impacto) similares a las propiedades del tejido biológico las cuales permiten satisfacer los requisitos de diseño frente a las tensiones que impone la cavidad oral [14], [17], [18].

1.4 . ¿Qué es un Implante Dental?

Un implante dental es un dispositivo médico que imita la raíz de un diente y se coloca en la mandíbula en reemplazo de una pieza dental. Con el tiempo, el implante se convierte en una base estable para la colocación de la corona. Los implantes dentales pueden reemplazar una o varias piezas dentales o soportar dentaduras postizas (parciales o completas). En la figura 1.4.1 se presenta un esquema de un implante en el medio oral. Se identifican tres partes: (a) el implante; (b) el pilar colocado sobre el dispositivo para sujetar la corona; y (c) la corona que puede cementarse o atornillarse al pilar.

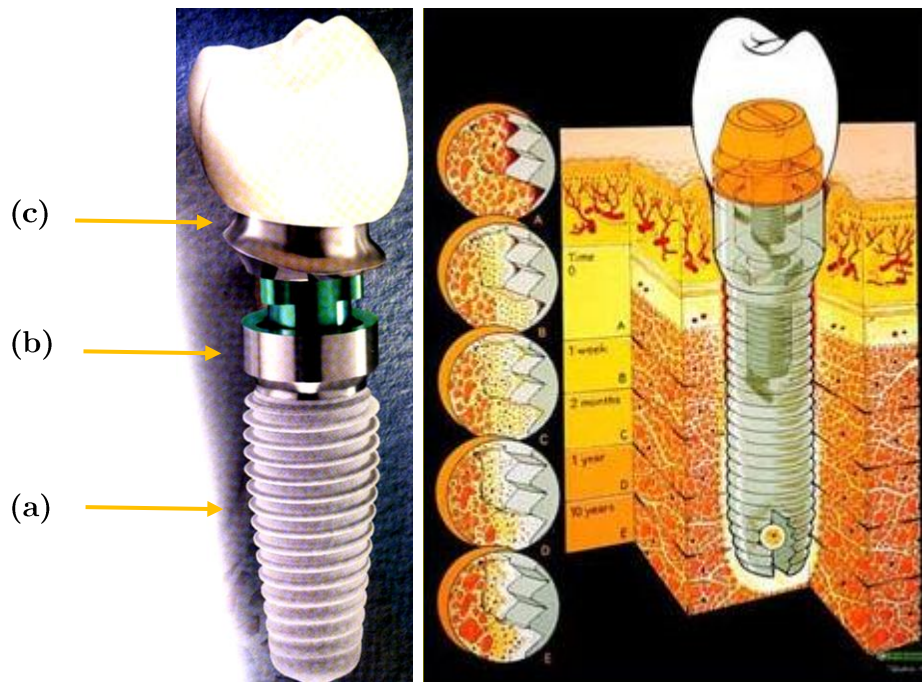


Figura 1.4.1. Esquema de un implante dental en el medio oral [18], [19].

Los implantes dentales pueden presentar diferentes geometrías, las formas más comunes son las de tipo tornillo o cilíndrica. Una de las propiedades más importantes para evitar el fracaso del implante es que se produzca un fuerte vínculo biomecánico (**osteointegración**) entre el implante y la mandíbula. El éxito de la osteointegración depende del estado médico del paciente, el hábito de fumar, la calidad ósea, la contaminación bacteriana, la carga inmediata y las características superficiales del implante. Los criterios mínimos para el éxito de un implante dental se estipulan con una tasa de éxito del 85% dentro de los primeros 5 años y de un 80% para un periodo de 10 años luego de la implantación [18].

1.4.1 Titanio como Material Dental

La introducción de implantes en el medio biológico genera interacciones fisicoquímicas entre el material del implante y los tejidos vivos; los sucesos que se desarrollen en la interfaz tejido vivo-implante conducirán al éxito o fracaso del implante en el medio receptor [20].

El material metálico más utilizado en implantología dental y maxilofacial es el Ti y sus aleaciones debido a su gran disponibilidad, alta biocompatibilidad, excelente resistencia a la corrosión (bioestable o biológicamente inerte), alta resistencia mecánica y rigidez, y densidad relativamente baja [21]. Es el cuarto elemento metálico más abundante en la corteza terrestre después del Al, Fe y Mg [18]. En la naturaleza se lo encuentra como rutilo (TiO_2) o ilmenita (FeTiO_3), la reducción y obtención de titanio en su estado elemental se realiza a partir del proceso Hunter o el proceso Kroll [22]. La forma elemental presenta una estructura cristalina hexagonal compacta (hcp), comúnmente conocida como fase alpha; por encima de 883 °C presenta una estructura cristalina cubica centrada en el cuerpo (bcc) denominada beta. [23]. Las aleaciones de titanio se clasifican en aleaciones α -, near α -, $\alpha+\beta$, near β -, y β basadas en su estructura cristalina a temperatura ambiente. La aleación Ti-6Al-4V (tipo $\alpha+\beta$) inicialmente desarrollada para la industria aeroespacial, fue una de las primeras aleaciones utilizadas como material de implante. Las normas ASTM F67 y F136 especifican cuatro grados de Ti cp y una aleación de titanio especialmente diseñados para aplicaciones en implantes dentales. Los grados de 1 a 4 son titanio comercialmente puro normalizado según el contenido de oxígeno, carbono y hierro; mientras que el grado 5 es la aleación Ti6Al4V (ASTM F67 y F136). En Tabla 1.4.1.1 se presentan los distintos grados de Ti cp y sus aleaciones (ASTM F67 y F136).

Tabla 1.4.1.1. Composición química de Ti c.p., expresada en límites máximos según ASTM F67-13.

Ti c.p.	Composición química (wt %)					
	N	C	H	Fe	O	Ti
Grado 1	0,03	0,08	0,015	0,2	0,18	Balance
Grado 2	0,03	0,08	0,015	0,3	0,25	Balance
Grado 3	0,05	0,08	0,015	0,3	0,35	Balance
Grado 4	0,05	0,08	0,015	0,5	0,4	Balance

Tabla 1.4.1.2. Propiedades mecánicas de Ti cp y sus aleaciones según ISO 5832-2:2015

Ti c.p.	Propiedades Mecánicas			
	Resistencia a la Tracción [Mpa]	Módulo de Young [Gpa]	Límite elástico 0,2% [Mpa]	Alargamiento %
Grado 1	240	106-108	170-310	24
Grado 2	343	106-108	275-410	20
Grado 3	440	106-108	377-520	18
Grado 4	550	106-108	480	20
Aleaciones Ti				
Ti6Al4V	895-930	106-108	825-869	10
Ti6Al4V ELI	825-860	106-108	760-795	10

El titanio es un material reactivo con una gran afinidad por el oxígeno, si el metal sufre un daño se forma espontánea e instantáneamente una película de óxido protectora en presencia de un medio oxidante como es el entorno biológico. La capacidad de formar una capa de óxido protectora, continua, químicamente estable y altamente adherente a la superficie, le confiere al Ti y sus aleaciones una excelente resistencia a la corrosión [21]; las propiedades fisicoquímicas y electroquímicas de la película pasiva de óxido y su estabilidad a largo plazo en el entorno biológico afectan la tasa de osteointegración y fijación biomecánica [24], [25]. El óxido termodinámicamente estable es TiO_2 , puede ser amorfo, cristalino o mezcla de ambas con un espesor de película de aproximadamente de 5 a 10 nm. Las estructuras cristalinas que pueden presentar el TiO_2 son: rutilo (tetragonal), anatasa (tetragonal) y brookita (ortorrómbico) siendo estas dos últimas fases metaestables [19], [21], [26]. El rutilo (TiO_2) es la fase termodinámicamente estable desde temperatura ambiente hasta su punto de fusión (2105,2 °C). La anatasa transforma irreversiblemente en rutilo entre 400°C y 1200°C, la transformación es reconstructiva con la ruptura y generación de nuevos enlaces atómicos y dependiente del tiempo; durante la transformación se genera una

contracción del 8% del volumen, lo que explica la mayor densidad del rutilo en comparación a la anatasa [27]. La fase anatasa del TiO_2 tiene la capacidad de inducir la formación de una apatita similar a la del hueso en comparación a la fase rutilo, cuando se ensayan *in-vitro* en SBF [28], [29].

1.5 . Tratamientos Superficiales

En general, es improbable que los metales como materiales artificiales posean biofuncionalidad [30] y se unan química y espontáneamente con los tejidos duros en presencia de los fluidos corporales. La eficacia de los implantes artificiales se establece principalmente por sus características superficiales, tales como morfología de la superficie y estructura, composición química, rugosidad, hidrofiliidad, etc.; dado que estas propiedades influyen en la adsorción de las biomoléculas que intervienen en la adhesión de las células deseables para el proceso de osteointegración [31]. La superficie de un implante dental es la única parte que está en contacto directo con el bioambiente y la particularidad de la superficie dirige la respuesta y afecta la resistencia mecánica de la interfaz implante / tejido [4].

Desde que Brånemark descubrió el fenómeno de osteointegración en la década de 1960, es conocido que el Ti presenta compatibilidad con los tejidos duros o propiedades de conducción ósea [8]. Es importante aclarar que la capacidad de formación ósea del Ti es menor que el de las cerámicas bioactivas, como la hidroxiapatita y los vidrios bioactivos [26]. Los nuevos diseños de implantes dentales de titanio se están direccionado a aplicar tratamientos biomineralizantes para transformar sus superficies bioinertes en bioactivas e hidrofílicas y de esta manera acelerar y mejorar sustancialmente los inmediatos estadios post implantación, la secuencia de eventos biológicos que aseguran una rápida y duradera osteointegración [32]–[34]. Los principales objetivos de los tratamientos

de superficie consisten principalmente en la mejora del comportamiento tribológico, la resistencia a la corrosión y la osteointegración del implante. Se han realizado estudios para aumentar el espesor y estabilizar los óxidos de la superficie del Ti, de esta manera lograr las respuestas biológicas deseadas. La respuesta biológica del Ti depende de la composición química de la superficie y de la capacidad de los óxidos de titanio para absorber moléculas e incorporar elementos. La topografía de la superficie juega un papel fundamental en la regulación del comportamiento celular por ejemplo en la forma, orientación y adhesión de las células [19].

Entre los clásicos tratamientos biomineralizantes de metales que promueven la osteointegración se destacan el blastinizado, el anodizado por plasma químico y el tratamiento alcalino en NaOH con un posterior tratamiento térmico a alta temperatura.

1.5.1 Blastinizado

Se han desarrollado varios tratamientos para generar modificaciones en la topografía superficial, estas modificaciones reducen los periodos de inducción del crecimiento óseo a partir de una mejora en la adhesión de los osteoblastos en la superficie del implante. Se ha demostrado que los implantes altamente rugosos favorecen el anclaje mecánico y la fijación primaria al hueso [35]. Wennerberg y colaboradores [36], demostraron que la fuerza de torsión aumenta con la rugosidad superficial, confirmando que el endurecimiento superficial incrementa la fijación mecánica de los implantes dentales de titanio al hueso.

Uno de los métodos para modificar la rugosidad superficial de los implantes de titanio consiste en el blastinizado con partículas cerámicas. El blastinizado es un método de modificación sustractivo mecánico en el cual se utilizan pequeñas partículas, las cuales son propulsadas por una corriente de aire que impacta en la

superficie, a una presión y tiempos determinados. La magnitud de la modificación superficial depende de los parámetros del proceso: tamaño, composición y forma de la partícula, presión y tiempo de blastinizado [37], [38]. La rugosidad como la morfología de la superficie influyen en el comportamiento celular (proliferación, diferenciación celular, síntesis de la matriz extracelular, forma celular, etc.). La adherencia de las células a la superficie del implante es necesaria para que la célula reciba las señales biológicas que permiten su proliferación y la migración a toda la superficie por osteoconductividad [39]. Implantes blastinizados con valores de rugosidad promedio de S_a de 1-2 μm han demostrado los mejores resultados clínicos. [40], [41], mejorando el contacto hueso-implante y aumentando los valores de torque de extracción [42]. Las partículas utilizadas en el proceso deben ser químicamente estables, biocompatibles y no deben influir en el proceso de osteointegración. En general, se utilizan partículas de óxido de titanio (TiO_2), sílice (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3) de distintos tamaños y formas [43]–[45]. Sin embargo, el material de blastinizado a menudo queda incrustado en la superficie del implante, estos residuos se mantienen incluso después de las limpiezas ultrasónicas, el grabado ácido y la esterilización. La alúmina es insoluble en soluciones ácidas, por lo tanto, es difícil de eliminar de la superficie de los implantes de titanio. Se ha demostrado que la liberación de estas partículas no biocompatibles provoca reacciones adversas en el medio biológico [46], además, la heterogeneidad química de la superficie puede disminuir la excelente resistencia a la corrosión del titanio en el entorno biológico. Por esta razón, se han empezado a utilizar partículas biocompatibles, osteoconductoras y reabsorbibles que contienen calcio y fósforo (hidroxiapatita, fosfato b-tricalcico y mezclas), que no comprometen la interacción del implante con el tejido [47]. Estos materiales son reabsorbibles, logrando superficies limpias, rugosas y puras. Estudios experimentales han demostrado un mayor contacto hueso-implante de superficies

blastinizadas con partículas biocompatibles, en comparación con las superficies mecanizadas[48], [49] y un contacto BIC (*Bone-to-Implant Contact, BIC*) similar al observado en otras superficies blastinizadas con Al_2O_3 y TiO_2 que han osteointegrado [50].

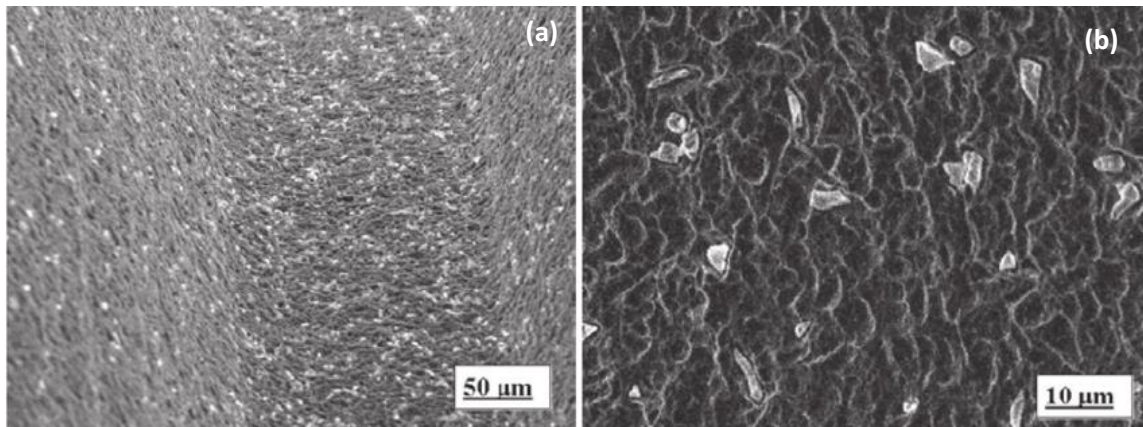


Figura 1.5.1.1. Micrografías SEM de superficies de titanio blastinizadas (Cortesía de AstratechTiOblastTM, Francia). a) Superficie blastinizada con partículas de Al_2O_3 , b) Superficie blastinizada con partículas de TiO_2 . En ambas figuras se observan partículas incrustadas en la superficie del implante.

El tratamiento de blastinado aumenta la rugosidad superficial, induciendo tensiones superficiales residuales de compresión en los implantes dentales [51], pero no acelera la capacidad de osteointegración por sí solo. Se ha demostrado que la acción combinada de un tratamiento de blastinado, tratamiento alcalino y un tratamiento térmico genera una superficie bioactiva [52]. Otros estudios revelaron que superficies de implantes blastinizadas y tratadas termoquímicamente mejoraban la adhesión y diferenciación de osteoblastos humanos, aunque eran necesarios cambios para prevenir la colonización bacteriana [53], [54], las superficies rugosas presentan mayor capacidad de colonización bacteriana que superficies lisas [55].

1.5.2 Anodizado por Plasma Químico

El tratamiento de anodizado por plasma químico (APQ), también conocido como proceso MAO (sus siglas en inglés, *Micro Arc Oxidation*); es un proceso

electroquímico que permite la formación de recubrimientos biocerámicos sobre superficies metálicas durante la ruptura dieléctrica de la capa de óxido aislante de un metal “válvula” (Ti, Al y sus aleaciones). La morfología, estructura y composición química de las capas de óxido de titanio resultantes dependerán de los tipos de electrolitos (solventes orgánicos o de base acuosa) y regímenes electroquímicos utilizados. Durante el proceso de APQ se incorporan a la capa cerámica los constituyentes del electrolito, produciendo películas cristalinas y amorfas [56]. Se ha informado que la utilización de electrolitos que contengan Ca y P pueden cristalizar en fosfato de calcio o incluso formar directamente una apatita superficial (bioactiva)[57], [58], favoreciendo el crecimiento celular y mejorando la aposición ósea en la superficie del implante [19].

El proceso de anodizado por plasma químico se utiliza para sintetizar una película de óxido de titanio TiO_2 en forma natural. Este proceso puede llevarse a cabo bajo dos condiciones electroquímicas: galvanoestáticas o potencioestáticas. El proceso de APQ consta de tres fases [56]:

- I. **Fase de anodizado.**
- II. **Ruptura dieléctrica de la capa de óxido pasiva.**
- III. **Crecimiento del recubrimiento.**

La primera fase se desarrolla entre los primeros 10 a 30 segundos de iniciado el proceso; en esta fase se forma la capa de óxido sobre la superficie del ánodo, se produce una caída de tensión ya que esta película de óxido actúa como barrera dieléctrica. Durante la formación de la película de óxido anódica, esta se enriquece con los elementos presentes en el electrolito [59], además de la generación de burbujas de gas. En esta etapa del proceso, la intensidad del campo eléctrico es muy cercana a la intensidad límite del campo eléctrico, produciendo de esta manera la ruptura dieléctrica de la capa de óxido. Durante el intervalo de tiempo

que precede a la ruptura dieléctrica, los metales forman capas coloreadas. Se obtiene un recubrimiento no uniforme, esta heterogeneidad de la superficie se debe a que existen puntos donde la barrera dieléctrica es más débil, consecuencia de la presencia de grietas, defectos y variaciones de espesores. La ruptura dieléctrica de la película de óxido (fase II), se produce cuando la corriente de electrones alcanza localmente una densidad de corriente crítica superando la rigidez eléctrica, en dichos puntos débiles. El inicio de la ruptura dieléctrica se caracteriza por un sonido de crujido, en resonancia con la aparición de chispas. La duración de este fenómeno es de 10^{-4} segundos, con una densidad de chispas por unidad de superficie de aproximadamente 105 chispas /cm². El número de chispas se incrementa con el tiempo hasta que la superficie se cubre con una capa de óxido anódico de aproximadamente 3 μm de espesor. Cada punto donde ocurre la ruptura dieléctrica puede considerarse como un ánodo parcial, estos puntos son pequeñas áreas que son atravesadas por un flujo de densidad de corriente extremadamente elevado. Los iones presentes en el electrolito se alojan en estos sitios donde ocurrió la ruptura dieléctrica. La temperatura local del ánodo parcial puede variar entre 1750 y 7700 °C (origen de las chispas, la energía liberada durante la ruptura dieléctrica produce una fusión localizada con una posterior oxidación generando de esta manera un nuevo óxido con un espesor de alrededor de 1 μm . Producto de la fusión y temple a la temperatura del electrolito en los puntos donde ocurre la ruptura dieléctrica de la capa de óxido, se generan tensiones térmicas en la capa anodizada que debilitan la capa de óxido, permitiendo nuevas rupturas dieléctricas en zonas vecinas. El proceso se repite espontáneamente hasta que la superficie presenta una nueva película de óxido (fase III); las capas superficiales pueden estar compuestas de las fases cristalinas: rutilo, anatasa o rutilo/anatasa, enriquecidas con constituyentes del electrolito [19].

La película de óxido anódica generada se compone de distintas partes; la parte externa presenta una porosidad con estructuras interconectadas que se solapan. El diámetro de los poros varía de acuerdo con los parámetros del proceso, se pueden encontrar poros que van de 200 nm a 2-3 μm . El recubrimiento se vuelve cada vez más compacto al ir hacia la interfaz con el sustrato, los espesores de recubrimiento pueden oscilar entre 1 a 10 μm [60]. En la figura 1.5.2.1 se puede observar el recubrimiento cerámico poroso generado luego del proceso de anodizado por plasma químico.

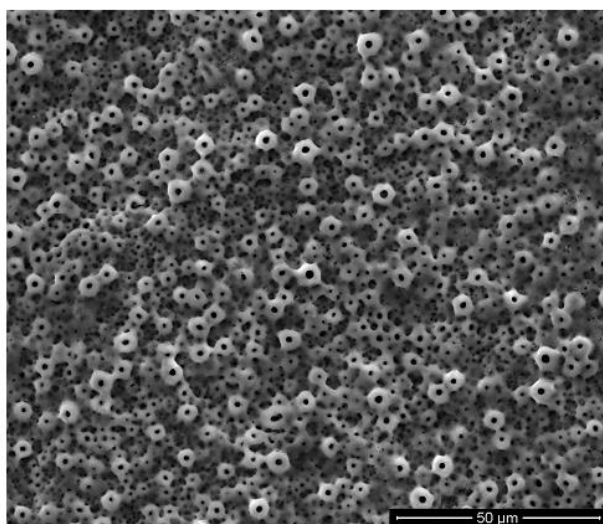


Figura 1.5.2.1. Micrografía SEM de una muestra de Ti cp tratada superficialmente mediante el proceso de APQ, se observa una estructura porosa característica del proceso.

Las superficies anodizadas por plasma químico presentan mejores comportamientos tribológicos con respecto a recubrimientos de PVD (sus siglas en inglés, *Physical Vapor Deposition*); éste buen comportamiento se relaciona principalmente a los superiores espesores que pueden obtenerse mediante este proceso [19]. Se han informado mejores tasas de osteointegración con respecto a superficies mecanizadas; se propusieron dos mecanismos para explicar esta mejora: el enclavamiento mecánico a partir del crecimiento óseo en los poros y el enlace bioquímico [43], [61].

1.5.3 Tratamiento Alcalino

El titanio cp y sus aleaciones forman espontáneamente una capa de apatita en su superficie cuando son inmersos en el entorno corporal, uniéndose al hueso vivo a través de esta capa de apatita cuando previamente han sido sometidos a un tratamiento alcalino y un posterior tratamiento térmico a alta temperatura. Kim y colaboradores [62], introdujeron por primera vez un tratamiento alcalino y térmico para mejorar la bioactividad. El tratamiento consiste en sumergir los materiales en una solución de NaOH o KOH, utilizando concentraciones que pueden variar entre 5-10M [62], [63]. Los tiempos de inmersión pueden variar de 1-24 h, siendo el más utilizado el de 24 horas y temperaturas de tratamiento que se encuentran entre 30 y 60 °C. El tratamiento químico alcalino induce la formación de un hidrogel de titanato de sodio amorfo con una morfología de nanoesponja en la superficie del titanio, que favorece notablemente la bioactividad del implante [64], [65]. El espesor del hidrogel de titanato de sodio se incrementa con el aumento de la concentración de NaOH así como también con el aumento del tiempo de inmersión en NaOH, sin embargo, se ve poco afectado por la temperatura del tratamiento alcalino [63]. Como la capa de hidrogel de titanato de sodio formada es demasiado inestable para usos prácticos; se prefiere estabilizar la misma a partir de un tratamiento térmico a alta temperatura (400-800 °C). Durante el tratamiento térmico el hidrogel se deshidrata y se densifica para formar una capa de titanato de sodio estable, con partes amorfas y cristalinas [62]. En la figura 1.5.3.1 se puede observar la estructura nanoporosa producto del tratamiento alcalino.

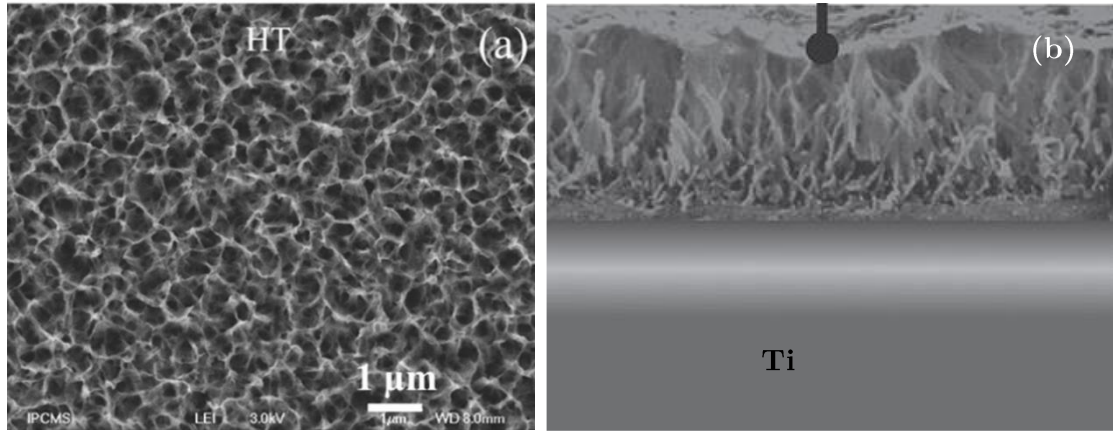
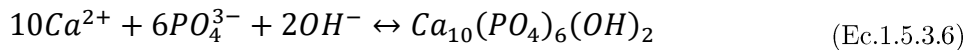
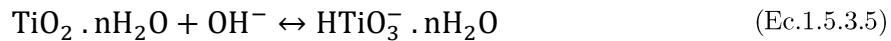
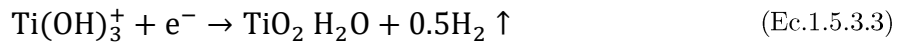
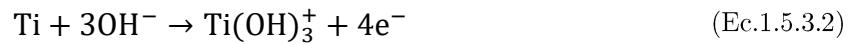


Figura 1.5.3.1. a) Micrografía SEM de una muestra de Ti cp tratada superficialmente en 5 M NaOH a 60°C por 72 h y con un tratamiento térmico a 630° durante 1 hora en una atmosfera de aire [66]. b) Corte transversal de una muestra de Ti tratada superficialmente en 5 M en NaOH a 60 °C durante 24 h y con un posterior tratamiento térmico a 600 °C durante 1 hora [67].

A continuación, se presenta la descripción del mecanismo propuesto por Kim y colaboradores [62] para la formación de apatita en las superficies de titanio tratadas con NaOH y sometidas a un tratamiento térmico posterior al entrar en contacto con fluidos biológicos.



Durante el tratamiento alcalino, la película pasiva de TiO_2 se disuelve parcialmente en la solución producto del ataque corrosivo de los grupos hidroxilos; se supone que esta reacción se produce en simultáneo con la hidratación del Ti metálico. Un ataque adicional de los grupos hidroxilos al TiO_2 hidratado producirá hidratos cargados negativamente en las superficies de los sustratos metálicos. Estas especies cargadas negativamente se combinan con los iones alcalinos de la solución acuosa, dando como resultado una capa de hidrogel de titanato alcalino.

Incluso el Ti cp sometido solo a un tratamiento alcalino forma apatita en su superficie, dado que el hidrogel de titanato alcalino también se transforma fácilmente en hidrogel de TiO_2 a través de la liberación del álcali. Como la capa de hidrogel de titanato alcalino formada es demasiado inestable para uso práctico, un posterior tratamiento térmico a alta temperatura permite la formación de una capa de titanato alcalino más estable en la superficie del titanio [62], [63].

CAPITULO 2

TECNICAS DE CARACTERIZACION SUPERFICIAL

El estudio de las propiedades superficiales de los biomateriales desempeña un papel directo en el éxito o fracaso de los implantes dentales. Por lo tanto, es crucial emplear técnicas analíticas de caracterización de superficies para mostrar propiedades fundamentales como la química superficial, la topografía, la hidrofiliidad/hidrofobicidad, entre otras. En general, se recomienda utilizar una combinación de técnicas de caracterización, ya que esto permite un estudio más integral y proporciona una información más completa sobre las propiedades superficiales. Realizar el análisis de la superficie desde diversas perspectivas enriquece las evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

El conocimiento de la estructura y composición a nivel micro y nanométrico es esencial para comprender el impacto que genera en las propiedades químicas, físicas, mecánicas y biológicas de los materiales [68], [69]. Las técnicas de difracción de rayos X (XRD), Raman, FTIR y SEM-EDS son herramientas clave para develar información estructural en materiales a escala atómica. Estas técnicas, son prácticamente no invasivas, lo que las convierte en herramientas muy útiles para la investigación de biomateriales. Proporcionan información valiosa sobre la estructura y composición de los materiales a nivel micro y nanométrico, lo cual contribuye a la comprensión de sus propiedades y a la optimización de su diseño para aplicaciones biomédicas [68], [69].

2.1. Técnicas de Caracterización

2.1.1. Difracción de Rayos X

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas con longitudes de onda en el rango de 0.01 a 10 nm. Las longitudes de onda de los rayos X utilizados en la difracción

suelen ser del orden de 0.1 a 1 Å, del mismo orden de magnitud que las distancias interatómicas en los cristales, lo que permite obtener información detallada sobre la disposición atómica en la muestra [70]. La técnica de difracción de rayos X se fundamenta en la premisa de que cada sólido cristalino exhibe un espectro de difracción característico, posibilitando la identificación de fases, la determinación del tamaño del cristal, la orientación cristalográfica, así como el orden y la separación entre átomos en sólidos cristalinos. El espectro de difracción se genera al dirigir un haz de rayos X monocromático hacia la superficie de un material cristalino, dando lugar a eventos de dispersión elástica, algunos constructivos y otros destructivos. Las dispersiones constructivas siguen la ley de Bragg (Ec.2.1.1.1), lo que posibilita el cálculo del espaciado interplanar "d" entre los planos atómicos del material en estudio.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Ec. 2.1.1.1})$$

En esta ecuación, λ representa la longitud de onda de la radiación, n es el número de longitudes de onda, d denota el espaciado entre los planos atómicos, y θ es el ángulo entre el haz de rayos X difractado o incidente y el plano cristalino. La distancia entre los planos está vinculada a las dimensiones de la celda unidad del cristal, mientras que la intensidad del haz de rayos X difractado depende de la disposición y el tipo de átomos presentes en la celda unidad. Según esta ley, al emplear una longitud de onda específica, cada conjunto de planos difractará el haz incidente a un ángulo característico, dando como resultado un patrón de difracción distintivo. [68]. Un material cristalino exhibe picos distintivos en ángulos específicos, los cuales son representativos de la estructura cristalina única del material. En contraste, un material completamente amorfo presentará picos amplios que se extenderán a través de varios ángulos de dispersión. [7].

2.1.2. Espectroscopía FT-IR

La región infrarroja (IR) del espectro electromagnético abarca la radiación con un número de onda que va desde 12800 cm^{-1} hasta 10 cm^{-1} , o longitudes de onda que oscilan entre $0,78\text{ }\mu\text{m}$ y $1000\text{ }\mu\text{m}$ (figura 2.1.2.1). Se divide en tres regiones principales: el infrarrojo cercano (NIR), el infrarrojo medio (MIR) y el infrarrojo lejano (FIR).

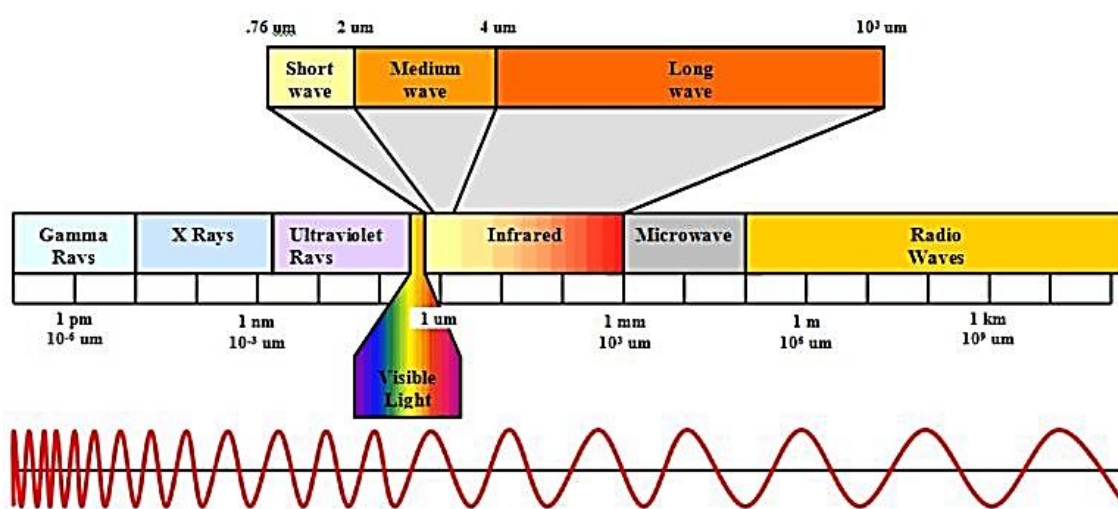


Figura 2.1.2.1. Representación integral de las diversas longitudes de onda de la radiación electromagnética, se destacan las regiones correspondientes a la radiación IR y UV [71].

La espectroscopia infrarroja ha experimentado avances significativos gracias a la aplicación de interferómetros y el algoritmo de transformada de Fourier. La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que utiliza radiación en la región del infrarrojo medio para obtener espectros de absorción, permitiendo la identificación de compuestos y el estudio de la composición de una muestra. El método se basa en la alteración de los niveles vibracionales y rotacionales de los enlaces presentes en el analito debido a la absorción de radiación infrarroja a longitudes de onda específicas. Para que el analito interactúe y absorba parte de la radiación incidente, las moléculas en la muestra deben experimentar un cambio neto en el

momento dipolar, resultado de su movimiento vibratorio o rotacional. Cuando la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de los modos vibracionales de la molécula, se produce una transferencia neta de energía (absorción de radiación por parte de la muestra), generando un cambio en la amplitud de la vibración molecular. De manera similar, se producen cambios periódicos en el momento dipolar debido a la rotación de las moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa [69], [72].

Diversos métodos de reflexión facilitan la obtención de espectros infrarrojos de muestras que no permiten la transmisión de la luz, como películas opacas o superficies sólidas. Algunos de estos métodos incluyen la reflectancia total atenuada (ATR), la reflectancia difusa y la reflectancia especular. El método de ATR emplea un material cristalino transparente con un alto índice de refracción que se coloca en contacto con la muestra para inducir el fenómeno de reflexión total interna. Inicialmente, el haz incidente atraviesa el cristal y penetra en el analito en forma de onda evanescente (en las longitudes de onda donde la muestra absorbe esta radiación evanescente, se produce una atenuación del haz denominada reflectancia total atenuada). Después de diversos eventos de reflexión y atenuación, el haz alcanza el detector, donde se analiza para construir el espectro con una profundidad de muestreo de aproximadamente 5mm. El método ATR posibilita mediciones rápidas y reproducibles, constituye una técnica no destructiva y requiere una preparación mínima de la muestra.[69], [73]

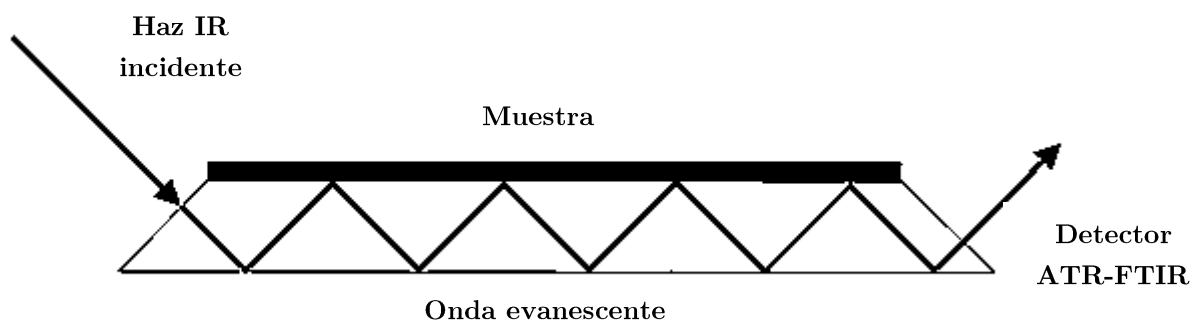


Figura 2.1.2.2. Diagrama esquemático de la técnica ATR-FTIR [69].

2.1.3. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman, es una de las herramientas que permite investigar la química superficial de los materiales, comparte similitudes con la espectroscopía infrarroja (IR) al clasificarse como una técnica de espectroscopía vibracional molecular. Su base en la polarización contrasta con la espectroscopía IR, que se enfoca en momentos dipolares, y ambas se complementan mutuamente. La espectroscopía Raman a menudo revela modos vibracionales no observados por IR o produce bandas de absorción débiles en IR. Su versatilidad se destaca al abarcar longitudes de onda de excitación desde ultravioleta hasta el infrarrojo cercano [69]. La sensibilidad superficial de la espectroscopía Raman, vinculada a la longitud de onda de excitación (donde la luz más corta penetra menos profundamente), se ve influenciada por las propiedades particulares del material. Modernos instrumentos Raman, especialmente los microscopio del tipo confocal, mejoran la resolución espacial y eliminan la fluorescencia. La interpretación de los espectros Raman suele basarse en manuales especializados y en trabajos de investigación [69].

Cuando una partícula cuántica de luz con energía $h\nu_0$ impacta sobre una superficie, desencadena un fenómeno de dispersión elástica conocido como dispersión de Rayleigh, que exhibe la mayor probabilidad de ocurrencia. No obstante, también se dan procesos de dispersión inelástica en los cuales la energía

vibracional se ve alterada debido a la interacción con partículas de energía $h\nu_s$. Este fenómeno inelástico se denomina dispersión Raman e implica una diferencia de energía entre $h\nu_0$ y $h\nu_s$ [69], [74].

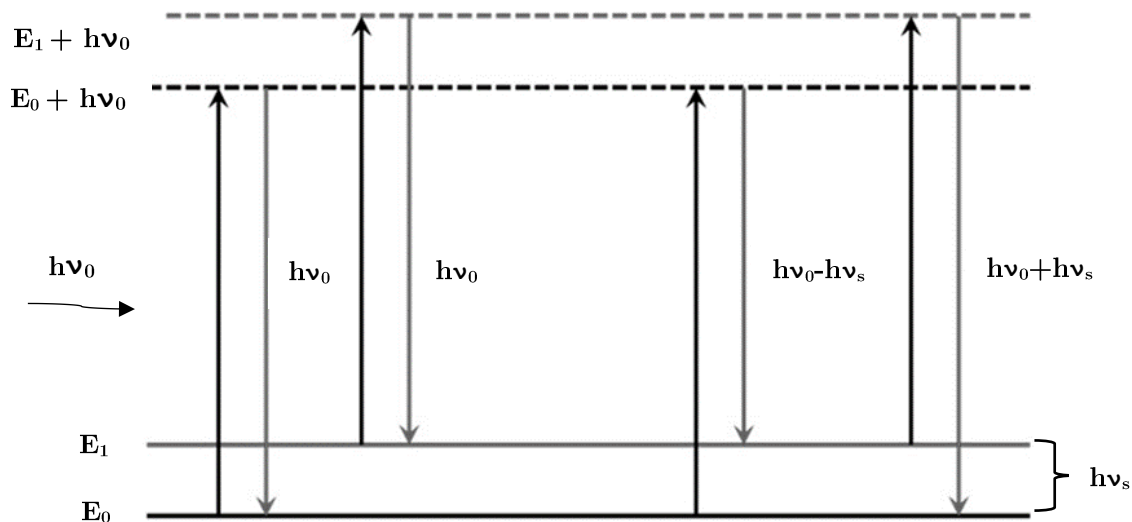


Figura 2.1.3.1 Diagrama esquemático del principio de dispersión Raman [69].

En el fenómeno de dispersión Raman, cuando la radiación incidente es absorbida por un estado electrónico virtual de una molécula, seguido de una emisión que devuelve la molécula a su estado vibratorio excitado, se produce una energía emitida equivalente a la diferencia entre $h\nu_0$ y $h\nu_s$, las líneas Raman resultantes se conocen como líneas de Stokes. En contraste, cuando la vibración molecular ya se encuentra en el estado excitado y emite al retornar al estado fundamental, la energía emitida es igual a la suma de $h\nu_0$ y $h\nu_s$ y las líneas Raman se denominan líneas anti-Stokes. Debido a que la población de moléculas en el estado vibratorio excitado es significativamente menor que la del estado fundamental a temperatura ambiente, las líneas de Stokes son mucho más intensas que las líneas anti-Stokes. Por lo tanto, en la práctica, se registra y analiza comúnmente únicamente las líneas de Stokes en los espectros Raman [69], [74].

2.1.4. SEM-EDS

El microscopio electrónico de barrido (MEB), también conocido como SEM (por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscope*), permite la caracterización superficial de sólidos y la observación a escala micrométrica gracias a su excelente resolución (de 20 Å a 50 Å) y a su amplia profundidad de foco de 100 a 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico convencional. Los elementos principales de un SEM incluyen el sistema de vacío, la fuente y la columna de electrones, la cámara de muestra, el sistema de adquisición y procesamiento de imágenes.

Para generar imágenes a partir de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se enfoca un haz de electrones (haz incidente) hacia la superficie de una muestra sólida. Los electrones son acelerados hasta un voltaje de hasta 30kV, un par de lentes condensadoras (bobinas electromagnéticas) demagnifican el haz en una cantidad determinada en función de la corriente aplicada y las lentes objetivo concentran el haz hasta alcanzar una sección mínima (1 a 500 nm). El escaneo de la muestra por el haz de electrones y la consecuente proyección de la imagen en la pantalla del monitor se logra a partir del uso de un par de bobinas de deflexión electromagnéticas. Las señales generadas desde la superficie de la muestra son capturadas por detectores, se codifican y almacenan en formato digital. Posteriormente, la reconstrucción de la imagen se lleva a cabo mediante el procesamiento de la información recibida, presentándose en la pantalla del monitor en una escala de grises.[68], [69]. En la figura 2.1.4.1 se puede observar un diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido.

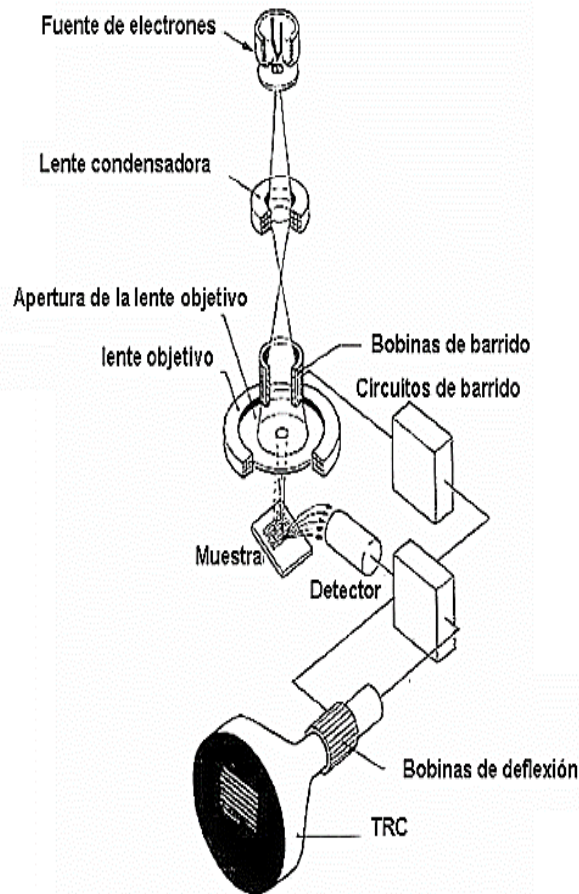


Figura 2.1.4.1. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido.

Las interacciones resultantes entre el haz incidente y la muestra producen varios tipos de señales, siendo las más relevantes para esta técnica [68], [69].

- **Electrones retrodispersados:** se trata de electrones provenientes del haz incidente que experimentan una desviación elástica en su trayectoria debido al intenso campo Coulombiano cerca del núcleo de los átomos de la muestra.

Los electrones retrodispersados son de alta energía y poseen una dependencia con el número atómico de la muestra, por lo que permiten obtener imágenes con contraste por número atómico.

- **Electrones secundarios:** son electrones provenientes de los niveles de valencia de los átomos de la muestra que, al interactuar inelásticamente con

el haz incidente, obtienen la energía necesaria para ser expulsados como electrones secundarios de baja energía (<50eV). La señal de electrones secundarios es fundamental para la creación de imágenes topográficas de alta resolución, estos electrones provienen de una capa delgada de la superficie de la muestra.

2.1.4.1. Espectrómetro dispersivo en energías (EDS).

Los Microscopios Electrónicos de Barrido (MEB) generalmente vienen equipados de un espectrómetro dispersivo en energías de rayos X (EDS), para realizar un análisis químico cualitativo y semicuantitativo de la muestra en estudio. Los rayos X característicos son producto de la interacción inelástica entre los electrones incidentes del haz primario y los electrones de las capas internas de los átomos de la muestra, lo que resulta en la eyección de estos últimos, creando así vacancias. Como consecuencia de esta interacción, los electrones de los niveles energéticos superiores decaen, emitiendo fotones que son característicos de la transición radiativa correspondiente. Los fotones que logran salir de la muestra son capturados por el detector, y a partir de ellos se generan espectros de rayos X que relacionan la distribución de energías con la intensidad de la señal recibida, o mapeos cuando se vinculan con una imagen de SEM [75].

2.1.4.2. Rugosidad

La combinación de la microscopía electrónica de barrido y técnicas estereoscópicas posibilita la caracterización topográfica de superficies. La técnica estereometría es un método de medición no invasivo que se basa en el análisis de imágenes estereoscópicas. A través de un par de imágenes obtenidas con ángulos de inclinación diferentes y mediante el procesamiento con software especializado, se puede cuantificar la rugosidad de la superficie de diversos tipos de muestras.

La topografía superficial generalmente se describe como una sucesión de picos y valles, que puede cuantificarse utilizando parámetros de rugosidad. Debido a que

existe una gran variedad de parámetros que pueden ser utilizados, la correcta elección de los parámetros más significativos dependerá de las características de la superficie y del objetivo del estudio realizado [76], [77].

Se ha demostrado que la rugosidad es una de las propiedades superficiales que afecta la osteointegración de los implantes dentales [44], [78], [79] y puede clasificarse en tres grupos principales: macrorugosidad (100 micrómetros-milímetros), microrugosidad (100 nm-100 micrómetros) y nanorugosidad (<100 nm). De los distintos niveles de rugosidad se conoce que la microrugosidad tiene una influencia específica en la respuesta celular [78], [79]. En el rango de la microrugosidad, las superficies altamente rugosas se definen cuando la desviación media aritmética de la topografía de la superficie (S_a) es mayor que $2 \mu\text{m}$, las moderadamente rugosas tienen valores de S_a de $1\text{-}2 \mu\text{m}$, superficies mínimamente rugosas con S_a de $0,5\text{-}1 \mu\text{m}$ y las superficies lisas tienen un S_a menor a $0,5 \mu\text{m}$ [44], [80]. Diversos estudios han demostrado que rugosidades moderadas de la superficie se han asociado con respuestas óseas in vitro e in vivo más fuertes [41], [44], [81]. Sin embargo, establecer un rango óptimo de rugosidad para la osteointegración de los implantes sigue siendo un desafío [82]. En la actualidad, los tratamientos superficiales realizados en implantes dentales generan un amplio rango de características de rugosidad superficial pero la mayoría de los fabricantes producen superficies moderadamente rugosas [83].

En los últimos años, se han empezado a incorporar otros parámetros de rugosidad además del S_a (R_a en el caso unidimensional) [83]–[85] debido a que el uso de este único parámetro no siempre permite una caracterización exhaustiva de la topografía superficial. En el presente trabajo, se analizó la variación de los parámetros de amplitud S_a , S_z , S_{ku} y S_{sk} , que proporcionan información de la geometría superficial y de los parámetros funcionales S_{bi} , S_{ci} y S_{vi} . Además, se realizó un análisis de las superficies mediante los parámetros D , d_{min} , d_{per} y Λ .

2.1.4.2.1 Dimensión Fractal

Consideremos una línea poligonal. Si corresponde a un segmento recto su dimensión es 1; si por el contrario es muy irregular, tenderá a llenar una porción del plano, cuya dimensión es 2. Partiendo de esta base, se define la dimensión fractal D como un número entre 1 y 2, que será mayor para perfiles más irregulares y menor para perfiles más uniformes. En la figura 2.1.4.2.1.1 se puede observar, a modo de ejemplo, un gráfico donde se muestran algunos perfiles topográficos y su dimensión fractal [126]. Extendiendo este concepto, la dimensión fractal de una superficie es un número entre 2 y 3, que será mayor para superficies más rugosas y menor para superficies más homogéneas. Se puede observar que las superficies con diferentes topografías que tienen el mismo valor de S_a tienen diferentes valores de dimensión fractal. La dimensión fractal describe la irregularidad superficial o la complejidad que no puede describirse por los parámetros de rugosidad utilizados para la caracterización cuantitativa de la superficie.

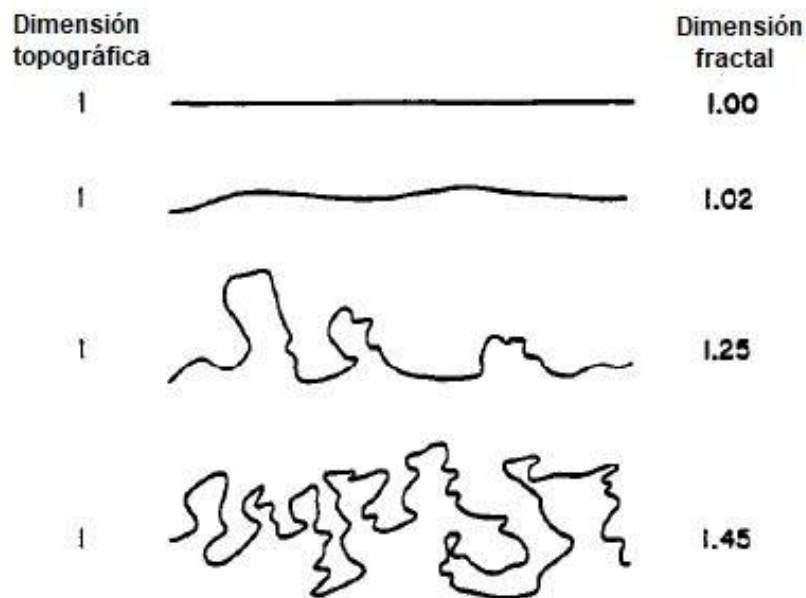


Figura 2.1.4.2.1.1. Perfiles topográficos y su correspondiente dimensión fractal [86].

2.1.4.2.2 *Topothesy*

Los tres parámetros D , d_{min} y d_{per} representan un análisis promedio de la imagen en una multiplicidad de direcciones y que no necesitan ser isotrópicas. La anisotropía permanece implícita en esos parámetros. La dimensión fractal es potencialmente adecuada para estudiar la textura de las imágenes en función del ángulo. La mayoría de las superficies rugosas presentan anisotropía en una o varias direcciones. Un parámetro fractal sensible a la anisotropía es el llamado *topothesy*.

El *topothesy* se ha utilizado como parámetro para caracterizar la anisotropía en el estudio de superficies rugosas a través de datos de altura y ha resultado ser más sensible a las anisotropías que la dimensión fractal. Para los datos de altura de un perfil fractal, la relación entre el parámetro *topothesy* y la varianza es:

$$V = \Lambda^{(2D-2)} S^{2(2-D)} \quad (\text{Ec. 2.1.4.2.2.1})$$

El parámetro Λ puede determinarse a partir de la pendiente y la intersección del variograma:

$$\Lambda = 10^{\text{intersección}/(2-\text{pendiente})} \quad (\text{Ec. 2.1.4.2.2.2})$$

Bonetto y colaboradores [87] han aplicado la Ec. 2.1.4.2.2.1 en el análisis de textura de imágenes digitales.

En la tabla 2.1.4.2.1 se muestran los parámetros analizados en este trabajo que se encuentran incluidos en el programa EZEImage y su significado [88]. Todos los parámetros, excepto S_a , se calcularon a partir de las alturas relativas al plano medio de cuadrados mínimos.

Generalmente, se utiliza el parámetro S_a para cuantificar la rugosidad ya que provee características estadísticas de alturas de la superficie y es útil para detectar

variaciones en la altura de la superficie general. Sin embargo, el uso de este único parámetro no siempre permite una buena evaluación de la rugosidad.

Para analizar la distribución de alturas se utilizan los parámetros Ssk y Sku. Para una superficie con topografía de distribución simétrica, de tipo gaussiano, el valor de Ssk es cero. Un gran nivel de asimetría se refleja en un mayor valor absoluto de este parámetro. Sku caracteriza el ancho de la distribución de las alturas, en el caso de una superficie con distribución topográfica gaussiana el valor es cercano a 3. Por otra parte, Sz describe características de altura máxima de la superficie [76].

En el caso de los parámetros funcionales (Sbi, Sci, Svi), éstos permiten describir características importantes para muchas aplicaciones específicas. Estos parámetros son índices que permiten comparar entre distintos tipos de superficies y procesos de manufactura ya que un valor alto o bajo de un índice es más fácil de interpretar en los procesos de fabricación que las cantidades físicas absolutas [76].

Tabla 2.1.4.2.1. Parámetros comúnmente utilizados en las medidas de rugosidad, provistos por el programa EZEImage.

Parámetro	Descripción
Sa	Desviación media aritmética de la topografía de la superficie (alturas relativas al plano que contiene el eje de inclinación de la muestra)
Ssk	Asimetría (Skewness) de la distribución de alturas de la topografía
Sku	Curtosis (Kurtosis) de la distribución de alturas de la topografía
Sz	Diez-puntos (Ten-point) de la topografía de la superficie (diferencia de altura entre el promedio de los cinco puntos de mayor altura y los cinco puntos de menor altura)
Sbi	Índice de contacto de la superficie
Sci	Índice de retención de líquido en el centro o núcleo
Svi	Índice de retención de líquido en el valle

Varios autores han demostrado la importancia del uso de los parámetros D y Λ para caracterizar la rugosidad de distintas superficies de ingeniería [89]–[94] ya que se complementan con los parámetros más tradicionales (como el S_a) y permiten analizar mejor las superficies. Por otro lado, Bonetto y Ladaga [87] sugirieron, además, el uso de los parámetros d_{per} y d_{min} para caracterizar la textura de imágenes de SEM junto a D y Λ [95], [96].

Existen infinidad de métodos para calcular D [97]. No obstante, en este trabajo se utilizó el método del variograma a partir del estudio de la textura de imágenes de SEM [87], [95], [96] a través del programa FERImage [98]. El método consiste en un gráfico logarítmico de la varianza de la variación del nivel de brillo (*brightness distribution*) de una imagen en función del paso, donde la pendiente del gráfico está relacionada con la dimensión fractal D , siendo $D = 3 - H$. Mediante la pendiente del gráfico, se puede obtener el valor H que varía entre 0 y 1 y, por lo tanto, D varía entre 2 (superficie plana) y 3 (superficie totalmente rugosa). La dimensión fractal describe la irregularidad superficial y los valores que varían entre 2 y 2,5 indican superficies suaves persistentes mientras que valores entre 2,5 y 3 corresponden a superficies antipersistentes siendo una superficie completamente rugosa cuando D es cercano a 3. En el caso particular donde $D = 2,5$ dicho valor corresponde a superficies brownianas [87], [95], [96].

Para muchas imágenes observadas con el SEM, el variograma presenta un comportamiento fractal a baja escala y un comportamiento que parece tener una tendencia asintótica a alta escala, pero si el eje vertical se expande, aparecen máximos y mínimos de varianza. Esta región periódica permite obtener el parámetro d_{min} y corresponde al extremo inferior de la región de la escala periódica y es representativo del tamaño de celda más pequeño con suficiente peso estadístico para producir períodos (d_{per}) [87], [95], [96]. En el caso del parámetro Λ , se utilizó para caracterizar la anisotropía de las superficies estudiadas en este

trabajo ya que se ha demostrado ser más sensible que la dimensión fractal [94], [95].

2.1.5. Mojabilidad

Las propiedades superficiales de los biomateriales desempeñan un papel crucial en las interacciones con los tejidos, y estas interacciones, a su vez, influyen significativamente en las respuestas del organismo a largo plazo. Por lo tanto, es importante obtener una comprensión detallada de las características específicas de las superficies y de las técnicas empleadas para evaluarlas. Este conocimiento es fundamental para el desarrollo de materiales más "biocompatibles", capaces de inducir respuestas celulares específicas o minimizar reacciones inflamatorias no deseadas.

Se ha observado que la energía superficial del biomaterial está estrechamente relacionada con las interacciones biológicas, como la adhesión celular. Esta energía de la superficie se puede cuantificar mediante el ángulo de contacto de una gota de líquido (θ) en la superficie del biomaterial. Geométricamente, el ángulo θ se define como el ángulo formado por la tangente en el punto de contacto entre las fases interactivas del líquido, el gas y el sólido. Experimentalmente, se mide trazando una línea tangente en el punto de contacto entre las fases líquida y sólida.

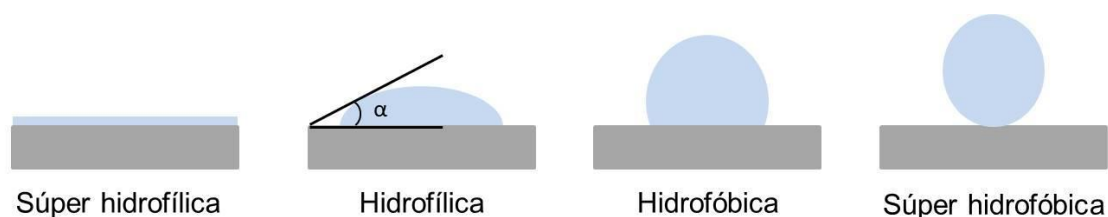


Figura 2.1.5.1. Representación gráfica del ángulo de contacto [99].

Dentro del contexto de la adhesión de proteínas o células, el objetivo principal de muchos tratamientos es ajustar la superficie para que se sitúe en un estado intermedio entre ser hidrofóbica y ser completamente hidrofílica. La medición del

ángulo de contacto proporciona una manera sencilla de determinar estos valores intermedios. Además, el ángulo de contacto refleja conceptos más profundos relacionados con la tensión y la energía superficial, incluyendo la unión química en las capas superficiales del biomaterial. Los valores del ángulo de contacto ofrecen una forma práctica de cuantificar esta unión, lo cual influye en aspectos como la capacidad de mojado, adhesión, limpieza de la superficie, el efecto de tratamientos superficiales y las propiedades de los recubrimientos. La capacidad de mojado es especialmente relevante en aplicaciones de biomateriales, ya que afecta al proceso real de interacción de la superficie con sustancias biológicas.

El ángulo de contacto es una medida cuantitativa de la capacidad de un líquido para extenderse o "mojar" una superficie sólida, como se muestra en la figura 2.1.5.1. Proporciona una evaluación de la humectación de un sólido por un líquido.

En consecuencia, el ángulo de contacto ofrece una evaluación directa de las interacciones entre el líquido, el gas (o, en algunos casos, otro líquido inmiscible) y las superficies sólidas. El método más común y práctico para medir el ángulo de contacto es el método de la gota sésil, que implica depositar una gota de líquido en la superficie sólida y medir el ángulo formado entre la línea de base de la gota y la tangente en el punto de contacto utilizando instrumentos ópticos. Este enfoque, conocido como "método de ángulo de contacto estático", resulta ideal para sólidos con propiedades variadas en diferentes superficies, así como en superficies curvas. Permite medir el ángulo promedio " θ " en función del tiempo a diferentes temperaturas.

En resumen, el ángulo de contacto es un método sencillo, preciso, confiable y económico utilizado para caracterizar las propiedades de superficie de biomateriales y prepararlos para aplicaciones específicas.

2.1.6. Ensayo de Adhesión Rockwell C

La prueba de indentación Rockwell C, según la norma VDI 3198 [100], es un ensayo destructivo desarrollado para evaluar la calidad adhesiva (cualitativa) de recubrimientos. El principio del método se basa en un indentador cónico de diamante que bajo carga penetra en la superficie del sustrato de estudio generando una deformación plástica localizada en el material, resultando en la fractura del recubrimiento. Uno de los requisitos que exige la técnica es que el espesor de la muestra sometida a prueba debe ser al menos 10 veces mayor que la profundidad de penetración. Las características y el volumen de la zona de fractura ofrecen información sobre la adhesión y fragilidad de la película. El método más específico para evaluar el comportamiento del recubrimiento luego del ensayo de adhesión es a partir de la utilización de microscopía electrónica de barrido (MEB). La combinación de la geometría de contacto con la carga transferida resulta en tensiones de corte en los extremos de la interfaz. La norma VDI 3198 define la calidad de adhesión en una escala que va desde HF1 a HF6 (Figura 2.1.6.1). Los recubrimientos bien adheridos al sustrato resisten estas tensiones de corte y previenen la delaminación circunferencial producto de la indentación (HF1 a HF4). En cambio, una delaminación significativa en las proximidades de la impresión indica una adhesión deficiente del recubrimiento al sustrato (HF5-HF6). La presencia de grietas radiales acompañadas por una delaminación deficiente revela la existencia de un recubrimiento fuertemente adherido al sustrato, aunque frágil.

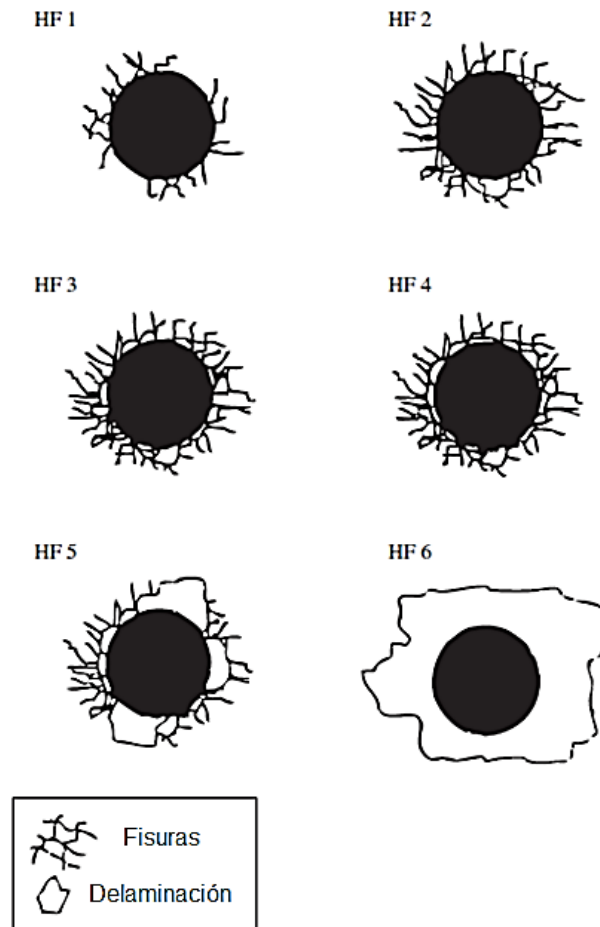


Figura 2.1.6.1. Clasificación de la calidad de adhesión según la norma VDI 3198 [100].

2.1.7. Potencial Z

El potencial zeta (ζ) describe el comportamiento de la carga en las superficies. Dicho comportamiento y la definición de potencial Z se explican utilizando el modelo de la doble capa electroquímica (DCE). La superficie sólida cargada provoca una distribución de carga interfacial que es diferente de la distribución de carga en la fase líquida. La carga superficial da lugar a un potencial superficial que decae al aumentar la distancia desde la superficie sólida. El modelo DCE distingue entre una capa estacionaria inmóvil y una difusa de contraiones que compensan la carga superficial.

En entornos acuosos, la mayoría de las superficies adquieren una carga de algún tipo. Las regiones cargadas o la disociación de grupos cargados en la superficie de un material provocan la atracción de iones hacia dicha superficie. Los iones más cercanos se ven fuertemente atraídos, dando lugar a la formación de la capa de Stern en la superficie del material en estudio. A mayor distancia de la superficie, los iones son atraídos hacia el material, pero no se encuentran fuertemente unidos y se intercambian con el resto de los iones en el medio. Esta capa intercambiable se conoce como capa difusa. El potencial zeta se define como la carga en un límite ficticio dentro de la capa difusa y se denomina plano de corte. Por lo tanto, el potencial zeta depende en gran medida tanto de la muestra como del medio en el que se encuentra inmerso [101].

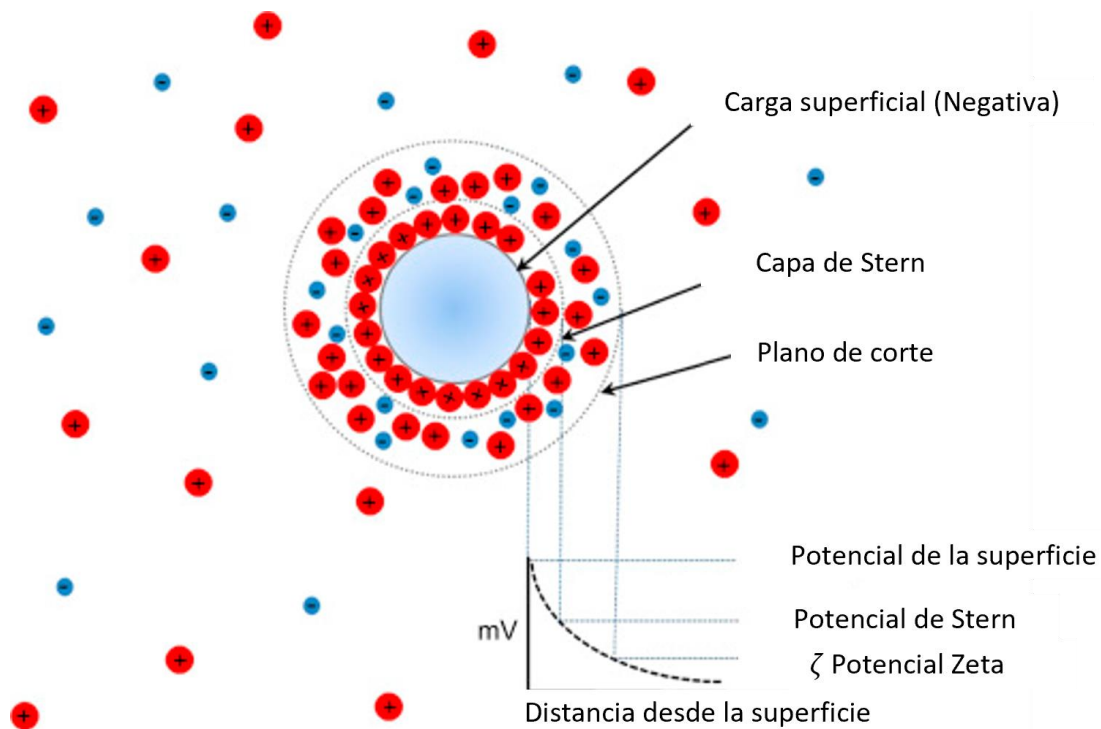


Figura 2.1.7.1. Representación gráfica de la definición de potencial Z (ζ) [102]

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 . Preparación de Muestras

Se utilizó como material de estudio muestras de Ti c.p. ASTM F67-06 Grado 4 (0.0039% N, 0.0112% C, 0.11% Fe, 0.24% O, 0.00% H, Ti bal), de 9 mm de diámetro por 6 mm de espesor. Todas las muestras se obtuvieron por mecanizado, con un lavado con detergente durante 60 minutos en una lavadora ultrasónica. A dichas muestras se le realizaron tratamientos de blastinizado, anodizado por plasma químico y un posterior tratamiento alcalino. En la Tabla 3.2.1.1 se presenta la nomenclatura de las muestras con los diferentes tratamientos.

3.2 . Tratamientos Superficiales

3.2.1 Blastinizado

Todas las muestras fueron expuestas a un tratamiento de blastinizado con partículas angulares de fosfato de calcio de 300 μm de diámetro, durante 2 min a una presión de 6 Bar. El procedimiento de limpieza constó de dos etapas; inicialmente se realizó un pasivado en 20% HNO_3 y luego un enjuague en agua destilada en lavadora ultrasónica.

3.2.2 Anodizado por Plasma Químico

Un grupo de muestras blastinizadas fueron sometidas a un tratamiento de oxidación anódica en una solución electrolítica de fosfato de calcio anhidro (CaHPO_4), acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), lauril éter sulfato de sodio, EDTA y NaOH por un período de 60 segundos desde la ruptura dieléctrica con un voltaje de 280 V.

3.2.3 Tratamiento Alcalino

Para el tratamiento alcalino se utilizó una solución acuosa 10M de hidróxido de sodio con una temperatura de tratamiento de 60 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de inmersión, las muestras se lavaron en agua bidestilada a 30 °C y luego fueron secadas durante 24 horas en un ambiente controlado de temperatura.

Tabla 3.2.3.1. Nomenclatura de las muestras blastinizadas, anodizadas por plasma químico y con tratamiento alcalino

Muestra	Tratamiento Superficial
B	Blastinado
BNa	Blastinado+ Tratamiento alcalino en NaOH
BAPQ	Blastinado+ Anodizado por Plasma Químico
BAPQNa	Blastinado+ Anodizado por Plasma Químico+ Tratamiento alcalino en NaOH

3.2.4 Tratamiento Térmico

Posteriormente a los tratamientos superficiales, los dos grupos de material del sustrato fueron tratados térmicamente durante 1 hora a alta temperatura en horno eléctrico marca Lindberg Argentina ($T_{\text{máx}}=1200$ °C, 15KW, 380V, 3 fases, 50 ciclos), las temperaturas utilizadas fueron 400°C, 600°C y 800 °C. El enfriamiento de las muestras se realizó en horno durante 24 horas, luego las muestras se conservaron en un ambiente controlado de temperatura para su posterior caracterización.

Tabla 3.2.4.1 Nomenclatura de las muestras tratadas térmicamente

Muestra	Tratamiento Superficial
BNa400	Blastinado+ Tratamiento alcalino en NaOH+ Tratamiento Térmico a 400 °C

BNa600	Blastinizado+ Tratamiento alcalino en NaOH+ Tratamiento Térmico a 600 °C
BNa800	Blastinizado+ Tratamiento alcalino en NaOH+ Tratamiento Térmico a 800 °C
BAPQNa400	Blastinizado+Anodizado por Plasma Químico+ Tratamiento alcalino en NaOH+ Tratamiento Térmico a 400 °C
BAPQNa600	Blastinizado+Anodizado por Plasma Químico+ Tratamiento alcalino en NaOH+ Tratamiento Térmico a 600 °C
BAPQNa800	Blastinizado+Anodizado por Plasma Químico+ Tratamiento alcalino en NaOH+ Tratamiento Térmico a 800 °C

3.3 . Caracterización

3.3.1. Topografía Superficial y Rugosidad

La topografía superficial se evaluó por medio de imágenes adquiridas a partir de un detector de electrones secundarios con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) FEI Quanta 250 con un voltaje de 20kV en modo alto vacío; instalado en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF-FIUNLP-CIC).

La rugosidad de la superficie se determinó utilizando la técnica de pares estéreo [88], [103]. Se obtuvieron quince pares estéreo de imágenes SEM, con un aumento de 1500X con un ángulo de inclinación de $\Delta\Phi=\pm 5^\circ$ a una distancia de trabajo de 10 mm y un voltaje de 20 kV. Las imágenes fueron procesadas para obtener los parámetros de rugosidad (S_q , S_a , S_z , S_{ku} y S_{sk} , S_{bi} , S_{ci} y S_{vi}) con el programa EZEImage [88].

3.3.2. Composición Superficial

La composición elemental se estudió con espectroscopia dispersiva en energías (EDS). La composición de las distintas fases presentes se evaluó con

espectroscopía Raman, espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier y Difracción de Rayos X.

La espectroscopia Raman se llevó a cabo en un espectrómetro Horiba Jobin Yvon T64000, en el Centro de Química Orgánica “Dr. Pedro J. Aymonino” CEQUINOR (CONICET-UNLP). Todos los espectros fueron adquiridos en el rango espectral de 100 a 1200 cm^{-1} utilizando la línea 514.5 nm de láser de Argón.

Las medidas de FTIR se realizaron en un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet 380 FT-IR, instalado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)- Grupo Nanomateriales Poliméricos (INIFTA-CONICET-UNLP). Para la obtención de los espectros se empleó un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) mono-reflección con un cristal de ZnSe; adquiriendo 128 barridos en el rango espectral entre 4000 y 650 cm^{-1} .

El análisis por Difracción de Rayos X se llevó a cabo en un difractómetro marca Philips modelo X’Pert con una fuente de 45 kV y 45 mA, instalado en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios (LANADI), perteneciente al Instituto de Física de La Plata. Para la adquisición de los datos se utilizó radiación $\text{CuK}\alpha$ (1,542 Å), con un paso de 0,02°, tiempo por paso de 2 segundos y un rango espectral de 20° a 70°.

El análisis EDS se realizó con un detector Oxford SDD X-Act con software AZTecOne en un FEI Quanta 250 ESEM a un voltaje de 20 kV.

3.3.3. Espesor de los recubrimientos

Las muestras se montaron en una resina polimérica en frío y a continuación se lijaron las probeta con papeles esmerilados de sucesivas granulometrías (grano 600,1000,1500 y 2000); se terminó la preparación mediante un pulido con pasta de diamante y alúmina. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada en

lavadora ultrasónica y se secaron con calor seco. Los espesores de las diferentes capas se midieron mediante imágenes de electrones retrodispersados con un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 ESEM a un voltaje de 15kV.

3.3.4. Ensayo de adhesión Rockwell C

La adhesión cualitativa de los recubrimientos al sustrato se determinó mediante el ensayo de indentación Rockwell C según VDI 3198 [100], utilizando un durómetro marca BSG DL 171 y un penetrador cónico de diamante con una punta de 200 μm de diámetro. La norma define la calidad de adhesión de los recubrimientos en una escala que va desde HF1 hasta HF6. En general, desde HF1 hasta HF4 se define una adherencia suficiente del recubrimiento al sustrato, mientras que para HF5 y HF6 representa una adherencia insuficiente del recubrimiento al sustrato (citar norma). De acuerdo con la simplicidad del ensayo, no fue necesaria una preparación previa de la superficie para la ejecución de las medidas de adhesión. Se realizaron tres medidas por cada muestra, entre medida y medida se tomó la precaución de limpiar la punta del penetrador para que no afectase la indentación siguiente. El análisis de los resultados y su evaluación con lo indicado por la norma VDI 3198 [100], se realizó mediante imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido.

3.3.5. . Potencial Zeta

Para poder evaluar el potencial Z superficial se utilizaron muestras de 4mm de diámetro por 1,5mm de espesor en una solución de SBF (sus siglas en inglés, *Simulated Body Fluid*) conteniendo partículas de látex de poliestireno como marcador. Las medidas fueron realizadas a 125, 250, 375, 500 y 625 μm distancia desde la superficie de cada muestra; se registraron cinco repeticiones por cada punto y las determinaciones se realizaron por duplicado. El equipo utilizado fue Zetasizer Nano (Nano ZSizer-ZEN3600, Malvern, U.K.), instalado en el Instituto

de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)-Plataforma de Servicios Científicos y Tecnológicos NanoBioSens

3.3.6. Mojabilidad

Se realizaron medidas de ángulo de contacto basados en el principio de la gota sésil, se utilizó agua como líquido de prueba a temperatura ambiente. La elección de agua como líquido de prueba se debe a que los fluidos fisiológicos son soluciones salinas acuosas, siendo el agua pura el líquido de prueba más comúnmente utilizado para medir la mojabilidad de la superficie de los biomateriales [104]. Se empleó un goniómetro Ramé-Hart Modelo 500 (Ramé-Hart Instrument co., EE. UU.) instalado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-CONICET-UNLP)-Área (Nano) Materiales Poliméricos. Las imágenes se obtuvieron utilizando el software DROPimage Advanced v2.2. Se realizaron trece determinaciones durante 12 segundos después de que se depositó la gota y se calculó el ángulo de contacto promedio.

3.3.7. Ensayo *in-vitro* en SBF

La respuesta bioactiva de las superficies se evaluó mediante la norma ISO-FIS 23317:2012(E)[16]. La concentración de iones de SBF es aproximadamente igual a la concentración de iones presente en el plasma humano [105]. Las muestras se sumergieron en solución SBF a 37 °C con un pH de 7,4 durante 3 días con un intercambio diario de la solución. Después de la inmersión en SBF, las muestras se lavaron en agua destilada y se secaron en un ambiente controlado de temperatura.

3.3.8. Ensayo *in-vitro* con células madre mesenquimales (CMM)

Se utilizaron células madre mesenquimales (CMM) obtenidas de pulpas dentales de terceros molares retenidos extraídos en el Hospital Universitario de la Facultad

de Odontología de la UNLP, según protocolo aprobado por el comité de Bioética, y procesados en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Odontológica de la Facultad de Odontología de la UNLP. Las células fueron utilizadas luego del pasaje número 3 (p3). Se utilizó como medio de crecimiento de las CMM DMEM/F12 con suero fetal bovino al 10% y antibióticos; se sembraron 20000 células/muestra y se incubaron durante 48 horas a 37°C en una atmósfera controlada con 95% de aire y 5% de CO₂ (Thermo Scientific Series 3 Water Jacketed). Para contrastar resultados se utilizó un control en placa de Petri de plástico. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se realizó la fijación en formaldehído al 10% y una posterior deshidratación en alcoholes al 30, 70, 96 y 100 %. La fijación y deshidratación de las CMM, se efectuó para la posterior caracterización del ensayo “*in-vitro*” mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

CAPITULO 4

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO ALCALINO EN LAS CARACTERISTICAS SUPERFICIALES Y BIOACTIVIDAD DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO BLASTINIZADOS Y ANODIZADOS POR PLASMA QUIMICO

En la actualidad, las investigaciones en el campo de la implantología dental se centran en el estudio y perfeccionamiento de la interfaz hueso/implante y tejido blando/implante. El éxito o fracaso de un implante en la cavidad oral dependerá del contacto directo que se desarrolle entre el hueso y el implante (osteointegración), y de la unión de los tejidos blandos que rodean la superficie, que actúan como un sello biológico frente al medio bucal externo evitando las enfermedades periimplantarias [37], [106]–[109]. Las propiedades superficiales (físicas, químicas, mecánicas y biológicas) de los biomateriales dentales influyen en los procesos de osteointegración como así también en el sello biológico desarrollado en la interfaz implante-tejido blando. Dentro de los procesos biológicos que se producen luego de la implantación, se considera que la etapa de adhesión celular es una de las más importantes para el desarrollo de una integración estructural y funcional entre la interfaz ósea y la superficie del implante. Las propiedades superficiales del implante pueden influir en la diferenciación y proliferación de las células adyacentes a la interfaz hueso-implante y en la regulación de los factores responsables de la expresión de genes asociados a la formación de matriz ósea. Se han investigado una variedad de modificaciones y recubrimientos superficiales para transformar la rugosidad, composición química, mojabilidad, carga/energía superficial y de esta manera estimular una respuesta biológica adecuada acelerando los procesos de osteointegración.

Hoy en día, como resultado de los estudios realizados por Branemark [8], el titanio es uno de los biomateriales más utilizados en la fabricación de implantes dentales. Presenta la mejor combinación de propiedades: biocompatibilidad, excelente resistencia a la corrosión, alto rendimiento mecánico y módulo de elasticidad relativamente bajo [110]. A pesar de esto, está ampliamente documentado que la película de TiO_2 formada en su superficie es bioinerte y promueve la aposición ósea (es decir, es osteoconductora), y en algunos casos el implante puede quedar encapsulado por tejido fibroso [111], [112]. Además, el titanio tiene un bajo rendimiento de fatiga por fricción y corrosión y puede liberar residuos de desgaste que producen inflamación del tejido circundante que causa osteólisis y, finalmente, la falla del implante [112].

Es importante utilizar materiales reactivos en la fabricación de implantes dentales que permitan una unión bioactiva con los tejidos vivos a través de reacciones físicas o químicas [113], logrando una rápida y excelente calidad de osteointegración [114], [115]. Por lo tanto, se han desarrollado diferentes tratamientos superficiales que transformen las superficies de los implantes de titanio de bioinertes a bioactivas [116]–[118].

Dentro de los tratamientos superficiales bioactivos más utilizados con resultados clínicos exitosos, se pueden mencionar el granallado o blastinizado, anodizado por plasma químico y el tratamiento alcalino. El blastinizado es un tratamiento sustractivo mecánico que aumenta la rugosidad superficial mediante la proyección presurizada de partículas sobre la superficie del implante [37]. Los materiales utilizados pueden ser SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 y partículas biocompatibles de fosfato de calcio comúnmente conocido como RBM (“*Resorbable Blast Media*”) [119], [120]. Aparicio y colaboradores [51] observaron que se producían cambios en la rugosidad durante el tratamiento y también se originaban diferencias en el

comportamiento electroquímico y en la resistencia a la corrosión; además, evidenciaron tensiones residuales de compresión inducidas por la proyección de las partículas utilizadas en el proceso. El tratamiento de anodizado por plasma químico es un tratamiento de anodizado utilizado para generar un recubrimiento cerámico bioactivo de óxido de titanio enriquecido en calcio y fósforo [121], [122]. El tratamiento alcalino es un tratamiento utilizado por ser económico y sencillo de realizar. El procedimiento consta en sumergir el implante de titanio en una solución de hidróxido de potasio o de sodio en condiciones de tiempo y temperatura determinados, formando una capa de hidrogel de titanato (sodio o potasio) nanoestructurada y bioactiva; adquiriendo condiciones favorables para la diferenciación celular [123], [124].

Sabiendo que el hueso es un material compuesto formado por hidroxiapatita y colágeno, se puede lograr una excelente osteointegración mediante un implante dental bioactivo donde se produce la precipitación y el crecimiento de hidroxiapatita en la superficie a partir del agua y los iones presentes en los fluidos biológicos. Kokubo y colaboradores, crearon el ensayo de bioactividad *in-vitro* [16] para evaluar la bioactividad de un implante dental a partir de la inmersión en un fluido corporal simulado acelular (SBF) en el que las concentraciones de iones y el pH son similares a las concentraciones de iones del plasma sanguíneo humano [125]. Este ensayo de bioactividad *in-vitro* se considera un requisito previo para estimar la unión implante-hueso; reduciendo considerablemente el número de animales y la duración de las pruebas *in vivo*[125]

En este capítulo se describen las tareas realizadas como parte del trabajo de tesis orientadas al estudio y a la comparación de las propiedades superficiales bioactivas obtenidas al realizar un tratamiento alcalino sobre dos superficies diferentes empleadas en la industria odontológica, blastinizado con partículas

biocompatibles (RBM) y anodizado por plasma químico (APQ). Las técnicas de caracterización utilizadas fueron SEM, EDS, Potencial Zeta, Espectroscopía Raman, Difracción de Rayos X, FTIR-ATR, Medición de Ángulo de Contacto y SBF.

4.1 . Resultados y Discusiones

4.1.1. Topografía superficial, composición y espesor

En la figura 4.1.1.1 se presenten las imágenes MEB de la topografía superficial de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa, del análisis de las distintas muestras, se evidencian marcadas diferencias en la topografía superficial y en la rugosidad. El tratamiento de blastinizado crea una superficie rugosa irregular con surcos, crestas, valles, etc; estas irregularidades también se aprecian en los perfiles transversales, señalando una severa deformación en la superficie (figura 4.1.1.2). Se ha comprobado que las superficies de Ti que fueron expuestas a tratamientos de blastinizado exhiben un aumento en la resistencia a la fatiga, producto del endurecimiento por deformación de la capa subsuperficial [126], mejorando la fijación de los implantes a largo plazo. La generación de microporos y nanoporos resultado de los tratamientos de anodizado por plasma químico y tratamiento alcalino en NaOH (figura 4.1.1.1), genera cambios en la morfología como en la composición superficial; estos cambios influyen en los eventos biológicos los cuales conducen a la aceptación del implante por parte del huésped, originando una más rápida osteointegración [123], [124].

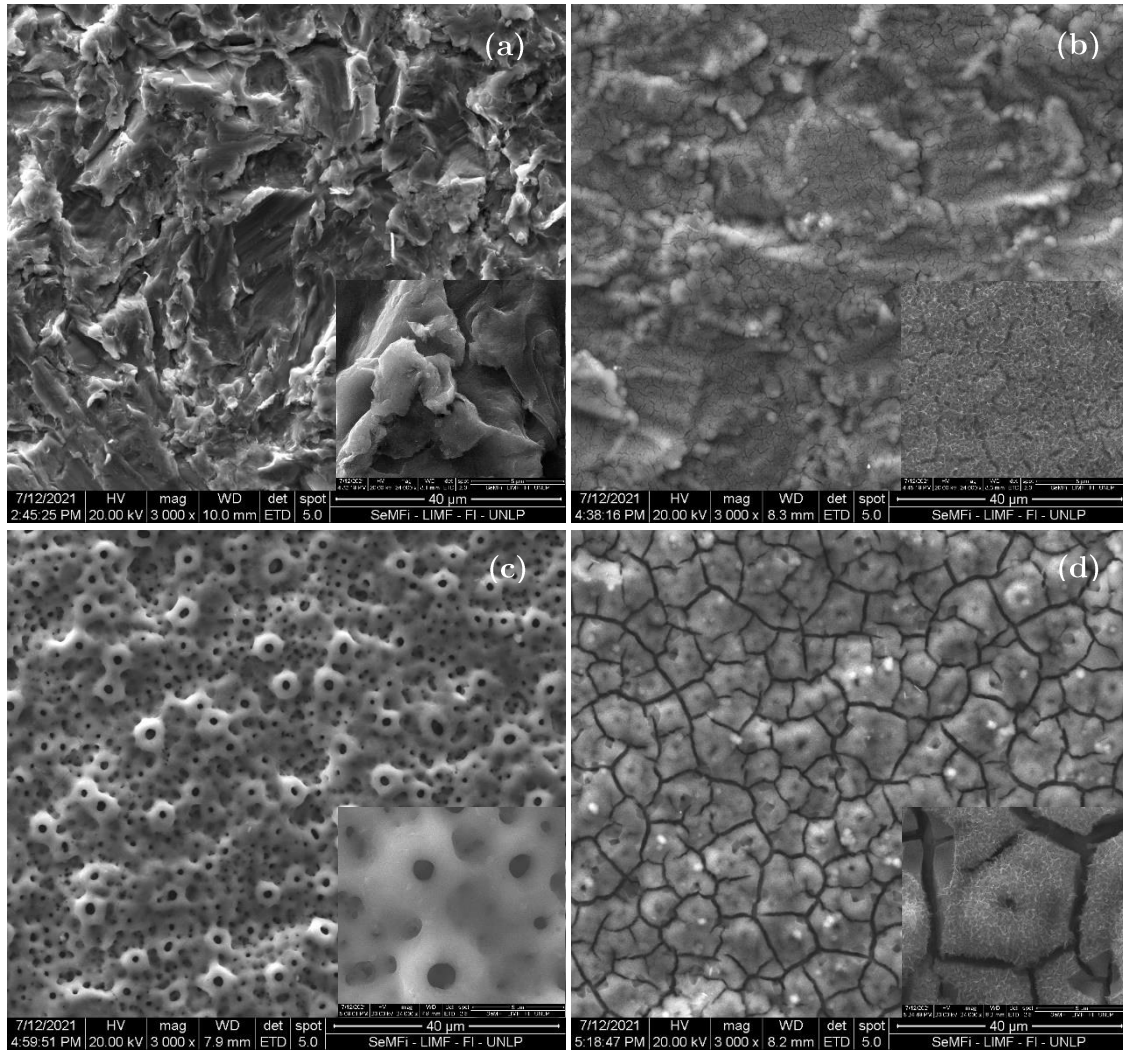


Figura 4.1.1.1. Imágenes MEB de la topografía superficial de las muestras B(a), BNa (b), BAPQ (c) y BAPQNa (d) (3000 y 24000 x). Las muestras BNa y BAPQNa, presentan una estructura de red nanoporosa con fisuras que recorren toda la superficie (hidrogel de titanato de sodio en la superficie del óxido de titanio).

Tabla 4.1.1.1. Porcentaje atómico y relación Ca/P de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa

Muestra	Ti (%at)	O (%at)	Ca (%at)	P (%at)	Na (%at)	Ca/P
B	77,82	21,59	0,13	0,46		0,28
BNa	31,23	63,48	0,56	0,01	4,72	56
BAPQ	21,91	61,38	8,85	7,86		1,13
BAPQNa	23,51	66,97	3,69	0,30	5,54	12,3

Tabla 4.1.1.2. Porcentaje en peso de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa

Muestra	Ti (%wt)	O (%wt)	Ca (%wt)	P (%wt)	Na (%wt)
B	91,09	8,44	0,12	0,35	--
BNa	56,51	38,43	0,85	0,01	4,10
BAPQ	39,81	37,52	13,43	9,24	--
BAPQNa	45,15	43,35	5,95	0,37	5,18

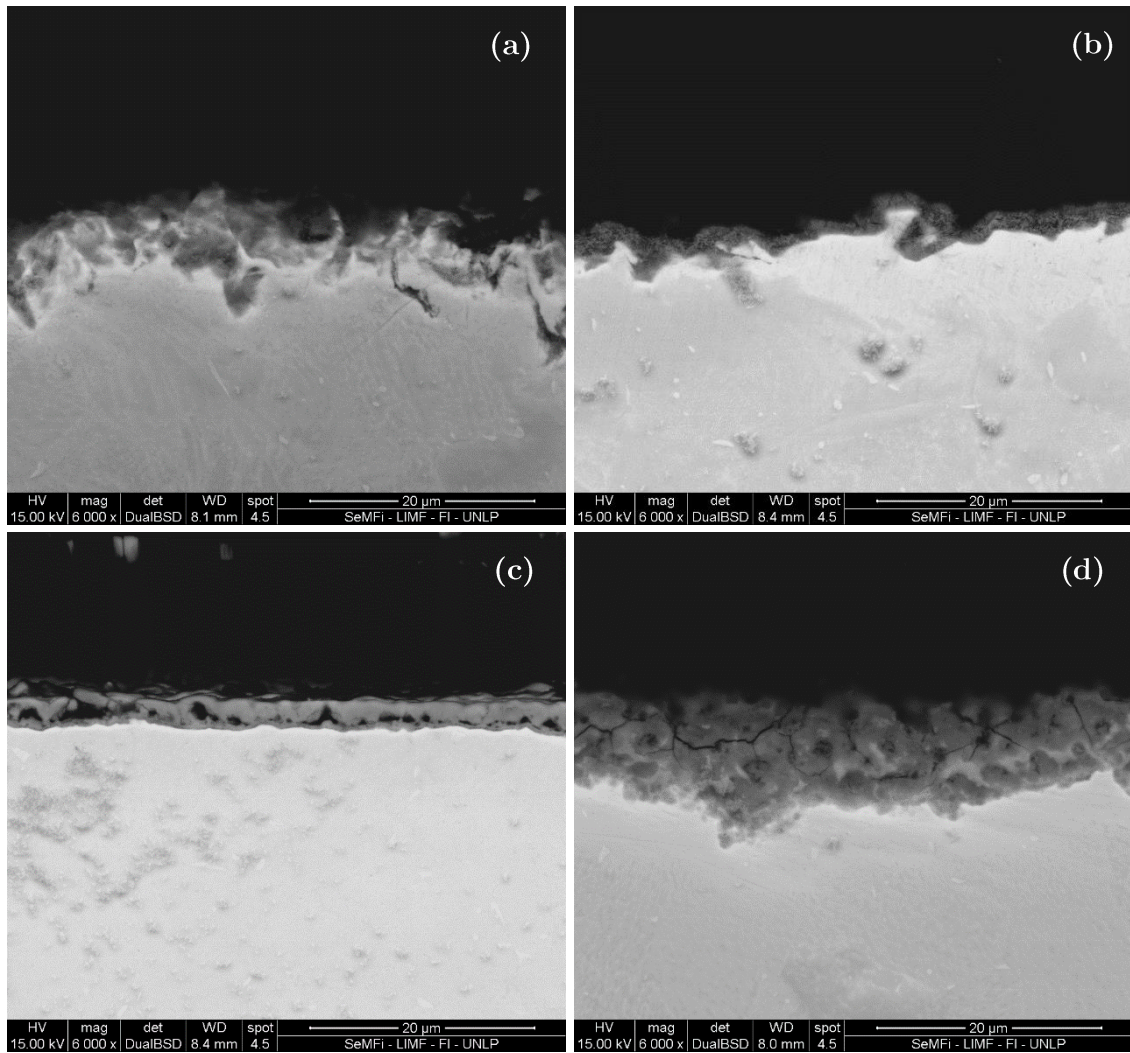


Figura 4.1.1.2. Imágenes MEB de los espesores de las muestras B(a), BNa (b), BAPQ (c) y BAPQNa (d). Se evidencia un marcado incremento en el espesor de las muestras BNa y BAPQNa (tabla 4.1.1.3) producto del tratamiento alcalino en NaOH con la consecuente formación del hidrogel de titanato de sodio.

Tabla 4.1.1.3. Espesores de los recubrimientos medidos a partir de MEB de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa.

B	BNa (μm)	BAPQ (μm)	BAPQNa (μm)
--	$1,62 \pm 0,58$	$2,40 \pm 0,30$	$8,19 \pm 1,63$

En la figura 4.1.1.2 (a), se presenta la imagen MEB de la muestra B, se observa una superficie rugosa irregular con una severa deformación en la superficie (corte transversal), lo cual aumentaría la resistencia a la fatiga mejorando la fijación mecánica del implante en el medio biológico. En la tabla 4.1.1.1 se presentan los datos de EDS de las distintas muestras, la presencia de Ca y P, proviene de la

adhesión de las partículas de fosfato de calcio utilizadas en el proceso de blastinizado [127][128], las cuales no fueron removidas en el proceso de limpieza. Mueller y colaboradores [50], realizaron un estudio in vivo donde compararon superficies blastinizadas con partículas de Al_2O_3 y con partículas biocompatibles, concluyendo que estas últimas mejoran el proceso de osteointegración en comparación con las superficies blastinizadas con Al_2O_3 , de igual manera recomendaron realizar más estudios para comprobar estos resultados. Debido a la rugosidad generada en la superficie y al alcance de la técnica no se pudo medir el espesor de la capa de óxido nativa (TiO_2) de titanio. Según bibliografía la delgada capa de TiO_2 presentaría un espesor máximo de aproximadamente ~ 10 nm [19], [26].

En la figura 4.1.1.1 (c), muestra BAPQ, exhibe la topografía característica de microporos los cuales son generados durante la etapa de ruptura dieléctrica del tratamiento de anodizado por plasma químico [127]–[129]. La mayoría de los microporos presentan una geometría circular, aunque también se observaron formas elipsoidales e irregulares [130]. El tamaño de poro medido a partir de MEB fue de 1.18 ± 0.38 μm , éste se encuentra dentro del rango de tamaños de 0.5 a 2 μm hallado por otros autores [131], [132]. La sección transversal (figura 4.1.1.2 (c)) muestra poros interconectados con un espesor de recubrimiento de 2.4 ± 0.3 μm , estos datos se encuentran en concordancia con los hallados por Du y colaboradores [133] quienes utilizaron un electrolito y voltaje similar. El perfil de la muestra BAPQ se encuentra menos deformado en comparación con la muestra B, se considera que durante el proceso de anodizado se produce inicialmente una disolución parcial de la película de óxido nativa y seguidamente el crecimiento de la película de óxido anódica. Se ha informado que dependiendo de la actividad química del electrolito y el metal, el proceso de oxidación en el ánodo puede conducir a la disolución de la superficie o a la formación de una película de óxido

[134]. Los resultados de EDS (tabla 4.1.1.2) indican la presencia de Ca y P, según bibliografía, estos elementos se incorporaron a la película de óxido anódica durante la primera etapa del proceso de anodizado [19], [43].

Las muestras BNa y BAPQNa (figura 4.1.1.1 (b, d)) revelan la formación de una estructura de red tridimensional con poros de tamaño nanométrico [135]; la estructura formada correspondería al hidrogel de titanato de sodio. Los tamaños de poros medidos fueron de $230,71 \pm 42,30$ nm para la muestra BNa y de $214,94 \pm 32,74$ nm para la muestra BAPQNa, estos valores se encuentran en concordancia con lo determinado por Wadge y colaboradores quienes trabajaron con parámetros de tratamiento similares (5M NaOH, 60°C y 24 h) [136]. También se observaron fisuras en ambas muestras tanto en las vistas longitudinales como en las transversales, estas se presentan distribuidas en toda la superficie y son el resultado de la contracción de la capa de titanato de sodio producto de la deshidratación durante el secado [137]. La muestra BNa presenta zonas donde no se han generado fisuras en el recubrimiento, el espesor del recubrimiento de la muestra BNa es menor comparado con el formado en la muestra BAPQNa. Por otro lado, la muestra BAPQNa presenta fisuras de un mayor espesor y profundidad en el recubrimiento, las cuales confluyen generando una capa craquelada producto de una contracción no uniforme durante el secado y la deshidratación de la superficie. Las imágenes de las secciones transversales (figura 4.1.1.2 (b, d)) de las muestras BNa y BAPQNa indican un incremento en el espesor con respecto a las muestras que no fueron tratadas en el álcali (B y BAPQ). La muestra BNa presenta un espesor de recubrimiento de $1.62 \pm 0.58 \mu\text{m}$, este valor resulta coherente tomando en cuenta los estudios realizados por Yamaguchi y colaboradores [138], éstos obtuvieron un espesor de hidrogel de $1 \mu\text{m}$ utilizando una concentración de 5M de NaOH. Según Wei y colaboradores [139], el espesor de hidrogel de titanato aumenta al aumentar la concentración de

hidróxido de sodio en la solución acuosa. La muestra BAPQNa (Tabla 4.1.1.3) presenta un espesor de $8.19 \pm 1.63 \mu\text{m}$, contrastando con el valor obtenido para la muestra BAPQ de $2.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$, se evidencia un incremento de aproximadamente del 240% en el espesor. La deformación que se observa en los perfiles transversales de las muestras BNa y BAPQNa (figura 4.1.1.2 (b, d)) son producto de la disolución parcial de la capa de TiO_2 consecuencia del ataque corrosivo de los grupos hidroxilos de la solución de NaOH [62]. En la (tabla 4.1.1.2) se puede observar la presencia de Na y un aumento en el porcentaje en peso de oxígeno (procedente del tratamiento alcalino), además se detectaron Ca y P remanentes del tratamiento anterior, en las muestras BNa y BAPQNa.

4.1.2. Composición de Fases

4.1.2.1. Espectroscopía Raman

La figura 4.1.2.1.1 muestra los espectros Raman de las muestras BNa, BAPQ, BAPQNa; debido al delgado espesor y al alcance de la técnica no se pudieron coleccionar datos de la muestra "B".

La muestra BNa presenta 8 modos normales de vibración, 5 modos corresponderían a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), dos modos a la fase de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y un modo a la fase fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las señales a 155.8 y 278.1 cm^{-1} corresponden al modo de estiramiento anti-simétrico B_g atribuido a la vibración de Ti-O-Na^+ , la señal a 437 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrico A_g atribuida a la vibración del enlace de Ti-O-Ti , la señal a 696 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento anti-simétrico B_g atribuido a la vibración de los enlaces Ti-O7 y Ti3-O5 [140], [141], la señal a 890 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico A_g [140], [142], [143]. La señal intensa presente a 963.8 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento

simétrico del enlace tetraédrico del grupo PO_4^{2-} atribuido a la vibración de los enlaces P-O [144], [145].

Del espectro vibracional Raman obtenido para la muestra BAPQ se observa la presencia de 5 modos normales de vibración, 3 modos de estiramiento simétrico E_g , 2 modos de flexión simétrica B_{1g} y un modo de flexión anti-simétrica A_{1g} , los cuales corresponderían a la fase anatasa de acuerdo con las señales asignadas por otros autores [146]–[148]. Las señales a 146, 198 y 637.6 cm^{-1} corresponderían a los 3 modos de estiramiento simétrico E_g , la señal a 394.6 cm^{-1} correspondería a uno de los modos de flexión simétrica B_{1g} y la señal a 512.3 cm^{-1} correspondería a un doblete formado por el modo de flexión simétrica B_{1g} y el modo de flexión anti-simétrica A_{1g} todos relacionados al enlace O-Ti-O [149]. El modo de estiramiento simétrico E_g a 146 cm^{-1} intenso y estrecho confirmaría una anatasa de largo alcance, la cristalinidad de la fase anatasa ya ha sido demostrada por otros autores [133], [150], [151].

La muestra BAPQNa presenta 10 modos normales de vibración, 3 modos de estiramiento simétrico E_g , 2 modos de flexión simétrica B_{1g} y un modo de flexión anti-simétrica A_{1g} los cuales corresponderían a la fase anatasa [146]–[148] en concordancia con lo encontrado en la muestra BAPQ. Además, se identificaron 4 modos normales de vibración los cuales corresponderían a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). La señal a 280.1 cm^{-1} se asociaría al modo de estiramiento simétrico B_g la cual es atribuida a la vibración de Ti-O- Na^+ , las señales a 443 cm^{-1} y a 737 cm^{-1} corresponderían al modo de flexión simétrico A_g atribuidas a las vibraciones del enlace Ti-O-Ti y O-Ti-O₄; la señal a 890 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico A_g atribuida a la vibración de los enlaces Ti-O y Na-O cortos incluidos los átomos terminales en la estructura de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ [152].

La presencia de picos amplios y de baja intensidad, indicarían que las muestras estarían compuestas por material amorfo o microcristalino [148].

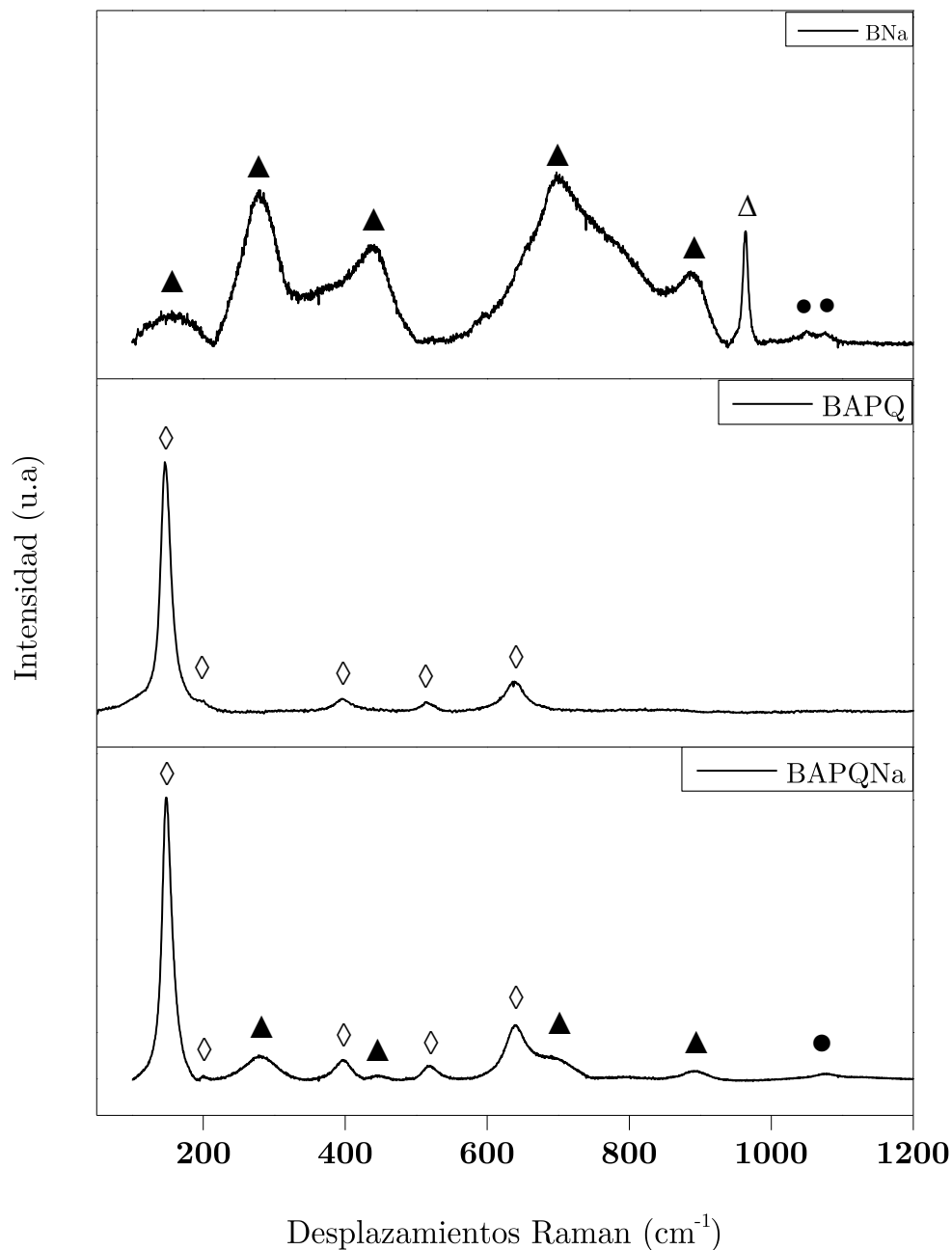


Figura 4.1.2.1.1. Espectros Raman de las muestras BNa, BAPQ y BAPQNa (▲: $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, △: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ●: Na_2CO_3 , ◇: TiO_2 -Anatasa).

La presencia del grupo fosfato en la superficie de la muestra BNa provendría de la adhesión de las partículas utilizadas en el tratamiento de blastinizado; estos datos se encuentran en concordancia con los obtenidos por EDS, donde se evidencia la presencia de Ca y P en la superficie de la muestra. Las señales de baja intensidad presentes entre 1049 y 1076 cm^{-1} corresponderían a la vibración de estiramiento simétrico de los grupos carbonatos [153]; la existencia de carbonato de sodio en las superficies tratadas en soluciones alcalinas se atribuiría a la formación durante el secado y almacenamiento de las muestras al aire libre [154]. No se evidencian picos de la fase anatasa o de la fase rutilo. La presencia de picos amplios indicaría que las muestras estarían compuestas por material amorfo o microcristalino [148]. La muestra BNa presenta picos anchos e intensos en comparación con la muestra BAPQNa donde los picos son anchos, pero de baja intensidad, con lo cual las propiedades de la muestra BNa estará gobernada por el carácter amorfo del hidrogel de titanato de sodio; mientras que las propiedades de la muestra BAPQNa tendrá propiedades compartidas entre la fase anatasa del TiO_2 y la fase amorfa del hidrogel de titanato de sodio.

4.1.2.2. Difracción de Rayos X

La figura 4.1.2.2.1 presenta los espectros DRX obtenidos de las muestras BAPQ, BNa y BAPQNa, se presentan pocas señales en el rango explorado lo cual se debería a la simetría de las distintas fases analizadas, facilitando el análisis individual de cada pico para obtener la información de las fases presentes en las distintas superficies. Debido al delgado espesor del TiO_2 en la muestra “B” y considerando que el componente a medir no se encuentra en una cantidad mayor al 1% del total no se realizaron medidas a partir de la técnica.

La muestra BAPQ presenta seis señales de difracción, dos señales corresponderían a la fase anatasa del TiO_2 y 5 señales a la fase α del Ti. La señal a $25,4^\circ$ de baja intensidad y la señal a $38,4^\circ$ corresponderían a la fase anatasa del TiO_2 [17], [18]. El pico presente a $38,4^\circ$ sería un solapamiento entre las señales de la fase anatasa y la fase α del Ti, se considera que la forma y la intensidad del pico estaría gobernado en su mayoría por las propiedades de la fase α del Ti. La baja intensidad en el pico de anatasa se debería al voltaje adoptado en el proceso, M. Garsivaz Jazi y colaboradores [155], probaron que para voltajes entre 140-200V y un electrolito ácido la intensidad de la señal de anatasa aumenta con el incremento del voltaje de anodizado. Las señales presentes a $35,1^\circ$ - $35,2^\circ$; $38,4^\circ$ (doblete); $40,2^\circ$ (doblete); 53° - $53,13^\circ$ (doblete); 63° - 64° todos estarían asociados a la fase α del Ti [133], [156]. No se ha podido identificar ninguna señal correspondiente a la fase rutilo del TiO_2 lo cual fue confirmado por Raman, esto sugiere que los parámetros utilizados en el tratamiento de anodizado por plasma químico promueven la formación de la fase anatasa del TiO_2 . Autores han encontrado que para voltajes de anodizado por plasma químico entre 140-300 V y electrolitos alcalinos se promueve la formación de anatasa cristalina durante la primera etapa del proceso de anodizado [150], [157].

La muestra BAPQNa, presenta señales a $25,3^\circ$, $35,1^\circ$ - $35,2^\circ$ (doblete), $38,4^\circ$ (doblete), $40,2^\circ$ (doblete), $52,9^\circ$ - $53,11^\circ$ (doblete) las cuales corresponderían a la fase anatasa y a la fase α del Ti, esto resulta consistente ya que la muestra BAPQ actúa como sustrato base de la muestra BAPQNa [133], [156]. Al mismo tiempo, se identificaron tres señales anchas y de baja intensidad las cuales responderían a la fase del hidrogel de titanato de sodio. La señal presente a $25,3^\circ$ sería un solapamiento entre la fase anatasa y el hidrogel de titanato de sodio, las señales a 34° y $48,05^\circ$ también corresponderían a la fase del hidrogel de titanato de sodio [158]. Autores han atribuido la presencia de picos anchos entre 23° - 32° y

entre 47°-49° a la formación del hidrogel de titanato de sodio producto del tratamiento alcalino [62], [158]–[161].

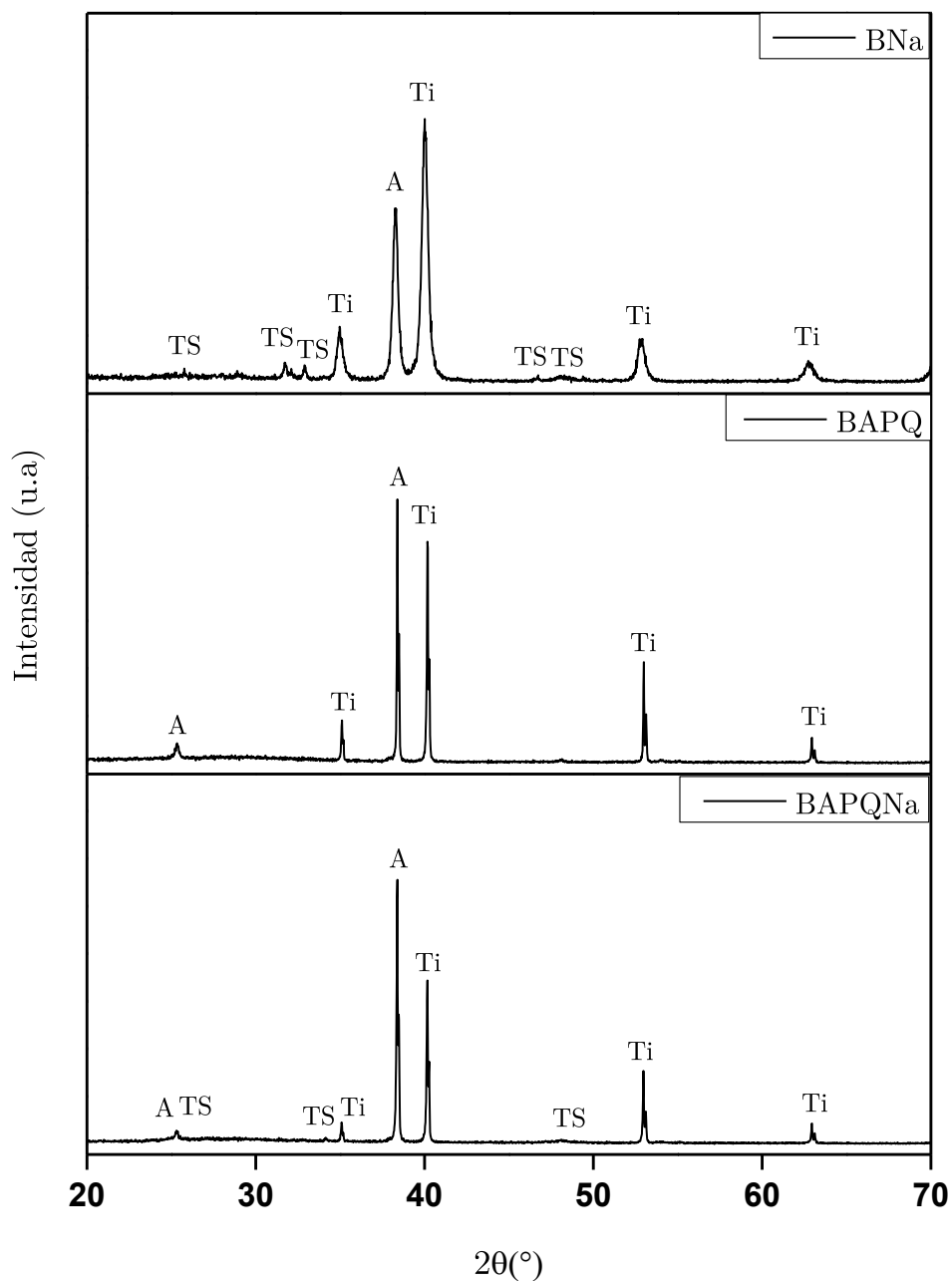


Figura 4.1.2.2.1. Espectro DRX de las muestras BNa, BAPQ y BAPQNa (A: Anatasa, TS: Titanato de Sodio, Ti: Titanio α).

La muestra BNa presenta señales a 35° , 38° , 40° , $52,9^\circ$, $62,8^\circ$ las cuales se atribuirían a la fase α del Ti [133], [156]. Además, se identificaron 4 señales a $25,8^\circ$, $31,7^\circ$ - $32,1^\circ$ (doblete), 33° y $48,29^\circ$ anchas y de baja intensidad las cuales corresponderían a la fase del hidrogel de titanato de sodio [62], [158]–[161].

En la muestra "B", el delgado espesor del TiO_2 y su baja concentración (menor al 1%) impidieron la realización de medidas con la técnica utilizada. En la muestra BAPQ, se identificaron seis señales de difracción, dos correspondientes a la fase anatasa del TiO_2 y cinco a la fase α del Ti, indicando la predominancia de estas fases debido a los parámetros del proceso. No se detectó la fase rutilo. En la muestra BAPQNa, las señales correspondieron a anatasa y fase α del Ti, además de tres señales anchas y de baja intensidad atribuibles al hidrogel de titanato de sodio.

La muestra BNa mostró señales asociadas a la fase α del Ti, junto con cuatro señales de baja intensidad atribuibles al hidrogel de titanato de sodio. Los espectros DRX de BNa y BAPQNa son similares a los reportados para la fase de hidrogel de titanato de sodio ($\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_3\text{O}_7$). La presencia de más señales de hidrogel en BNa que en BAPQNa sugiere una mayor actividad de hidratación en el Ti blastinizado durante el tratamiento químico alcalino. Las señales de baja intensidad y amplitud ancha indican que las fases formadas tienen un carácter amorfo o microcristalino. En resumen, los resultados de DRX confirman la presencia de fases específicas en las muestras, proporcionando información sobre la estructura cristalina y la composición de los tratamientos superficiales aplicados.

4.1.2.3. ATR-FTIR

Los grupos funcionales presentes en las muestras BNa, BAPQ y BAPQNa fueron analizados por ATR-FTIR (figura 4.1.2.3.1). Se pudieron identificar la mayoría de los grupos funcionales presentes en cada una de las condiciones, puesto que el espesor de penetración del haz con cristal de ZnSe fue de 2 μm aproximadamente.

La muestra BNa muestra que luego del tratamiento alcalino se forma una banda ancha e intensa a 3301 cm^{-1} asignable a grupos -OH superficiales y/o agua adsorbida [162]. Las señales débiles en la región comprendida entre 1801,3 cm^{-1} y 1201 cm^{-1} son asignadas a agua adsorbida, característica de precipitados en solución acuosa, y a otros grupos como carbonatos, estos últimos probablemente también como resultado del tratamiento alcalino en NaOH [163]. Becker y colaboradores han encontrado bandas asignables a grupos hidroxilos a 1630 cm^{-1} para $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ y a 1635 cm^{-1} para $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ [164]. La banda observada aproximadamente a 860 cm^{-1} es posible atribuirle al modo de vibración de estiramiento de los iones Ti del grupo Ti-O-Ti en una coordinación octaédrica, lo que indicaría la presencia del ion titanato [165]. Los compuestos de titanato de sodio presentan bandas de vibración de estiramiento y flexión con diferentes intensidades en la región de 700-1000 cm^{-1} , la forma y la posición de la banda dependerá del tipo de titanato de sodio formado [164], [166]. No se presentaron bandas asignables a las vibraciones del grupo Ti-O-Ti del sustrato (TiO_2), este resultado confirmaría el delgado espesor y la baja concentración del TiO_2 de la capa pasiva.

En el espectro de la muestra BAPQ se observa una banda intensa principal centrada en 1000 cm^{-1} y una banda lateral de baja intensidad a 921,8 cm^{-1} asignable a las vibraciones de estiramientos del grupo Ti-O-Ti del sustrato TiO_2 . Generalmente los óxidos metálicos presentan bandas de absorción anchas e

intensas por debajo de 1000cm^{-1} (región de la huella dactilar) como resultado de las vibraciones interatómicas del grupo Ti-O-Ti [167]–[169]. La banda presente a 1050 cm^{-1} estaría asociada a las vibraciones de estiramiento antisimétricos de los grupos fosfatos PO_4^{3-} [170]. La presencia del grupo fosfato en la superficie de la muestra BAPQ, se debería al enriquecimiento del recubrimiento de los compuestos presentes en el electrolito utilizado en el proceso de anodizado [56]. Las señales débiles comprendidas entre 1726 y 1217 cm^{-1} son asignadas a agua absorbida producto del electrolito acuoso utilizado en el tratamiento de APQ. La muestra presentó un espectro con ruido a pesar del número de espectros acumulados (128), esto indicaría una baja concentración de especies en la superficie del titanio tratado.

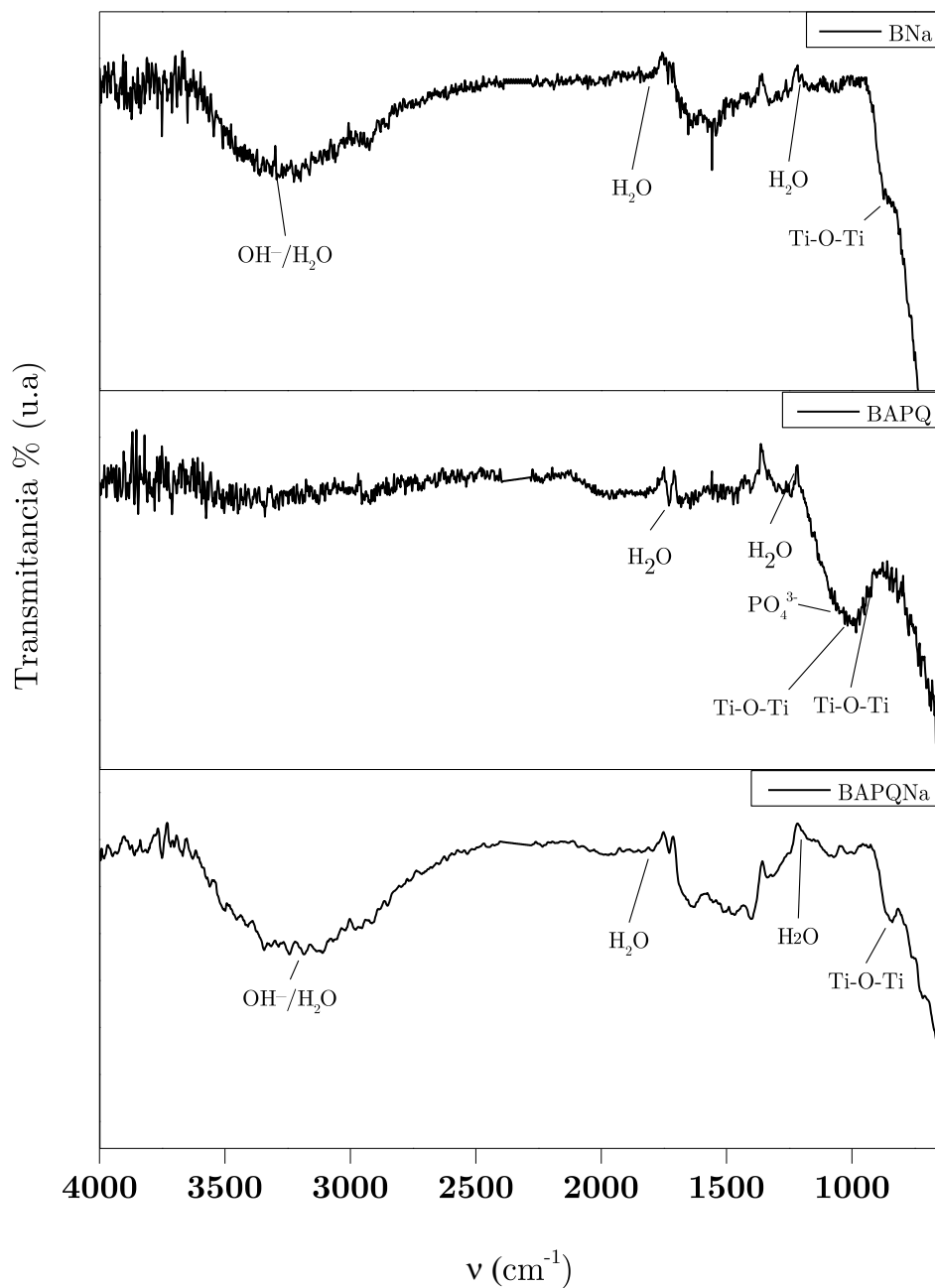


Figura 4.1.2.3.1. Espectros ATR-FTIR de las muestras BNa, BAPQ y BAPQNa.

Del análisis del espectro vibracional de la muestra BAPQNa se evidenció que esta presenta los mismos grupos funcionales encontrados en la muestra BNa confirmando de esta forma la presencia del ion titanato para ambas muestras. Se encontraron mínimas diferencias las cuales solo radican en un mínimo corrimiento

en las posiciones de las bandas de transmisión. No se presentaron bandas de vibración asignables a grupos fosfatos PO_4^{3-} , esto se debería a que el espesor del recubrimiento de la muestra BAPQNa es de aproximadamente $8.19 \pm 1.63 \mu\text{m}$ comparando con el espesor de la muestra BAPQ ($2.40 \pm 0.32 \mu\text{m}$) y el espesor de penetración del haz ($2 \mu\text{m}$,) por lo tanto los grupos funcionales identificados serán todos pertenecientes a la capa de hidrogel de titanato de sodio.

4.1.3. Rugosidad

En la tabla 4.1.3.1 se presentan los valores obtenidos mediante el programa EZEImage [88] para los parámetros de rugosidad de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa. Todos los parámetros, excepto S_a , se calcularon a partir de las alturas relativas al plano medio de mínimos cuadrados. Se puede observar en la tabla 4.2.3.1 que los parámetros que presentan mayor variación entre los distintos tratamientos son S_a , S_z , S_{sk} y S_{vi} . Los parámetros S_{ku} , S_{bi} y S_{ci} no se presentan, debido a diferencias significativas en el error.

Tabla 4.1.3.1. Valores de parámetros de amplitud y parámetros funcionales obtenidos con el programa EZEImage. Los números entre paréntesis indican el error en la última cifra significativa.

Muestra	S_a (μm)	S_z (μm)	S_{sk}	S_{ku}	S_{bi}	S_{ci}	S_{vi}
B	1,39(3)	13(1)	0,40(4)	3,8(6)	0,64(2)	1,47(5)	0,132(4)
BNa	1,41(8)	17(5)	0,22(7)	3,5(6)	0,64(3)	1,5(1)	0,121(5)
BAPQ	1,09(2)	11,5(1)	0,22(4)	3,1(1)	0,63(2)	1,50(5)	0,118(3)
BAPQNa	1,44(6)	17(1)	0,34(7)	3,4(4)	0,65(3)	1,44(8)	0,130(4)

En la figura 4.1.3.1 se puede observar la variación del parámetro S_a , en todos los casos se encuentra en el rango de 1-2 μm , siendo la muestra BAPQ la de menor valor. Si se comparan los valores de S_a , antes y después de realizar el tratamiento de NaOH, entre las muestras con blasting (B y BNa) no existe variación, pero entre las muestras con APQ (BAPQ y BAPQNa), la variación es significativa. Comparando las cuatro muestras, BAPQ es la que presenta el menor S_a , en el resto el valor es similar. En el caso del parámetro S_z , se observa un aumento de su valor en la muestra BAPQNa respecto a BAPQ, aunque si se comparan las cuatro muestras no existe variación entre ellas por el gran error de la muestra BNa.

Se puede observar que en todas las muestras es levemente mayor la proporción de valles que de picos, esto se ve reflejado en los valores obtenidos de S_{sk} y S_{vi} . En la figura 4.1.3.2 (a) y (b) se observa que cuando es mayor la proporción de valles (en valor absoluto) el índice de retención en el valle aumenta. Cuando se aplica el tratamiento NaOH (BNa) a la muestra con blasting (B) la proporción de valles disminuye (se acerca a un valor gaussiano de S_{sk}) y el índice de retención en el valle disminuye. En cambio, en la muestra de APQ el comportamiento es al revés, la proporción de valles y el índice de retención en el valle aumenta cuando se aplica el tratamiento de NaOH (BAPQNa). Sin embargo, en todos los casos el parámetro S_{ku} presenta para todas las muestras una distribución de alturas gaussiana [76]

De todos los tratamientos, la muestra BAPQ es la que presenta valores gaussianos de índices de retención de fluidos, el resto de las muestras tienen mayores índices de retención en el valle y en el pico y menores índices en el núcleo que los valores correspondientes a superficies gaussianas [76].

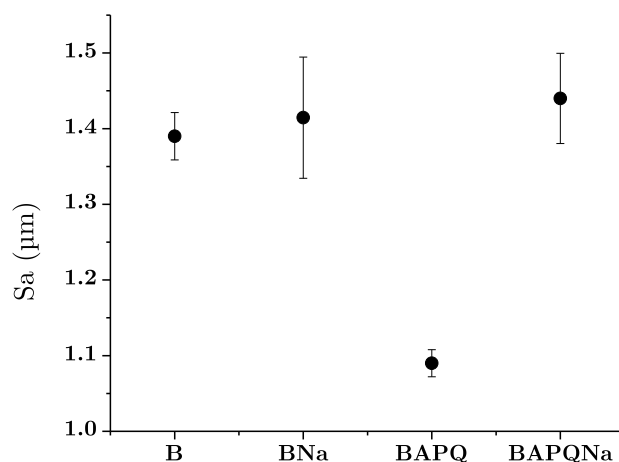


Figura 4.1.3.1. Comportamiento del parámetro Sa

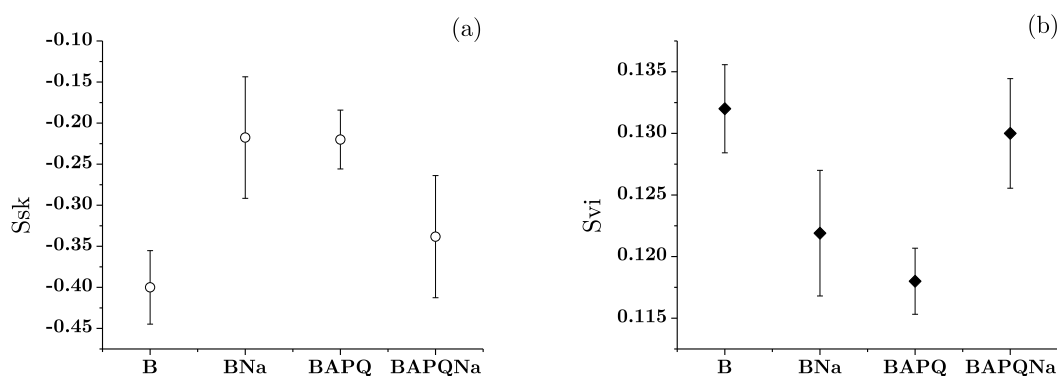


Figura 4.1.3.2. Comportamiento de los parámetros (a) Ssk y (b) Svi

La dimensión fractal D (tabla 4.1.3.2) indica que BAPQ tiene una superficie suave persistente y que además presenta el menor valor de Sa. Luego del tratamiento de NaOH, D aumenta (aunque sigue siendo persistente) al igual que Sa, Sz, Svi y Ssk (en valor absoluto) pero Sbi y Sci se mantienen constante. La formación del gel titanato de sodio por el tratamiento alcalino, genera una superficie con mayor rugosidad y proporción de valles por lo que mejora su capacidad de retención de fluido en esa zona. Como se puede observar en la tabla 4.1.3.2 el parámetro dmin presenta una variación luego del tratamiento por lo que el tamaño de la mínima

celda que presenta periodicidad en la superficie (que consideramos por su valor que podría ser el poro de los volcanes generados en el tratamiento de APQ) disminuye por el tratamiento alcalino y lo mismo sucede con D_{per} (que podría considerarse como la distancia entre los poros). En cuanto a Λ , se puede observar que, si bien existe una pequeña variación, la superficie presenta anisotropía (figura 4.1.3.3).

Tabla 4.1.3.2. Valores de la dimensión fractal D y de los parámetros D_{min} y D_{per} obtenidos con el programa FERImage. Los números entre paréntesis indican el error en la última cifra significativa

Muestra	D	d_{min} (μm)	d_{per} (μm)
B	2,67(3)	2,3(5)	27(4)
BNa	2,574(2)	2,8(1)	20(2)
BAPQ	2,346(2)	2,30(3)	17,6(6)
BAPQNa	2,44(3)	1,8(1)	12,3(7)

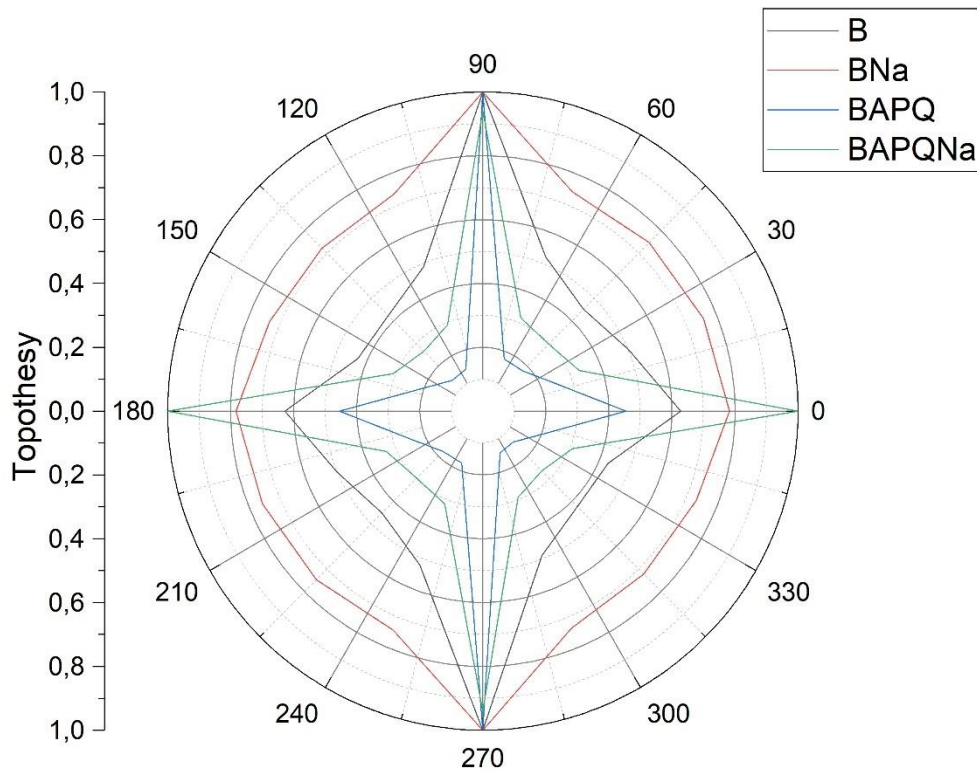


Figura 4.1.3.3. Gráfico polar del parámetro *topothesy* normalizado a sus respectivos valores máximos.

En el caso de las muestras con blasting (B y BNa), S_a y D no varía después del tratamiento alcalino pero la proporción de valles se ve disminuida (S_{sk} y S_{vi}). Es decir, la rugosidad general no se ve afectada, sólo se puede considerar que el tratamiento alcalino genera modificaciones en la distribución de alturas al bajar la proporción de valles y el índice de retención de fluido en esa zona. Por otro lado, el d_{min} no varía, a diferencia de las muestras con APQ, por lo que el tamaño de la mínima celda que presenta periodicidad en la superficie tampoco varía, aunque el parámetro D_{per} disminuye levemente en la muestra con tratamiento alcalino. Los resultados numéricos obtenidos de estas últimas muestras no se han podido relacionar a alguna característica superficial como en el caso de las muestras de APQ. Respecto al resultado obtenido de Λ , se puede observar que la muestra con tratamiento alcalino presenta menor anisotropía que la muestra sin tratamiento.

4.1.4. Mojabilidad

En la tabla 4.1.4.1 se presentan las mediciones del ángulo de contacto por el método de la gota sésil de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa.

Del análisis de los resultados se observa una disminución muy marcada en el ángulo de contacto entre las muestras que fueron tratadas en hidróxido de sodio (BNa y BAPQNa) con respecto a los sustratos base (B y BAPQ). Las muestras BNa y BAPQNa presentaron ángulos de contacto $\Phi < 20^\circ$ indicando una superficie superhidrofílica [35]. Cuando las gotas de agua se depositan en la superficie de las muestras tratadas con NaOH se dispersan rápidamente, este resultado indicaría una alta energía superficial, adhesividad y mojabilidad de las superficies. Estas características superficiales podrían acortar los tiempos de cicatrización y en consecuencia los tiempos de osteointegración de los implantes [171].

Tabla 4.1.4.1. Mediciones de ángulos de contacto de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa.

B	BNa	BAPQ	BAPQNa
80.1 °	19.1 °	114.7 °	17.1°

La muestra B presenta un ángulo de contacto de 80.1°, valores de ángulos de contacto $\Phi < 90^\circ$ presentaran propiedades hidrofílicas, resultando en moderadas propiedades de mojabilidad, adhesividad y energía superficial [172]. Las fuerzas de adhesión sólido-líquido serán mayores que las fuerzas de cohesión del líquido, la gota tenderá a una forma más plana mojando una mayor porción de la superficie del sólido [172].

La muestra BAPQ tiene un ángulo de contacto de 114.7°, valores de ángulos de contacto $\Phi > 90^\circ$ indicarían superficies hidrofóbicas [172], resultando en bajas propiedades de mojabilidad, adhesividad y energía superficial. Las fuerzas de

cohesión del líquido serán mayores que las fuerzas de adhesión sólido-líquido, con lo cual la gota tenderá a una forma esférica, resultando en el mojado de una pequeña porción de la superficie del sólido [172]. En el transcurso de la inserción clínica, solo una pequeña porción de la superficie del implante hidrofóbico y microestructurado es mojado durante el contacto inicial con la sangre [79]. Se considera que las superficies hidrófobas pueden afectar la adhesión celular y la desnaturalización de las proteínas, lo que conduciría al rechazo del implante [173].

Analizando los valores de ángulos de contacto relativamente altos obtenidos en las muestras B y BAPQ, se considera que estas superficies se comportan según un régimen de Cassie-Baxter [154]. El régimen de Cassie-Baxter establece que las gotas del líquido de prueba (agua) se anclan a los bordes y puntas de la microestructura de los sustratos (B y BAPQ), quedando aire atrapado en las cavidades de la superficie debajo del líquido, resultando en un contacto incompleto a partir de la formación de una interfase heterogénea biomaterial/aire/líquido [154]. Autores han obtenido para superficies de Ti blastinizadas con partículas biocompatibles (hidroxiapatita) y en superficies de Ti Anodizadas, valores de ángulo de contacto entre 40° - 60° (superficies hidrofílicas de moderada mojabilidad); atribuyeron estos resultados a la topografía y a la presencia de Ca y P en la superficie producto de la adhesión de las partículas del tratamiento de RBM o del electrolito utilizado en el proceso de anodizado[171], [174], [175]. La muestra B presenta propiedades hidrofílicas, mientras que la muestra BAPQ muestra propiedades hidrofóbicas. Ambas superficies evidenciaron la presencia de calcio (Ca) y fósforo (P) (Tabla 4.1.1.2). En consecuencia, no podemos establecer una relación directa entre la presencia de estos elementos en la superficie y la hidrofiliidad observada. Otro factor importante que podría disminuir las propiedades de mojabilidad provocando un aumento en el ángulo de contacto, es la existencia de carbono en la superficie; se corroboró la ausencia de este elemento

en la superficie de los sustratos (tabla 4.1.1.2). La absorción de carbono en la superficie de los implantes producto de una mala limpieza de los tratamientos superficiales o de contaminantes presentes en el ambiente, ocasionaría una disminución de la energía superficial con un aumento del ángulo de contacto (disminución de la mojabilidad de la superficie)[79], [176] y por consiguiente la obtención de una superficie con propiedades hidrofóbicas.

Las muestras BNa y BAPQNa exhiben un ángulo de contacto de 19.1° y 17.1° , valores de ángulos de contacto $\Phi < 20^\circ$ indicarían propiedades superhidrofílicas, resultando en altas propiedades de mojabilidad, adhesividad y energía superficial [172]. Las fuerzas de adhesión sólido-líquido serán mayores que las fuerzas de cohesión del líquido, la gota tenderá a una forma plana mojando una gran porción de la superficie del sólido [172]. Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran en concordancia con los hallados por Kim y colaboradores [62], quienes lograron sustratos superhidrofílicos mediante la preparación de sustratos de titanio en una solución de NaOH 10M durante 24 horas a 60°C , respectivamente. El hidrogel de titanato de sodio al ponerse en contacto con una solución acuosa se hidroliza, los grupos hidroxilos son termodinámicamente menos estables y de alta energía superficial [154], [177], un aumento en la concentración del álcali produce un aumento en el contenido de los grupos hidroxilos obteniendo superficies superhidrofílicas [62], [154], [177].

4.1.5. Potencial Z

El potencial zeta (Capítulo 2.1.7) se define como la carga que se genera en un límite ficticio dentro de la capa difusa y se denomina plano de corte (figura 2.1.7.1). Por lo tanto, el potencial zeta depende en gran medida tanto de la muestra como del medio en el que se encuentra inmerso [101]. La tabla 4.1.5.1 presenta los resultados de potencial zeta de las muestras B, BNa BAPQ y BAPQNa. Las superficies de titanio al ponerse en contacto con un electrolito acuoso generan en su superficie una carga negativa por la absorción de iones (OH^-) [178], [179], en concordancia con lo encontrado por otros autores, todas las muestras bajo estudio reflejaron un potencial Z negativo.

Tabla 4.1.5.1. Medidas de potencial Z de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa

Muestras	Potencial Z (mV) \pm SD	R ²
B	-17.6 \pm 3,2	0.94
BNa	-8.1 \pm 1,4	0.94
BAPQ	-10.3 \pm 1,8	0.76
BAPQNa	-8.5 \pm 3,8	0.87

El valor de potencial Z más negativo encontrado en la muestra B indicaría la generación de una mayor absorción de grupos hidroxilos (OH^-) en la superficie, una mayor cantidad de grupos hidroxilos conducirían a una menor cantidad de iones hidrógeno en solución con lo cual se obtendría un potencial Z más negativo [180], se considera que la muestra presentará una mayor estabilidad en comparación con los otros sustratos medidos [181]. Sin embargo, exhibe una desviación estándar más alta de lo normal (0.5-1mV), esto revelaría que la superficie presenta cierta reactividad en la solución acuosa (SBF) durante la medición [114], [182], dado que la superficie es ligeramente hidrofílica (80.1°) y

tiene residuos de partículas de fosfato de calcio en la superficie producto del tratamiento de blastinizado.

El valor de potencial Z obtenido para la muestra BAPQ se desplaza hacia valores menos negativos lo que evidenciaría reactividad e intercambio iónico. La superficie es ligeramente hidrofóbica y se considera que la carga superficial se debería a que las moléculas de agua adsorbidas en la superficie son débilmente atraídas a la superficie [114], [178]. La superficie muestra cierta reactividad (considerando la desviación estándar), esto se podría asignar a la disolución de la capa de anodizado por plasma químico (Tablas 4.1.1.1 y 4.1.1.2).

Después del tratamiento en el álcali se observa un desplazamiento del valor del potencial Z de la muestra BNa y BAPQNa hacia valores menos negativos (-), indicando una mayor reactividad en comparación con la muestra B y BAPQ. Como ya se ha mencionado, el hidrogel de titanato de sodio al ponerse en contacto en una solución acuosa (SBF) se hidroliza, los grupos hidroxilos son termodinámicamente menos estables y de alta energía superficial [154], [177]. La reactividad de las superficies BNa y BAPQNa se debería a la liberación de los iones Na^+ con la adsorción de iones Ca^{2+} y de H_3O^+ de la solución SBF, considerando que la superficie es superhidrofílica. La desviación estándar de la muestra BNa es menor que la muestra B, esto podría significar que el intercambio de iones es constante durante la medición. Tanto la muestra B como la BNa muestran un excelente coeficiente de determinación R^2 . La muestra BAPQNa presenta una alta desviación estándar con respecto a la muestra BAPQ, esto significaría que la superficie no es estable durante la medición, estos resultados están respaldados por los coeficientes de determinación, que son buenos pero inferiores a las muestras B y BNa.

4.1.6. Ensayo *in-vitro* en Fluido Biológico Simulado (SBF)

La bioactividad *in-vitro* se evaluó sumergiendo los distintos sustratos B, BNa, BAPQ y BAPQNa durante 1.5 h y 72 h en fluido corporal simulado (SBF). Del análisis de las distintas superficies (figura 4.1.6.1) se evidenció la precipitación de una posible apatita en la superficie de las muestras que tenían tratamiento alcalino (BNa y BAPQNa) en comparación con las muestras que no fueron tratadas en el álcali (B y BAPQ). La morfología del depósito encontrado se encuentra en concordancia con la morfología de precipitados de hidroxiapatita estudiada por otros autores sobre superficies bioactivas de titanio [62], [63], [114].

En las figuras 4.1.6.2 se presentan los datos de EDS obtenidos de las muestras B, BNa, BAPQ, BAPQNa después de la inmersión durante 1.5 h y 72 h en SBF.

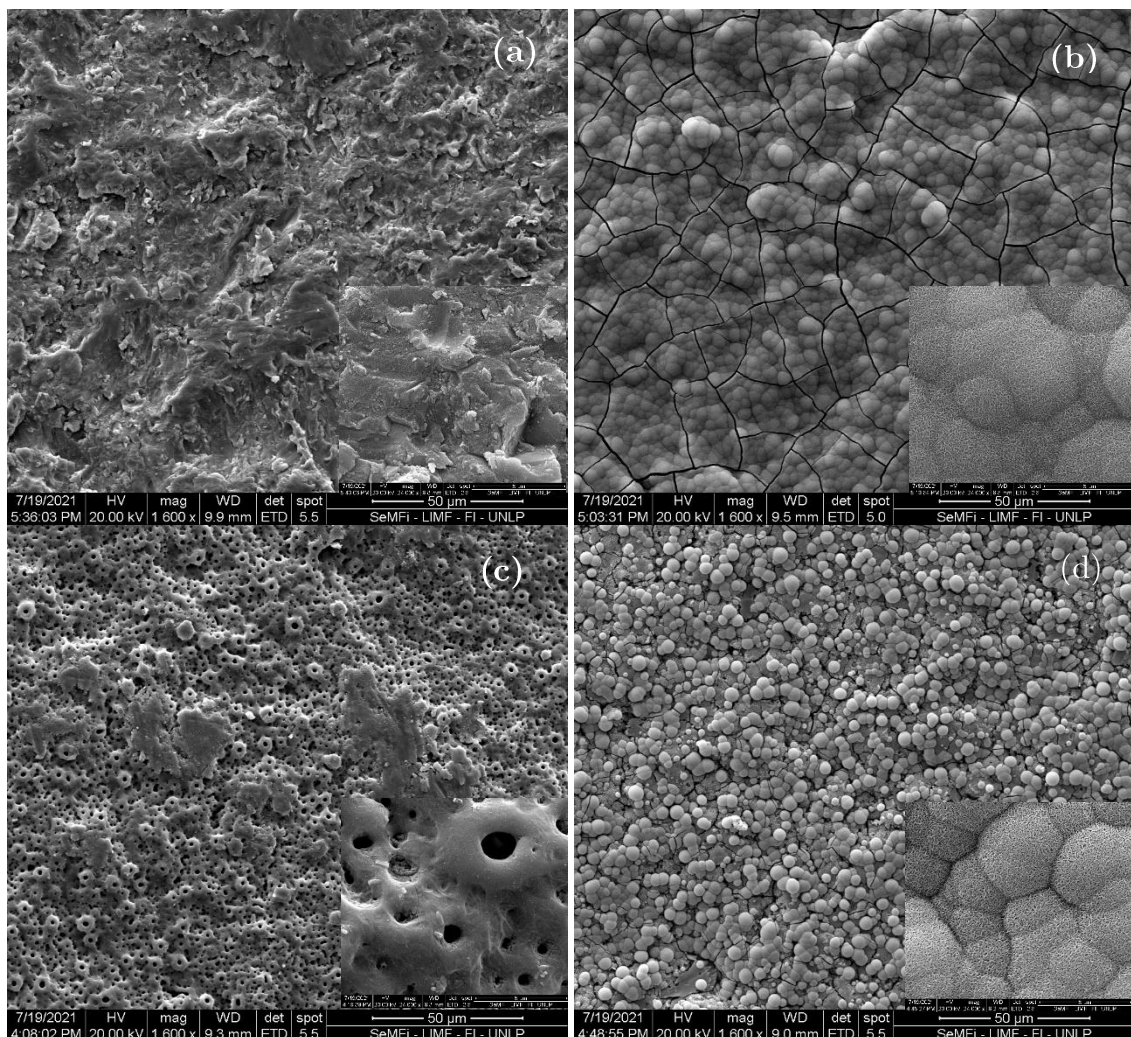


Figura 4.1.6.1. muestras B(a), BNa (b), BAPQ(c) y BAPQNa (d) luego de la inmersión a 72 horas en SBF. Se evidencian precipitados esféricos de una posible apatita en las muestras BNa (b) y BAPQNa (d).

La muestra B presenta áreas con un precipitado muy incipiente (figura 4.1.6.1 (a)) de una posible apatita. Del análisis de los datos de EDS se muestra que se produce un incremento de la concentración de Ca, P y un descenso en la concentración de Ti con el incremento del tiempo de inmersión en SBF (Figura 4.1.6.2). La concentración de oxígeno aumenta en el periodo inicial de inmersión (1.5h) y luego se mantiene relativamente constante para las 72 h de ensayo. Además, se detectan la presencia de C, Na y Mg luego de 72 h en SBF; esto indicaría la formación y crecimiento de una nueva capa (Figura 4.1.6.2.). La relación Ca/P(0h): 0,28, Ca/P(1,5h):1,28 y la relación Ca/P(72h):1,48; la relación Ca/P a 72 h en SBF se encuentra cercana a la relación de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano [183]. Se considera que el Ca se enriquece inicialmente en la superficie de la muestra en una competencia con los iones fosfato, el mecanismo de precipitación se debería principalmente a la contribución electrostática por la presencia de los grupos OH⁻ y en menor medida por el intercambio de los iones Ca y P presentes en la superficie producto de la adhesión de las partículas utilizadas en el tratamiento de blastinizado [114].

Del análisis de la muestra BAPQ y teniendo en cuenta que presenta una alta cristalinidad dominada por las características de la fase anatasa (figura 4.1.2.1.1), lo que implicaría una mayor capacidad de nucleación de apatita [184]; solo presentó áreas con muy poca o nula presencia de un precipitado no homogéneo de una posible apatita (figura 4.1.6.1 (c)) [130]. Luego de la inmersión en SBF durante 1.5 h (figura 4.2.7.2) se produce un descenso en los porcentajes atómicos de los iones Ca, P, Ti y un aumento en la concentración atómica de O, además se detecta la presencia de C y Na. Pasadas las 72 h de inmersión, se muestra que las concentraciones atómicas de Ca, P, Na aumentan y se produce un descenso en

la concentración de C, O y Ti. La relación Ca/P(0h):1.12, Ca/P(1.5h) :0.91 y la relación Ca/P(72h) :1.11, la relación Ca/P disminuye en el periodo inicial de inmersión (1.5h) y luego vuelve a aumentar a las 72 h en SBF llegando a una relación similar a la inicial; este valor se encuentra muy lejano al valor de la relación de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano [183]. Se considera que el mecanismo de precipitación de una posible apatita se debería inicialmente a una desorción de los elementos Ca y P sin un aporte electrostático de los grupos OH; se cree que la superficie no tiene grupos hidroxilos básicos o ácidos en el periodo inicial con lo cual la cinética de precipitación sería más lenta que si se dieran los dos mecanismos juntos. A medida que aumenta el tiempo de inmersión se produce la adsorción de los iones calcio y fosfato de la solución de SBF [185].

Por otro lado, las muestras BNa y BAPQNa presentaron una diferencia notable debido a la presencia de un precipitado homogéneo que cubre todas las superficies. Como se puede observar en la figura 4.1.6.1 (b) y (d), se evidencia la presencia de precipitados esféricos, formando una red porosa con partículas aciculares homogéneamente distribuidas con fisuración en toda la superficie [130].

Con respecto a la muestra BAPQNa, en el periodo inicial de inmersión de 1.5 h (figura 4.1.6.2) se evidencia un leve aumento en la concentración de P y O, la concentración de Ca se mantiene relativamente constante; además se detecta la presencia de C y Na. Luego de las 72 h de inmersión en SBF aumentan las concentraciones de Ca y P, disminuyen las concentraciones de C, O, Na; se identifica la presencia de Mg y no se evidencia la presencia de Ti. La relación Ca/P(0h):12.3, Ca/P(1.5h):3.69 y la relación Ca/P(72h) :1.49, la relación Ca/P disminuye a medida que aumenta el tiempo de inmersión en SBF, este valor se encuentra cercano al valor de la relación de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano [183]. El mecanismo de precipitación en un primer periodo (1.5h) se debería al intercambio de los iones Na⁺ de la superficie con la absorción de grupos

fosfatos de la solución de SBF, se considera que no hay contribución electrostática de los grupos OH⁻ (anatasa cristalina). Luego del periodo inicial de inmersión, la nucleación y crecimiento de apatita se daría por el intercambio iónico de los iones Na⁺ de la superficie con los iones Ca²⁺, PO₄²⁻ con contribución del mecanismo electrostático de los grupos OH⁻ provenientes del hidrogel de titanato de sodio [182], [186].

La muestra BNa en el periodo inicial de inmersión 1.5 h (figura 4.1.6.2) evidencia un aumento en las concentraciones de O, P y Ca, además se detecta la presencia de C y Mg. Luego de las 72 h de ensayo, aumentan las concentraciones de Ca, P y Mg; se produce una disminución en la concentración de C, O, Na y no se detecta la presencia de Ti. La relación Ca/P(0h):56, Ca/P(1.5h) :1.69 y la relación Ca/P(72h) :1.37; la relación Ca/P disminuye a medida que aumenta el tiempo de inmersión en SBF, este valor se encuentra cercano al valor de la relación de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano [183]. El mecanismo de precipitación se debería a la nucleación y crecimiento de apatita a partir del intercambio iónico de los iones Na⁺ de la superficie con los iones Ca²⁺, PO₄²⁻ con la contribución electrostático de los grupos OH⁻ provenientes del hidrogel de titanato de sodio [182], [186].

La hidroxiapatita es un mineral de fosfato de calcio con fórmula química Ca₅(PO₄)₃(OH). En el entorno biológico, la presencia de CO₂ provoca sustituciones en su red cristalina, donde los iones fosfato son reemplazados por iones carbonato, dando lugar a la hidroxiapatita Tipo B. Por otro lado, la hidroxiapatita Tipo A se forma cuando los iones carbonato sustituyen a los iones hidroxilo en la red cristalina. Esta sustitución es comúnmente encontrada en hidroxiapatitas sintéticas. Se considera que la muestra BNa presentará una hidroxiapatita tipo B con menor cristalinidad y con un alto grado de carbonatación (hidroxiapatita

cercana a la biológica) y la muestra BAPQNa una hidroxiapatita tipo A-B con mayor grado de cristalinidad y menor de carbonatación [114].

Tabla 4.1.6.1. Relaciones Ca/P de los distintos sustratos luego de la inmersión a 1.5 y 72 horas de inmersión en SBF.

Muestras	Ca/P (1.5h)	Ca/P (72 h)
B	1,28	1,48
BNa	1,69	1,37
BAPQ	0,91	1,11
BAPQNa	3,69	1,49

Hidroxiapatita relación Ca/P = 1.67

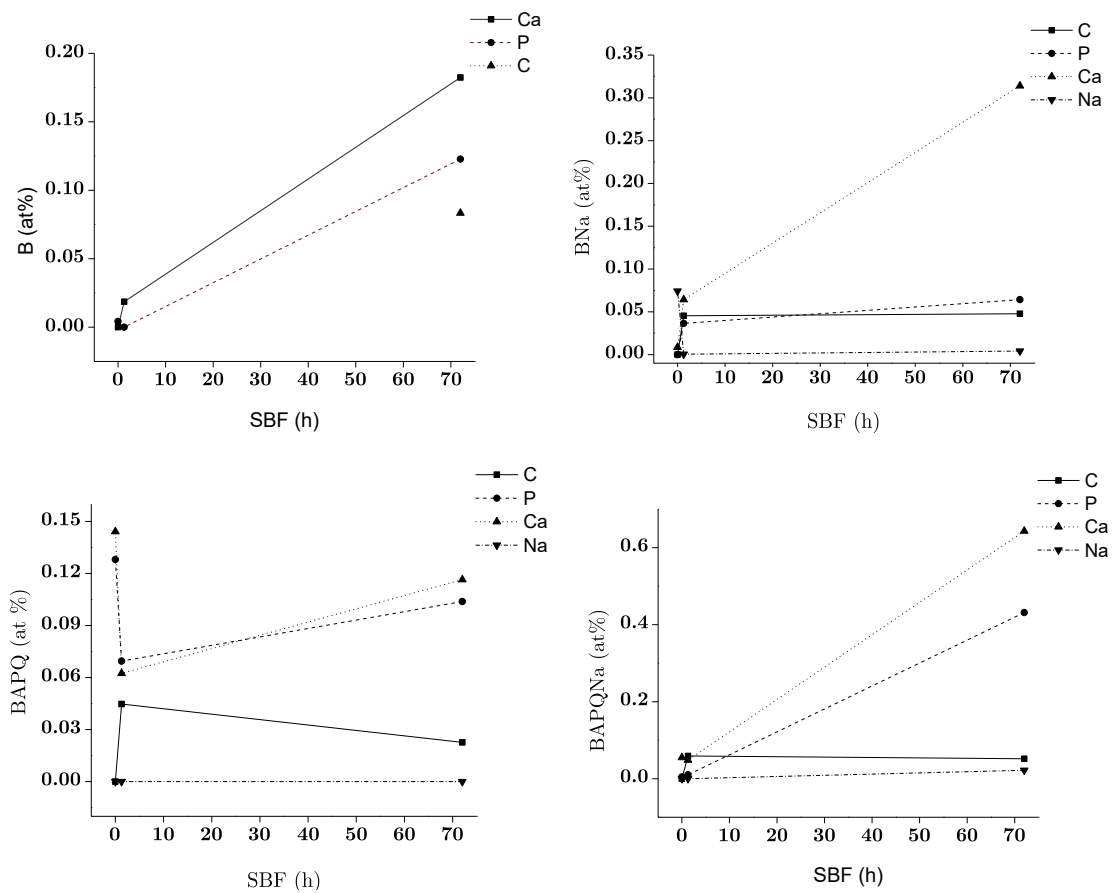


Figura 4.1.6.2. Datos de EDS de las muestras B, BNa, BAPQ y BAPQNa luego de la inmersión a 0, 1.5 y 72 horas en SBF.

4.2 CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se llevó a cabo la caracterización de las propiedades superficiales obtenidas mediante el tratamiento alcalino en dos superficies diferentes utilizadas en la industria de los implantes dentales: el blastinado con partículas de fosfato de calcio y el anodizado por plasma químico.

En primer lugar, la topografía, composición química y fases presentes en las superficies base se encuentran en concordancia con la literatura consultada y el tratamiento alcalino posterior generó un hidrogel de titanato de sodio nanoporoso.

Los resultados obtenidos de los parámetros de rugosidad de las superficies indican que las superficies se encuentran dentro de las condiciones de rugosidad establecidas en la bibliografía ($S_a=1-2 \mu\text{m}$). Sin embargo, teniendo en consideración que ese único parámetro no permite realizar una caracterización de la topografía superficial de manera completa, se analizaron otros parámetros como la dimensión fractal y los parámetros funcionales. En este caso, la muestra que se considera que presentó la mejor topografía es la muestra blastinada con tratamiento alcalino que, además, posee menor anisotropía. Este resultado se contrastó con los resultados obtenidos del resto de las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo de tesis.

La mojabilidad de las superficies mejora considerablemente luego de efectuar el tratamiento alcalino y, en el caso de la muestra de anodizado con plasma químico, pasa de ser hidrofóbica a hidrofílica.

Los resultados de potencial zeta indican que las superficies son reactivas en el medio SBF, siendo la muestra blastinada la menos reactiva y más estable. El tratamiento alcalino posterior incrementa la reactividad en ambos tratamientos base.

Por último, la bioactividad *in-vitro* se evaluó sumergiendo las muestras durante 1.5 h y 72 h en fluido corporal simulado (SBF). Se observó la precipitación de una posible apatita en las superficies con tratamiento alcalino cuya morfología se corresponde con la establecida en la literatura. Las superficies base sin tratamiento alcalino presentaron zonas con poca o nula precipitación de la posible apatita.

CAPITULO 5

CARACTERIZACION SUPERFICIAL DE TRATAMIENTOS TERMICOS POSALCALINOS EN IMPLANTES DENTALES DE TITANIO BIOACTIVOS

Uno de los objetivos principales buscados durante un procedimiento médico dental consiste en lograr una fijación estable en la interfaz hueso-implante y tejido blando-implante. Lograr una unión fisicoquímica a partir del uso de biomateriales bioactivos y biocompatibles en el medio bucal es uno de los factores importantes para asegurar el éxito o fracaso a largo plazo.[187].

Como se mencionó en el capítulo 4, dentro de los tratamientos superficiales utilizados en implantes dentales de titanio que provee condiciones favorables para lograr una adecuada osteointegración se encuentra el tratamiento alcalino en NaOH. El tratamiento alcalino genera en la superficie del implante una capa de hidrogel de titanato de sodio amorfo, nanoestructurado, bioactivo y biocompatible [123], [124]. Sin embargo, el hidrogel de titanato de sodio formado presenta una adhesión insuficiente al sustrato [62], [63], [188]; por lo cual, es necesario realizar un tratamiento térmico posterior a alta temperatura que transforme el hidrogel de titanato de sodio en un titanato de sodio mecánicamente más estable [62], [63]. El hidrogel de titanato de sodio amorfo sometido a un tratamiento térmico en el rango de temperatura entre 400 y 800 °C experimenta un proceso de densificación y cristalización, transformándose completamente en titanato de sodio cristalino y rutilo a 800 °C [189]. A medida que aumenta la temperatura de tratamiento térmico disminuye la bioactividad in-vitro de la capa de titanato de sodio cristalino en la formación de apatita cuando es inmersa en SBF. La disminución de la bioactividad se atribuye a una menor liberación e intercambio de los iones Na⁺

por los iones H_3O^+ en SBF y en consecuencia una menor formación de grupos OH los cuales inducen la nucleación de apatita.[189], [190].

En este capítulo se describen las tareas realizadas como parte del trabajo de tesis orientadas al estudio y a la comparación de las propiedades superficiales bioactivas obtenidas al realizar un tratamiento alcalino y térmico sobre muestras blastinizadas con partículas biocompatibles (RBM) y anodizado por plasma químico (APQ) ambas con tratamiento alcalino en NaOH y tratamiento térmico a 400, 600 y 800 °C. Las técnicas de caracterización utilizadas fueron SEM, EDS, Potencial Z, Espectroscopía Raman, Ensayo de Adhesión Rockwell C Medición de Ángulo de Contacto y SBF.

5.1 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1.1 Topografía Superficial, composición y espesor

En las figuras 5.1.1.1 y 5.1.1.2 se muestran las micrografías SEM de las distintas condiciones sometidas a un tratamiento alcalino y térmico a alta temperatura. Se revela la formación de una estructura de red tridimensional [135], según literatura esta estructura podría identificarse como titanato de sodio y óxido de titanio TiO_2 [62]. Se considera que la generación de nanoestructuras graduadas reproduce las estructuras jerárquicas de los tejidos óseos, proporcionando una topografía superficial más adecuada para el desarrollo funcional de las células [191]. Cuando el titanio es tratado en NaOH, el sustrato reacciona con los iones de hidróxido para formar una capa de hidrogel de titanato de sodio amorfo; si posteriormente, las muestras son sometidas a un tratamiento a alta temperatura, la capa de hidrogel de titanato de sodio se deshidrata y densifica a medida que la temperatura aumenta de 400 °C a 800°C. Se evidencian cambios en la morfología de las muestras modificadas superficialmente (figura 5.1.1.1 y 5.1.1.2) a medida que aumenta la temperatura de 400 °C a 800 °C; entre 400-600 °C la estructura

nanoporosa no sufre cambios significativos, sin embargo, a 800 °C se observa que los espacios vacíos de la estructura nanoporosa fueron ocupados por un depósito el cual según literatura correspondería a la fases rutilo y a titanato de sodio cristalino [192]. Del análisis de las secciones transversales (figura 5.1.1.1 y 5.1.1.2) se observaron variaciones en los espesores, la interfaz titanio-recubrimiento presento una morfología más densa, con una morfología más porosa en la superficie a medida que aumenta la temperatura [190].

Tabla 5.1.1.1. Porcentaje atómico de las distintas superficies tratadas térmicamente

Muestra	Ti (%at)	O (%at)	Ca (%at)	P (%at)	Na (%at)
BNa ₄₀₀	34,34±1,82	62,32±1,47	0,37±0,08		2,97±0,58
BAPQNa ₄₀₀	26,81±5,93	65,87±4,69	3,39±1,11	0,25±0,10	3,68±0,59
BNa ₆₀₀	29,82±5,65	67,47±5,41	0,27±0,05		2,44±0,31
BAPQNa ₆₀₀	27,15±8,48	64,66±9,32	4,67±1,48	0,45±0,34	3,07±1,08
BNa ₈₀₀	30,58±3,33	68,85±3,45	0,56±0,14		
BAPQNa ₈₀₀	28,21 ±1,88	60,57±2,16	7,34±3,51	0,87±0,43	

Tabla 5.1.1.2. Porcentaje en peso de las distintas superficies tratadas térmicamente

Muestra	Ti (%wt)	O (%wt)	Ca (%wt)	P (%wt)	Na (%wt)
BNa ₄₀₀	60,33±1,98	36,61±1,56	0,55±0,12		2,51±0,52
BAPQNa ₄₀₀	49,71±7,61	41,31±5,52	5,36±	0,30±0,10	3,31±0,74
BNa ₆₀₀	55,17±6,51	42,21±6,14	0,42±0,08		2,20±0,39
BAPQNa ₆₀₀	49,17±9,25	40,44±9,77	7,08±1,45	0,51±0,32	2,79±1,2
BNa ₈₀₀	56,47±3,7	42,65 ±3,86	0,87±0,19		
BAPQNa ₈₀₀	50,1±0,85	38,02±5,66	10,77±4,69	0,99 ±0,44	

Tabla 5.1.1.3. Espesores de los recubrimientos medidos a partir de MEB de las muestras BNa, BAPQNa, BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800.

Muestra	Espesor (µm)
BNa	1.62±0.58
BAPQNa	8.19±1.63
BNa400	1.79±0.58
BAPQNa400	7.06±1.35
BNa600	6.13±1.93
BAPQNa600	12.06±1.91
BNa800	6.83±2.41
BAPQNa800	10.62±1.75

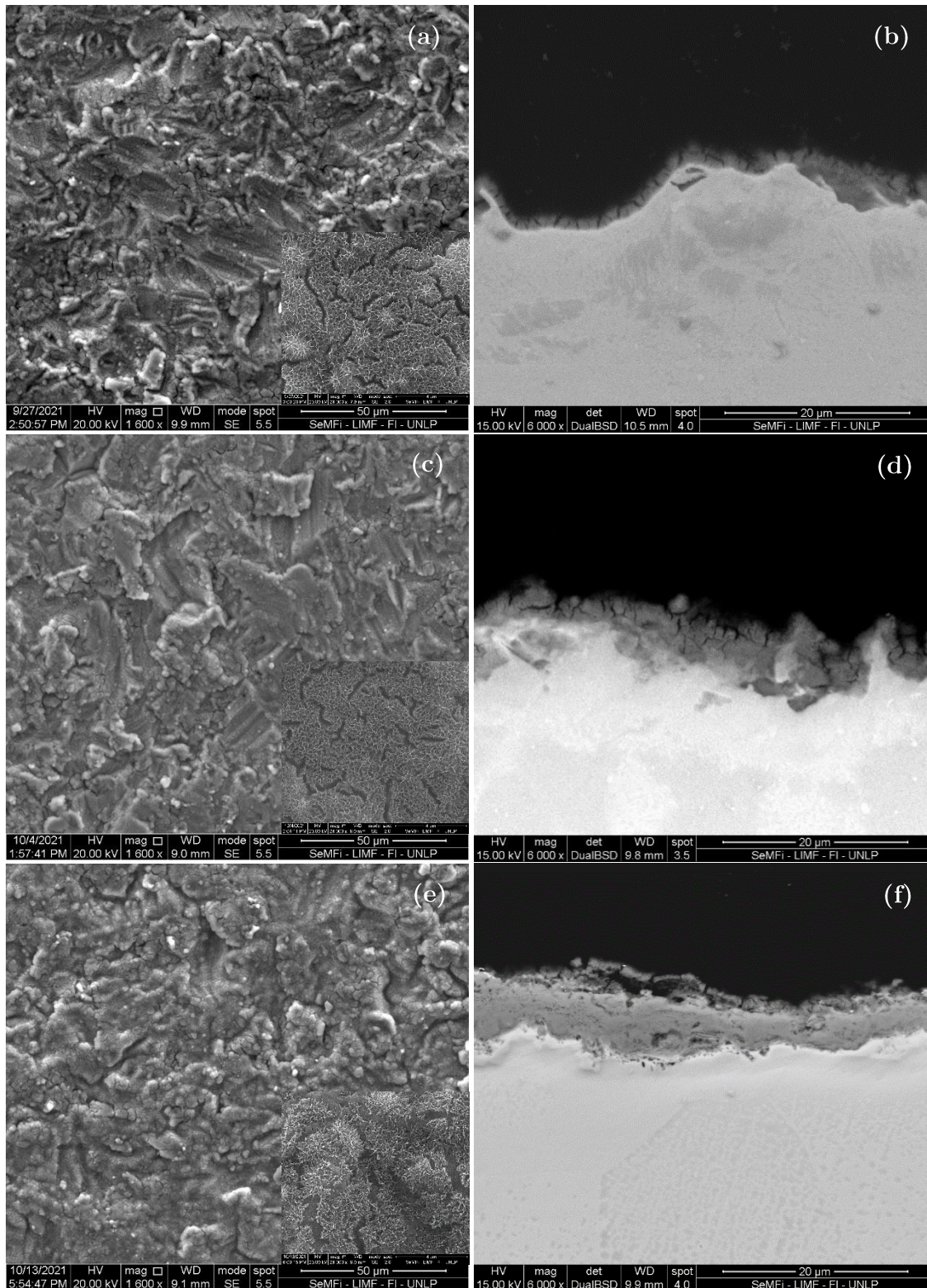


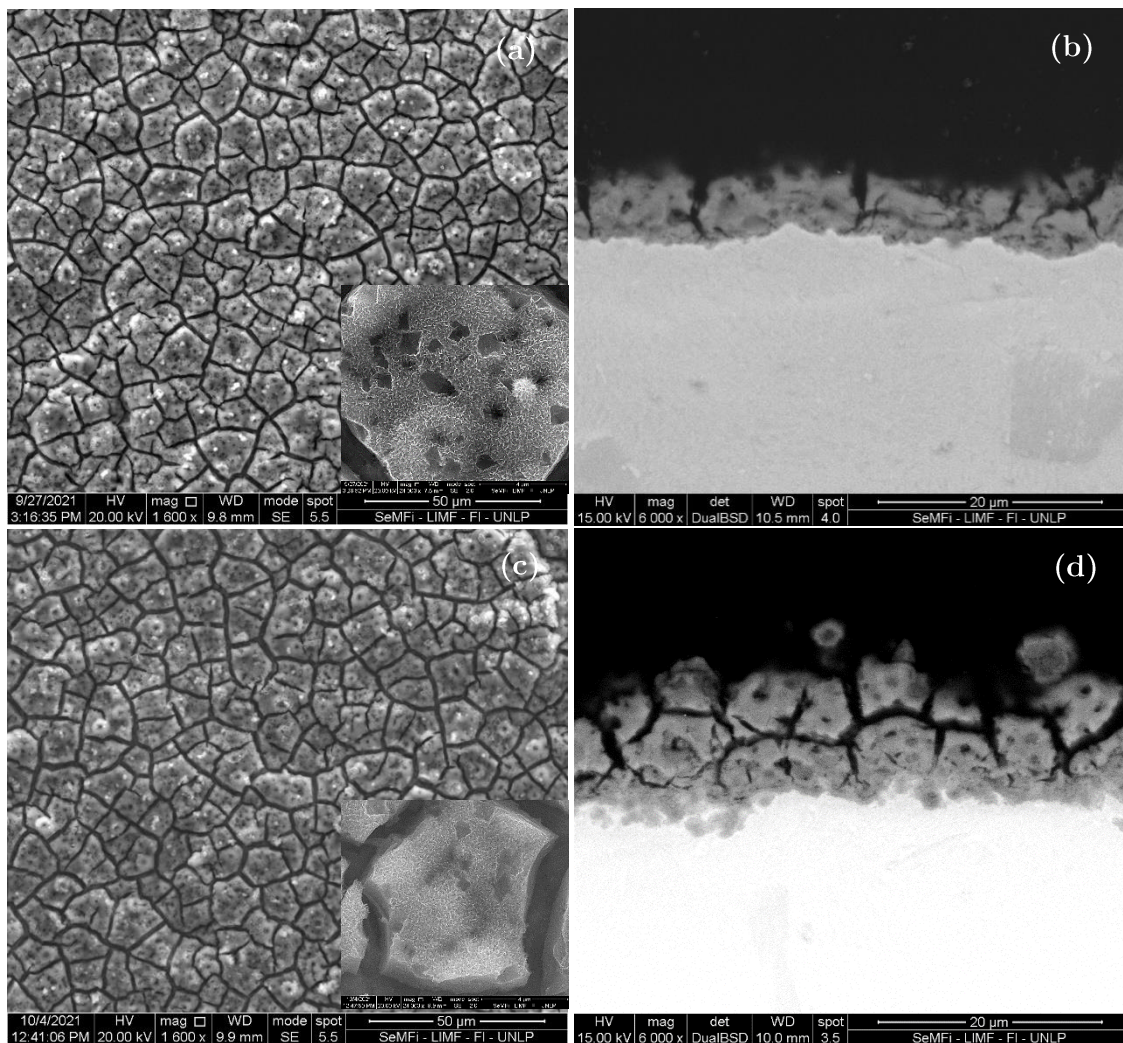
Figura 5.1.1.1. Imágenes SEM de la topografía superficial y transversal de las muestras BNa400(a, b), BNa600(c, d), BNa800(e, f). Las muestras presentan una estructura de red tridimensional con fisuras que recorren toda la superficie producto del tratamiento alcalino y térmico.

La muestra BNa400 (figura 5.1.1.1 (a, b)), exhibe la estructura nanoporosa característica del titanato de sodio, con fisuras distribuidas en toda la superficie. Al comparar esta topografía con la obtenida en la muestra BNa (figura 4.1.1.1), no se observan cambios sustanciales. Sin embargo, al analizar los espesores de los recubrimientos (figura 5.1.1.1(b), tabla 5.1.1.3) y compararlos con el valor obtenido para la muestra BNa ($1.62 \pm 0.58 \mu\text{m}$), se nota un leve incremento en la muestra BNa400 ($1.79 \pm 0.58 \mu\text{m}$). En relación con los datos derivados de EDS (tabla 5.1.1.2), se destaca una disminución de aproximadamente el 39% en la concentración de Na en la muestra BNa400 en comparación con la muestra BNa (tabla 4.1.1.2). Este resultado indica una variación significativa en la composición química entre ambas muestras.

La muestra BNa600 (figura 5.1.1.1 (c, d)), presenta características morfológicas idénticas a las de la muestra BNa400; no obstante, se observa que las fisuras distribuidas en toda la superficie se vuelven ligeramente más anchas [137]. Se destaca un marcado aumento en el espesor del recubrimiento de la muestra BNa600 ($6.13 \pm 1.93 \mu\text{m}$) en comparación con la muestra BNa ($1.62 \pm 0.58 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3). Al evaluar los datos obtenidos mediante EDS (tabla 5.1.1.2), se evidencia una disminución del aproximadamente 46% en la concentración de Na en la muestra BNa600 en comparación con la muestra BNa (tabla 4.1.1.2). Este resultado indica una significativa variación en la composición química entre ambas muestras.

La morfología superficial de la muestra tratada a 800 °C (BNa800) experimenta cambios notables. A pesar de mantener una estructura nanoporosa, se destaca la presencia de un depósito que ocupa los nanoporos y las fisuras [137]. Las fisuras en la superficie se amplían y se profundizan aún más [137] en comparación a la muestra BNa600. En cuanto al espesor del recubrimiento en la muestra BNa800

(6.83 ± 2.41 , tabla 5.1.1.3), se observa un considerable aumento en comparación con la muestra BNa ($1.62 \pm 0.58 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3). Es importante señalar que no se detectó la presencia de Na en la superficie de la muestra BNa800. Este resultado indica una transformación significativa en la composición superficial, y sugiere que el tratamiento térmico a $800 \text{ }^\circ\text{C}$ ha impactado considerablemente en la estructura y la composición de la muestra.



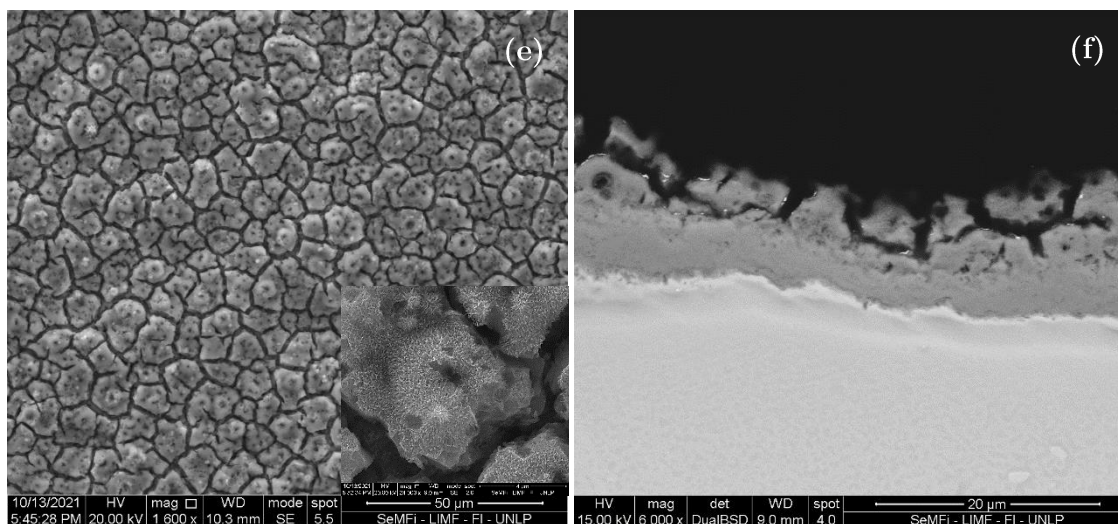


Figura 5.1.1.2. Imágenes MEB de la topografía superficial y transversal de las muestras BAPQNa400 (a,b), BAPQNa600 (c,d), BAPQNa800 (e,f) (1600 y 24000 x). Las muestras presentan una estructura de red tridimensional con fisuras que recorren toda la superficie producto del tratamiento alcalino.

No se observan cambios notables en la topografía de la muestra BAPQNa400 (figura 5.1.1.2 (a, b)) en comparación con la muestra BAPQNa (figura 4.1.1.1(d)), mantiene la estructura tridimensional con poros de tamaño nanométrico resultantes del tratamiento alcalino en NaOH, además, de la presencia de los microporos generados durante el tratamiento de anodizado por plasma químico [127]–[129]. Del análisis de los espesores, se nota una reducción en el espesor de la muestra BAPQNa400 (7.06 ± 1.35 , tabla 5.1.1.3) en comparación con el espesor de recubrimiento obtenido en la muestra BAPQNa ($8.19 \pm 1.63 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3). La evaluación de los datos de EDS (tabla 5.1.1.2) revela una disminución de aproximadamente el 36% en la concentración de Na en comparación con la muestra BAPQNa (tabla 4.1.1.2).

La muestra BAPQNa600 (figura 5.1.1.2 (c, d)), presenta características morfológicas similares a las de la muestra BAPQNa400; no obstante, se observa que las fisuras que forman la capa craquelada se aumentan en ancho y profundidad [137]. Se destaca un incremento en el espesor de la muestra BAPQNa600 ($12.06 \pm 1.91 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3) en comparación con la muestra BAPQNa

($8.19 \pm 1.63 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3). La evaluación de los datos de EDS indica una disminución de aproximadamente el 46% en la concentración de Na en la muestra BAPQNa600 en comparación con la muestra BAPQNa (tabla 4.1.1.2).

La morfología superficial de la muestra BAPQNa800 (figura 5.1.1.2 (e, f)) conserva la estructura tridimensional con poros de tamaño nanométrico. No se observa la presencia de un depósito que llene los espacios vacíos y las fisuras que conforman la superficie craquelada. No obstante, tanto el ancho como la profundidad de las fisuras que componen la capa craquelada aumentan con el incremento de la temperatura. Se registra un incremento en el espesor de la muestra BAPQNa800 ($10.62 \pm 1.75 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3) en comparación con la muestra BAPQNa ($8.19 \pm 1.63 \mu\text{m}$, tabla 5.1.1.3). Es relevante señalar que no se detectó la presencia de Na en la superficie de la muestra BAPQNa800 (tabla 5.1.1.2). Este resultado indica una transformación significativa en la composición superficial, sugiriendo que el tratamiento térmico a $800 \text{ }^\circ\text{C}$ ha influido de manera sustancial en la estructura y composición de la muestra.

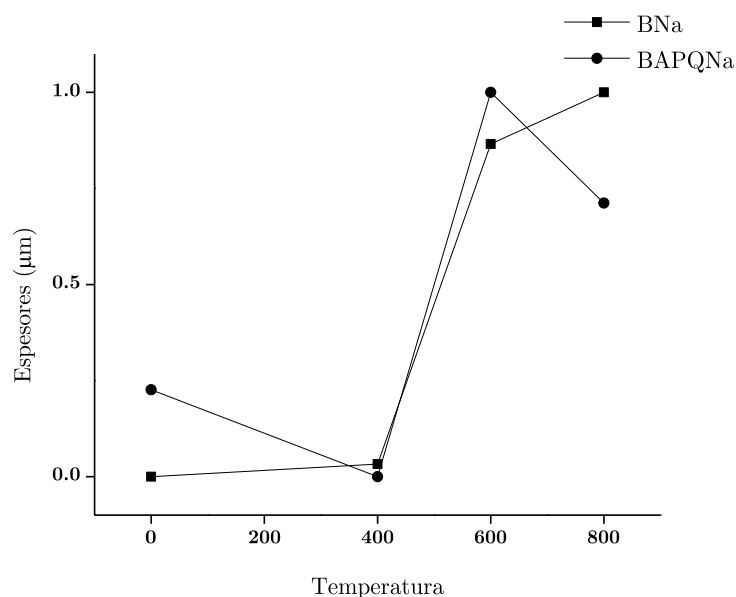
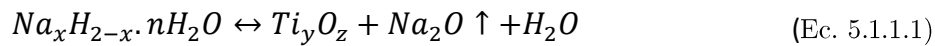


Figura 5.1.1.3. Variación del espesor del recubrimiento con la temperatura de tratamiento térmico.

De la comparación entre los distintos sustratos tratados térmicamente, las muestras BNa400/600/800 mostraron la presencia de un depósito que cubría los nanoporos y las fisuras. A medida que aumenta la temperatura de tratamiento de 400°C a 800°C el hidrogel de titanato de sodio se deshidrata [193], lo cual se evidencia por el aumento en el ancho y profundidad de las fisuras presentes en la superficie de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800 (Figura 5.1.1.1 y 5.1.1.2). Del cotejo de los espesores de los distintos sustratos (BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800, figura 5.1.1.3) con respecto a las muestras sin tratamiento térmico (BNa y BAPQNa, figura 5.1.1.3), las muestras BNa400/600/800 presentan un incremento inicial del ~10% del espesor del recubrimiento a 400°, luego un incremento del 278% del espesor a 600 °C y de 322% a 800°C. Sin embargo, las muestras BAPQNa400/600/800 presentan un descenso del ~14% del espesor del recubrimiento a 400°, luego se produce un aumento del ~47% del espesor a 600 °C y un aumento ~30% a 800 °C.

La concentración de Na se reduce con el incremento de la temperatura, se considera que el titanato de sodio se descompone y se elimina Na₂O al entorno mediante sublimación. De acuerdo a la ecuación 5.1.1.1, se cree que el sodio se eliminó completamente de la capa de titanato de sodio a 800 °C (Tabla 5.1.1.2) desplazando la reacción completamente hacia la derecha [190]. Reacción de descomposición de titanato de sodio[164].



La liberación de iones sodio disminuye con el reordenamiento estructural a medida que aumenta la temperatura, resultando en un densificación del recubrimiento compuesto por titanato de sodio cristalino y rutilo [164], [192].

5.1.2 Composición de fases

En las figuras 5.1.2.1 (BNa, BNa400/600/800) y 5.1.2.2 (BAPQNa, BAPQNa400/600/800) se presentan los espectros Raman de las muestras que fueron expuestas a un tratamiento alcalino y térmico.

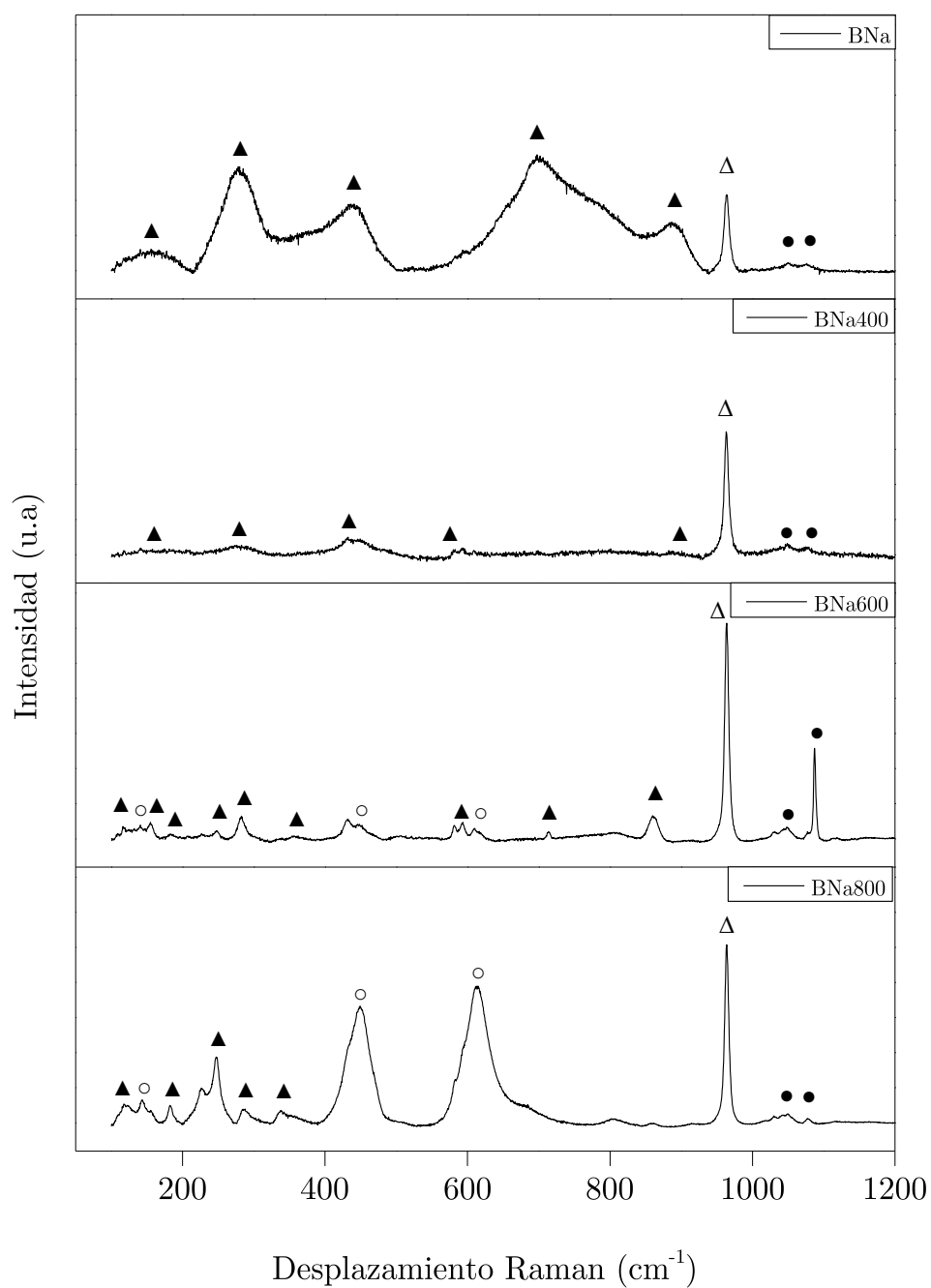


Figura 5.1.2.1. Espectros Raman de las muestras BNa, BNa400, BNa600 y BNa800 (▲: $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, Δ : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ●: Na_2CO_3 , ○: TiO_2 -Rutilo)

La muestra BNa400 presenta 8 modos normales de vibración 5 modos corresponderían a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), dos modos a la fase de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y un modo a la fase fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Las señales presentes a 158 y 278,2 cm^{-1} corresponden al modo de estiramiento simétrico B_g atribuido a la vibración de Ti-O-Na^+ , la señal a 441 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrico A_g atribuida a la vibración del enlace de Ti-O-Ti , la señal a 582.4 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento anti-simétrico B_g atribuido a la vibración de los enlaces Ti-O_7 , la señal a 888,2 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico A_g [140], [142], [143], todos pertenecientes a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). La señal intensa presente a 963 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico del enlace tetraédrico del grupo PO_4^{2-} atribuido a la vibración de los enlaces P-O [144], [145]. Las señales presentes a 1052 y 1083 cm^{-1} corresponderían a la vibración de estiramiento simétrico de los grupos carbonatos [153].

La muestra BNa600 presenta 15 modos normales de vibración, 9 modos corresponderían a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), 3 modos a la fase rutilo del TiO_2 , 2 modos a la fase de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y un modo a la fase fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Las señales a 116.4, 154.8, 183.4, 282.8 cm^{-1} corresponderían al modo de estiramiento simétrico B_g atribuido a la vibración de los enlaces O3-Na-O6, Ti-O-Na^+ , O4-Ti2-O5, la señal a 247.75 cm^{-1} correspondería al modo de flexión antisimétrico A_g atribuida a la vibración del enlace Na-O3, la señal a 356.2 cm^{-1} correspondería al modo de flexión A_g atribuida a la vibración del enlace O2-Ti2-O3, la señal a 580.1 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento anti-simétrico B_g atribuido a la vibración de los enlaces Ti-O-Ti y Ti-O_7 , la señal a 713.4 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrico A_g atribuido a la vibración del enlace O-Ti-O4, la señal a 862,2 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico A_g [140], [142], [143]; todos correspondientes a la fase de

titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). La señal a 143.4 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrica B_{1g} , la señal a 447.2 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico B_g y la señal a 611 cm^{-1} correspondería a la flexión antisimétrica A_{1g} todos relacionados al enlace O-Ti-O correspondientes a la fase rutilo del TiO_2 [149]

La muestra BNa800 presenta 11 modos normales de vibración, 5 modos corresponderían a la fase titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), 3 modos a la fase rutilo del TiO_2 , 2 modos a la fase carbonato de sodio (Na_2CO_3) y un modo a la fase fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Las señales a 117.9 , 182.6 , 287.7 cm^{-1} corresponderían al modo de estiramiento simétrico B_g atribuido a la vibración de los enlaces O3-Na-O6, Ti-O-Na+, O4-Ti2-O5, la señal a 247.7 correspondería al modo de flexión antisimétrico A_g atribuida a la vibración del enlace O2-Ti2-O3 [140], [142], [143]; todos correspondientes a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). La señal a 143.8 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrica B_{1g} , la señal a 447.3 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico B_g y la señal a 618.8 cm^{-1} correspondería a la flexión antisimétrica A_{1g} todos relacionados al enlace O-Ti-O correspondientes a la fase rutilo del TiO_2 [149].

La muestra tratada a $400\text{ }^\circ\text{C}$ (BNa400) presentó señales que corresponderían a las fases titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), carbonato de sodio (Na_2CO_3) y fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$); se produjo un descenso en la intensidad y en el ancho de los picos de titanato de sodio a 400°C con la desaparición de la señal encontrada a 696 cm^{-1} en la muestra BNa, esto se debería a la deshidratación del hidrogel de titanato de sodio y la liberación de iones sodio con el consecuente reordenamiento estructural [164], [192]. La existencia de picos anchos y de baja intensidad, indicarían que el titanato de sodio presenta propiedades amorfas o microcristalinas [148]. A medida que aumenta la temperatura de 400 a $800\text{ }^\circ\text{C}$, las señales de la fase de titanato de sodio se vuelven más intensas y delgadas; además, a partir de 600°C (BNa600) se detecta la presencia de la fase rutilo del TiO_2 con

lo cual se verifica la transformación de la fase amorfa del hidrogel de titanato de sodio a titanato de sodio cristalino. Así mismo, hay señales correspondientes a la fase de titanato de sodio que no son detectadas a 800°C (BNa800), esto se debería a la liberación de sodio al medio mediante sublimación a medida que aumenta la temperatura (Ec. 5.1.1.1). En todas las muestras (BNa400/600/800) se detectaron señales que corresponderían a las fases fosfato de calcio y carbonato de sodio, la presencia del grupo fosfato provendría de la adhesión de las partículas utilizadas en el tratamiento de blastinizado (Tabla 4.1.1.2); la presencia del grupo carbonato de sodio en las superficies se atribuiría a la formación durante el secado [154].

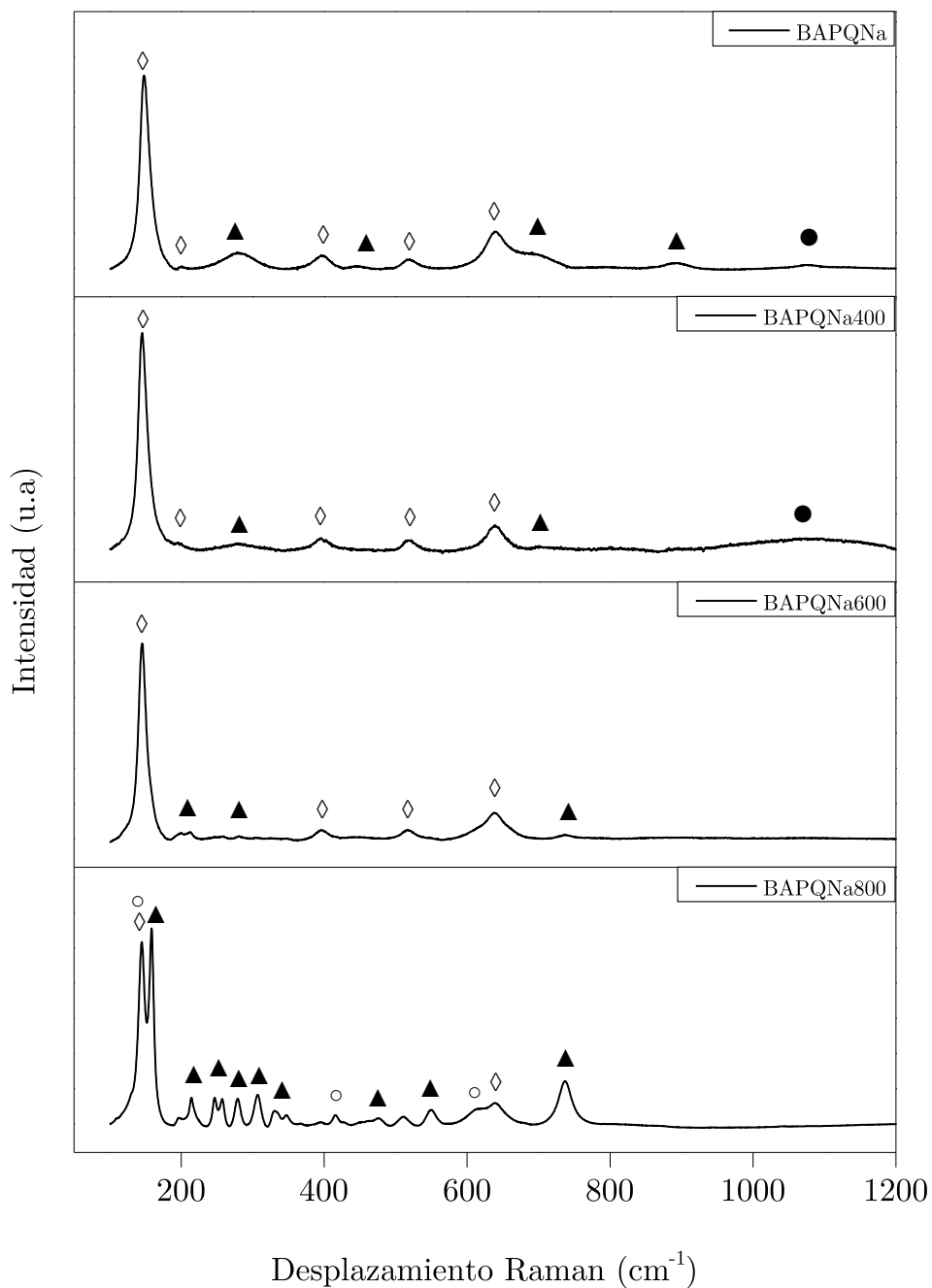


Figura 5.1.2.2. Espectros Raman de las muestras BAPQNa, BAPQNa400, BAPQNa600 y BAPQNa800 ((\blacktriangle : $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, \triangle : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, \bullet : Na_2CO_3 , \diamond : TiO_2 -Anatasa, \circ : TiO_2 -Rutilo)

La muestra BAPQNa400 (figura 5.1.2.2) presenta 8 modos normales de vibración, cinco modos corresponderían a la fase anatasa del TiO_2 , dos modos a la fase titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) y un modo a la fase carbonato de sodio (Na_2CO_3).

Las señales a 147.6, 196.7 y 638.4 cm^{-1} corresponderían a los 3 modos de estiramiento simétrico E_g , la señal a 395.9 cm^{-1} correspondería a uno de los modos de flexión simétrica B_{1g} y la señal a 516.6 cm^{-1} correspondería a un doblete formado por el modo de flexión simétrica B_{1g} y el modo de flexión antisimétrica A_{1g} todos relacionados al enlace O-Ti-O [149] todos correspondientes a la fase anatasa del TiO_2 . La señal a 279.7 cm^{-1} correspondería al modo de estiramiento simétrico B_g atribuido al enlace Ti-O- Na^+ , la señal a 700.8 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrica A_g atribuido al enlace O-Ti-O₄, las dos vibraciones correspondientes a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_4$)[142], [194]. La señal presente a 1090 cm^{-1} correspondería a la vibración de estiramiento simétrico correspondiente a la fase de carbonato de sodio (Na_2CO_3) [153].

La muestra BAPQNa600 presenta 7 modos normales de vibración, cuatro corresponderían a la fase anatasa del TiO_2 y tres modos a la fase titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). Las señales a 144.6 y 637.7 cm^{-1} corresponderían a los 2 modos de estiramiento simétrico E_g , la señal a 396.2 cm^{-1} correspondería a uno de los modos de flexión simétrica B_{1g} y la señal a 517.3 cm^{-1} correspondería a un doblete formado por el modo de flexión simétrica B_{1g} y el modo de flexión antisimétrica A_{1g} correspondientes al enlace O-Ti-O [149], todos relacionados a la fase anatasa del TiO_2 . Las señales a 212.7 y 281.3 cm^{-1} corresponderían al modo de flexión antisimétrica A_g y al modo de estiramiento simétrico B_g atribuido a los enlaces Na-O₃ y Ti-O- Na^+ , la señal a 737.7 cm^{-1} correspondería al modo de flexión simétrica A_g atribuido al enlace O-Ti-O₄, las dos vibraciones correspondientes a la fase de titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_4$)[142], [194].

La muestra BAPQNa800 presenta 15 modos normales de vibración, tres modos corresponderían a la fase anatasa, tres modos a la fase rutilo del TiO_2 y nueve modos corresponderían a la fase titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_4$). La señal a 145 cm^{-1}

¹ correspondería al modo de flexión simétrica B_{1g} de la fase rutilo y al modo de estiramiento simétrico E_g de la fase anatasa del TiO_2 , la señal a 414.9 cm^{-1} y la señal a 612.1 cm^{-1} corresponderías al modo de estiramiento simétrico E_g y al modo de flexión antisimétrica A_{1g} correspondientes a la fase rutilo, la señal a 511.2 cm^{-1} correspondería a un doblete formado por el modo de flexión simétrica B_{1g} y el modo de flexión antisimétrica A_{1g} y la señal a 638.8 cm^{-1} corresponde al modo de estiramiento simétrico E_g correspondientes a la fase anatasa de TiO_2 , todas las vibraciones relacionadas al enlace O-Ti-O. La señal a 213.9 corresponderían al modo de flexión antisimétrica A_g relacionado al enlace Na-O3 y, las señales a 158.7 , 257.3 , 279 y 306.3 cm^{-1} corresponderían al modo de estiramiento B_g relacionados con los enlaces O-Na2-O4, Ti-O-Ti3, Ti-O-Na⁺ y O2-Ti2-O3, las señales a 331.1 , 476.6 , 550.8 , 737 cm^{-1} corresponderían al modo de flexión simétrica y antisimétrica relacionados con los enlaces O2-Ti2-O4, O2-Ti2-O3, Ti-O7 y O-Ti-O4 todos correspondientes a la fase de titanato de sodio ($Na_2Ti_3O_4$).

La muestra BAPQNa400 presentó señales que corresponderían a las fases anatasa (TiO_2) y titanato de sodio ($Na_2Ti_3O_7$). Se produjo un descenso en la intensidad y en el ancho de los picos de titanato de sodio a 400 °C con la desaparición de las señales encontradas a 443 y a 890.4 cm^{-1} en la muestra BAPQNa, esto se debería a la deshidratación del hidrogel de titanato de sodio y la liberación de iones sodio con el reordenamiento estructural [164], [192]. La presencia de señales anchas y de baja intensidad, indicarían que la fase titanato de sodio presenta propiedades amorfas o microcristalinas [148], a medida que aumenta la temperatura de 400 - 800 °C , las señales de la fase titanato de sodio se vuelven más delgadas lo cual confirmaría la cristalización de la fase. Las señales correspondientes a la fase anatasa del TiO_2 son identificadas en todo el rango de tratamiento (400 - 800 °C); además a 800 °C (BAPQNa800) se resolvieron señales correspondientes a la fase rutilo del TiO_2 . Se considera que la fase anatasa pura comienza a transformar

irreversiblemente a la fase rutilo a 600°C, de igual manera la transformación no es instantánea depende de la cinética de tratamiento [27]

5.1.3 Ensayo de adhesión Rockwell C

En la figura 5.1.3.1 se presenta el principio del método del ensayo de adhesión Rockwell C según VDI 3198 [100], mediante el cual se evaluó cualitativamente la resistencia y calidad adhesiva de las muestras en estudio BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800 (Figura 5.1.3.2)

Las muestras BNa400/600 (Figura 5.1.3.2 (a,c)) se clasificarían entre HF2-HF3 y las muestras BAPQNa400/600 (Figura 5.2.3.2(b,d)) se clasificarían entre HF3-HF4 presentando una falla aceptable del recubrimiento al sustrato. La muestra BNa800 (Figura 5.1.3.2 (e)) y la muestra BAPQNa800 (Figura 5.1.3.2(f)) se clasificarían como HF6 y HF5 resultando en una falla inaceptable del recubrimiento al sustrato base.

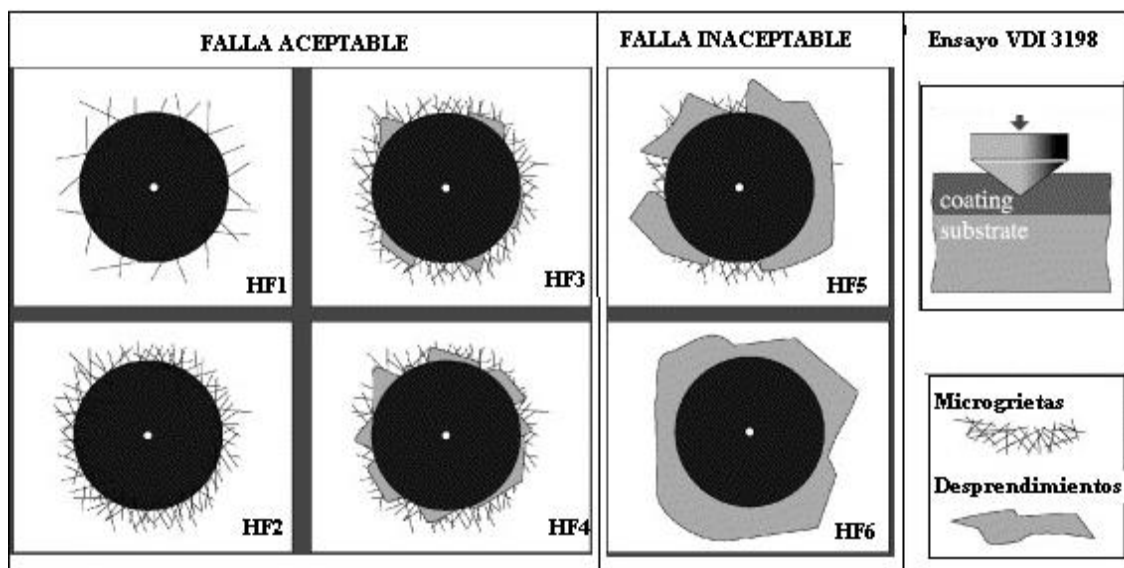
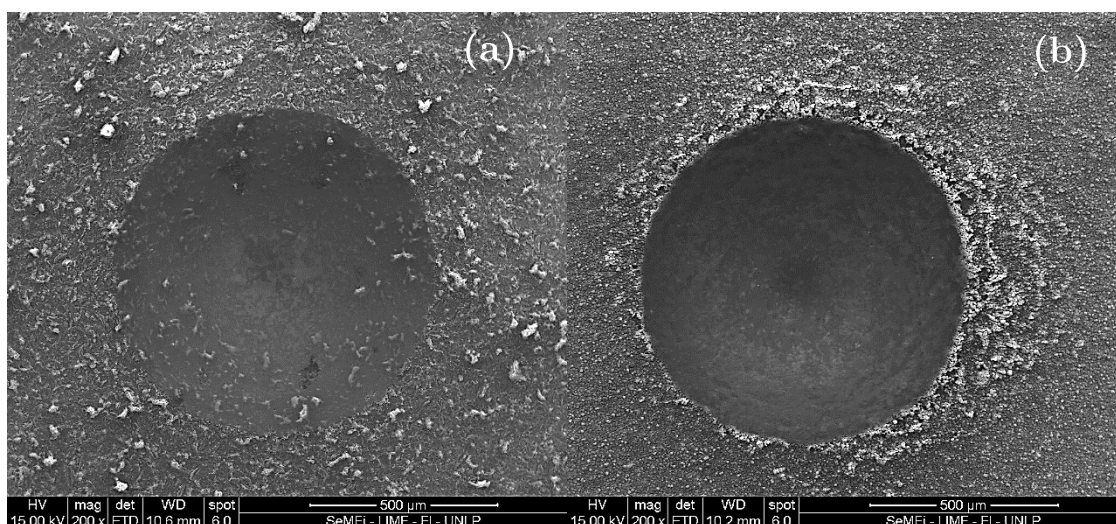


Figura 5.1.3.1. Clasificación de la calidad de adhesión según la norma VDI3198 [100].

Las muestras que fueron sometidas a un tratamiento térmico entre 400-600 °C (BNa400/600 , figura 5.1.3.2 (a,c)y BAPQNa400/600, figura 5.1.3.2(b,d)) presentaron una adhesión interfacial aceptable del recubrimiento al sustrato. Se

evidenciaron zonas donde los enlaces interfaciales eran fuertes y zonas donde los enlaces eran débiles. Las áreas con enlaces interfaciales fuertes eliminaban efectivamente las fallas por desprendimiento; en cambio, en las áreas donde los enlaces eran débiles, se producía la ruptura de los enlaces interfaciales entre el recubrimiento y el sustrato de titanio, con la consecuente generación de microfisuras radiales y microdelaminación del recubrimiento. Las muestras que fueron tratadas a 800 °C exhibieron una falla inaceptable del recubrimiento al sustrato, ya que los enlaces interfaciales entre el sustrato y el recubrimiento eran débiles, produciendo macrodelaminación del recubrimiento. Esto indicó un recubrimiento fuertemente adherente pero al mismo tiempo muy frágil [77], [181]. Al comparar los distintos sustratos, las muestras BNa400/600/800 presentaron un mejor comportamiento mecánico frente a las tensiones normales en comparación con las muestras BAPQNa400/600/800. A medida que aumentaba la temperatura, se observó un mayor ordenamiento de las fases presentes en los distintos recubrimientos, obteniéndose una mayor cristalinidad, lo cual provocó una mayor fragilidad del recubrimiento [155], [178].



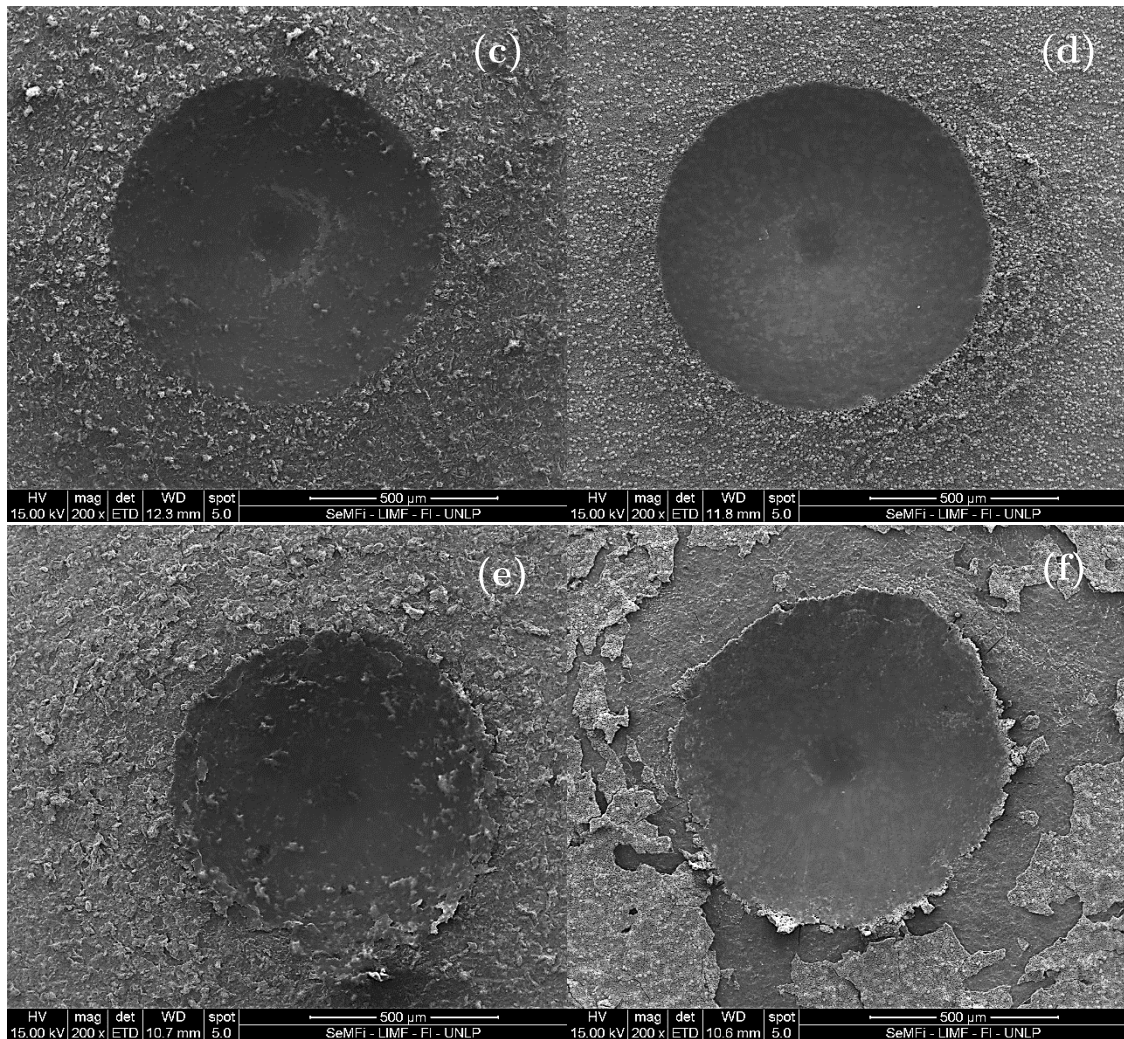


Figura 5.1.3.1. Imágenes MEB de las indentaciones obtenidas del ensayo de adhesión Rockwell C, en las muestras, BNa400(a), BAPQNa400(b), BNa600(c), BAPQNa600(d) BNa800(e), , y BAPQNa800(f)

5.1.4 Rugosidad

En la tabla 5.1.4.1 se presentan los valores obtenidos mediante el programa EZEImage [88] para los parámetros de rugosidad de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800. Todos los parámetros, excepto S_a , se calcularon a partir de las alturas relativas al plano medio de mínimos cuadrados. Se puede observar en la tabla 5.1.4.1 que los parámetros que presentan mayor variación entre los distintos tratamientos son S_{sk} y los parámetros funcionales (S_{bi} , S_{ci} , S_{vi}). El resto de los parámetros no presentan, teniendo en cuenta el error, diferencias significativas.

Tabla 5.1.4.1. Valores de parámetros de amplitud y parámetros funcionales obtenidos con el programa EZEImage. Los números entre paréntesis indican el error en la última cifra significativa.

Muestra	Sa	Sz	Ssk	Sku	Sbi	Sci	Svi
BNa400	1,26(3)	15(1)	0,3(1)	3,7(2)	0,58(1)	1,64(2)	0,109(3)
BNa600	1,32(5)	15(2)	0,3(1)	3,7(1)	0,58(1)	1,65(4)	0,114(3)
BNa800	1,43(6)	15(2)	-0,1(1)	3,5(2)	0,64(3)	1,5(1)	0,117(9)
BAPQNa400	1,2(2)	17(4)	0,10(4)	3,7(2)	0,623(4)	1,53(1)	0,114(4)
BAPQNa600	1,34(4)	16(1)	0,71(7)	3,9(1)	0,54(1)	1,81(3)	0,083(1)
BAPQNa800	1,22(3)	15(1)	0,1(1)	3,4(2)	0,61(1)	1,56(3)	0,114(6)

Tabla 5.1.4.2. Valores de la dimensión fractal D y el parámetro Dmin obtenidos con el programa FERImage. Los números entre paréntesis indican el error en la última cifra significativa

Muestra	D	Dmin (μm)	Dper (μm)
BAPQNa400	2,4(1)	1,5(1)	14(1)
BAPQNa600	2,38(3)	1,6(1)	12,2(4)
BAPQNa800	2,4(1)	1,5(1)	8(1)
BNa400	2,53(2)	2,4(2)	18(1)
BNa600	2,51(3)	2,3(2)	21(1)
BNa800	2,58(2)	2,7(2)	20(1)

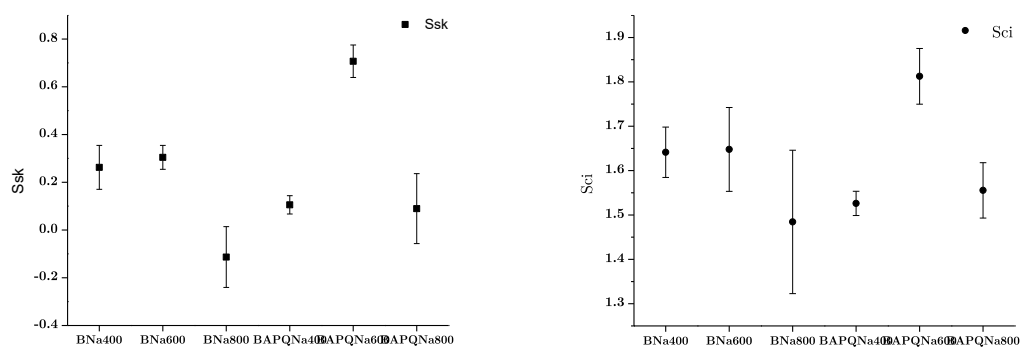


Figura 5.1.4.1. Comportamiento de los parámetros (a) Ssk y (b) Sci

En la tabla 5.1.4.1 se puede observar la variación del parámetro Sa, en todos los casos se encuentra en el rango de 1-2 μm . Si se comparan los valores de Sa, antes

y después de realizar el tratamiento térmico, se puede observar que no existe variación en los valores obtenidos.

Se puede observar que en todas las muestras es levemente mayor la proporción de picos que de valles, esto se ve reflejado en los valores obtenidos de S_{sk} y S_{ci} , siendo la muestra BAPQNa600 la que presenta el mayor valor. Estos dos parámetros siguen la misma tendencia.

Teniendo en consideración los tres parámetros funcionales, se observa que la muestra que presenta mayor variación es la BAPQ600. Sin embargo, no es el índice S_{bi} es el que tiene la misma tendencia que el parámetro S_{sk} sino el S_{ci} , por lo que se interpreta que el área del núcleo es el que hace variar al parámetro S_{sk} generando una superficie con diferencias de altura más suaves que el resto de las muestras. En todos los casos el parámetro S_{ku} presenta para todas las muestras una distribución de alturas homogénea [76].

De todos los tratamientos, la muestra BAPQNa600 es la que no presenta valores gaussianos de índices de retención de fluidos, el resto de las muestras tienen índices de retención en el valle, núcleo y pico cercanos a los valores correspondientes a superficies gaussianas [76].

La dimensión fractal D (Tabla 5.2.4.2) indica que las muestras BNa con TT presentan menor irregularidad comparadas con las muestras BAPQNa con TT, aunque entre las diferentes temperaturas tanto de BNa y BAPQNa no presentan variación en el parámetro y siguen la misma tendencia que los valores obtenidos en las muestras sin tratamiento térmico (BNa y BAPQNa).

Se puede observar en la tabla 5.1.4.2 que el parámetro d_{min} no presenta variación con la temperatura tanto para BNa como BAPQNa. Sin embargo, entre los dos tratamientos, las muestras con APQ tienen un menor tamaño de la mínima celda que presenta periodicidad en la superficie que las muestras B. Por otro lado, con respecto al parámetro D_{per} , los valores obtenidos son menores en las muestras

con BAPQNa que con BNa. Sin embargo, en las muestras a distintas temperaturas de BAPQNa, se observa que a medida que aumenta la temperatura, disminuye el parámetro D_{per} y podría estar relacionado a la cristalización del titanato de sodio. En el caso del parámetro Λ (figura 5.1.4.2), las muestras BNa con TT presentan menor anisotropía que las muestras con BAPQNa con TT, siendo la muestra BNa400 la que presenta menor anisotropía y la muestra BAPQNa600 la que presenta la mayor anisotropía.

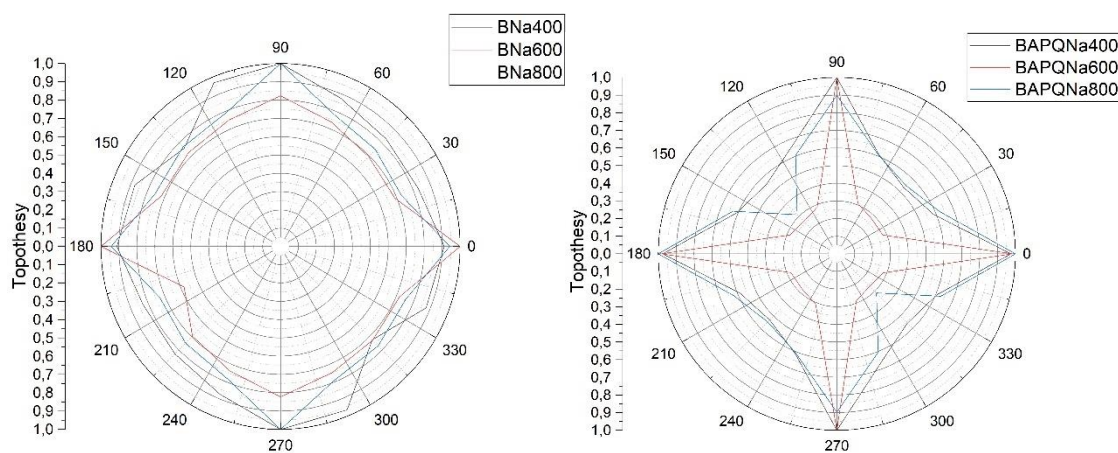


Figura 5.1.4.2. Gráfico polar del parámetro *Topothesy* normalizado a sus respectivos valores máximos.

5.1.5 Mojabilidad

En la tabla 5.1.5.1 se presentan las mediciones del ángulo de contacto por el método de la gota sésil de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800.

Del análisis de los resultados se evidencia una disminución en el ángulo de contacto de las muestras que fueron tratadas térmicamente (BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800) en comparación con las muestras sin tratamiento térmico (BNa y BAPQNa). Todas las muestras presentaron ángulos de contacto $\Phi < 20^\circ$ indicando superficies superhidrofílicas [35], estos resultados indicarían superficies con una alta energía superficial, adhesividad y mojabilidad [171].

Tabla 5.1.5.1. Ángulos de contacto de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800.

BNa400	BAPQNa400	BNa600	BAPQNa600	BNa800	BAPQNa800
11,8°	7°-9°	7,1°-8,6°	7°-9°	7,2°-8,6°	7°-9°

Las muestras BNa400/600/800 presentaron ángulos de contacto de 11.8°, 7.1°-8.6°, 7.2°-8.6°, se evidencia un descenso en el valor con respecto al sustrato base sin tratamiento térmico BNa (19.1°). La disminución se hace más marcada en las muestras que fueron tratadas a 600 °C y 800 °C, aunque la superficie pierde grupos hidroxilos producto de la cristalización del hidrogel de titanato de sodio[195].

Las muestras BAPQNa400/600/800 presentaron ángulos de contacto entre 7°-9°, se observa un descenso en el valor del ángulo con respecto al sustrato base BAPQNa (17.1°) sin tratamiento térmico. Según lo informado el recubrimiento de las muestras BAPQNa400 y BAPQNa600 contienen anatasa+ titanato de sodio, luego a partir de 800°C (BAPQNa800) anatasa +rutilo+ titanato de sodio cristalino. La fase anatasa es más hidrofílica que el rutilo [195], pero en estas muestras los valores de mojabilidad se mantienen constantes a medida que se produce la transformación de la fase anatasa a la fase rutilo, con lo cual no sería el factor que afecte las medidas de mojabilidad.

Los bajos y constantes valores en las medidas de ángulo de contacto encontrados en las distintas muestras (BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800), indicarían que las fuerzas de adhesión sólido-líquido serán mayores que las fuerzas de cohesión del líquido, evidenciando una interfaz plana donde la gota moja una gran porción de la superficie [172]. Se comprobaría que la disminución de los grupos hidroxilos por efecto de la cristalización del hidrogel de titanato de sodio y la presencia de la fase anatasa en las muestras BAPQNa400/600/800 no influirían en los bajos y constantes valores de ángulo de contacto obtenidos de las distintas

superficies. La adhesión celular se ve afectada por la mojabilidad de la superficie, donde superficies hidrofílicas promueven la adhesión celular [196], [197].

5.1.6 Potencial Z

La tabla 5.1.6.1 presenta los resultados de potencial zeta de las muestras BNa400/600/800 y de las muestras BAPQNa400/600/800. Todos los sustratos reflejaron valores de potencial Z negativos, esto se debería a la absorción de grupos hidroxilos (OH-) en la superficie producto de la inmersión en un electrolito acuoso (SBF) [83], [84]. Además, todas las superficies presentaron desviaciones estándar más alta de lo normal (0.5-1mV), esto indicaría que las superficies van a presentar cierta reactividad en la solución acuosa (SBF) durante la medición [114], [182].

Tabla 5.1.6.1. Medidas de potencial Z de las muestras tratadas térmicamente

Muestras	Potencial Z (mV) \pm SD	R ²
BNa400	-8,9 \pm 1,3	0,97
BAPQNa400	-9,2 \pm 3,1	0,76
BNa600	-11,4 \pm 1,9	0,97
BAPQNa600	-11,7 \pm 1,6	0,85
BNa800	-5,8 \pm 2,4	0,84
BAPQNa800	-10,1 \pm 1,6	0,96

Del análisis de los resultados obtenidos para las muestras BNa400/600/800 (Tabla 5.1.6.1), el valor del potencial Z de la muestra BNa400 se mantiene relativamente constante con respecto a la muestra base (BNa, -8.1 \pm 1.4 mV), con un muy buen coeficiente de determinación R². Cuando la temperatura de tratamiento aumenta a 600°C (BNa600), se observa un desplazamiento del potencial Z hacia valores más negativos, con un muy buen coeficiente de determinación R². La muestra BNa800 muestra un desplazamiento del potencial Z hacia valores menos negativos, con un pobre coeficiente de determinación R². Se observa un incremento en la desviación estándar a medida que aumenta la temperatura de

400°C a 800°C, esto evidenciaría que la superficie presenta cierta reactividad en la solución acuosa (SBF) durante la medición [114], [182]. El coeficiente de determinación se mantiene constante entre 400°C-600°C tomando valores muy buenos (R^2 : 0.97); sin embargo, se produce una disminución en el coeficiente de determinación (R^2 : 0.84) de la muestra BNa800.

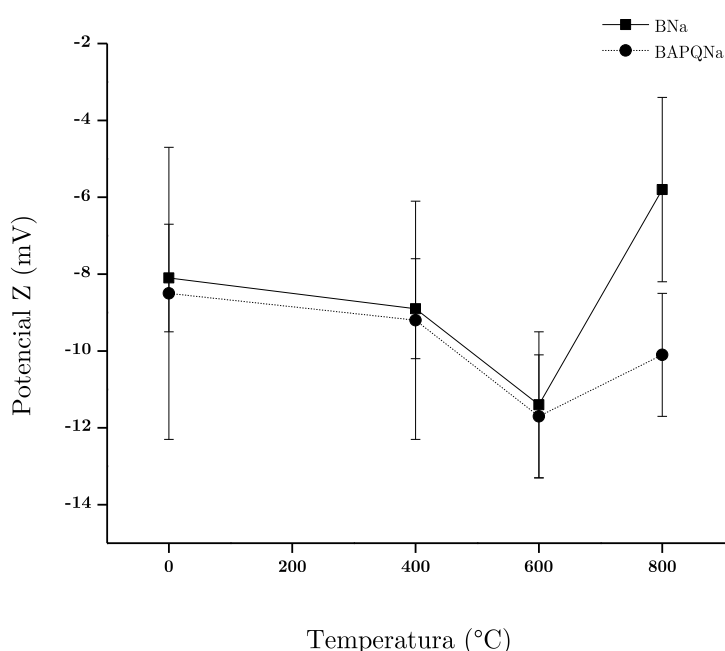


Figura 5.1.6.1. Medidas de potencial Z de los sustratos tratados térmicamente

Del análisis de los resultados obtenidos para las muestras BAPQNa400/600/800 (Tabla 5.1.6.1), el valor de del potencial Z de la muestra BAPQNa400 presenta un desplazamiento hacia valores más negativos (-) con respecto a la muestra base (BAPQNa, -8.5 ± 3.8 mV), con un pobre coeficiente de determinación R^2 . La muestra BAPQNa600 presenta un desplazamiento del potencial Z hacia valores más negativos, con un coeficiente de determinación pobre pero mejor que el obtenido en la muestra BAPQNa400. La muestra BAPQNa800 presenta un leve desplazamiento del potencial Z hacia valores menos negativos. La muestra BAPQNa400 presenta el mayor valor de desviación estándar en comparación a

las muestras BAPQNa600/800, la desviación estándar entre 600-800°C se mantiene constante, igualmente los valores obtenidos se encuentran muy por encima de los valores normales (0.5-1mV), lo cual indicaría que las superficies van a presentar reactividad en la solución acuosa (SBF) [114], [182].

De la comparación de las distintas superficies, las muestras BNa600 y BAPQNa600 presentaron un valor de potencial Z similar y el más negativo en comparación a las otras muestras. El valor más negativo indicaría la generación de una mayor absorción de grupos hidroxilos (OH) en la superficie, una mayor cantidad de grupos hidroxilos conducirían a una menor cantidad de iones hidrógeno en solución con lo cual se obtendría un potencial Z más negativo [180], se considera que la muestra presentará una mayor estabilidad en comparación con los otros sustratos medidos [181]. Ambas muestras presentan un valor similar de desviación estándar, sin embargo, la muestra BNa600 presentó un mejor coeficiente de determinación en comparación a la muestra BAPQNa600.

5.1.7 Ensayo *in-vitro* en Fluido Biológico Simulado (SBF)

La bioactividad *in-vitro* se evaluó sumergiendo los distintos sustratos BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800 durante 72 horas en fluido corporal simulado (SBF). En la figura 5.1.7.1 y 5.1.7.2 se presentan las imágenes MEB de las muestras tratadas en SBF, se evidencia un depósito con una morfología diferente a la de una posible apatita. Hay estudios que revelan sobre la precipitación de cristales de carbonato de calcio en lugar de o en competencia con la precipitación de hidroxiapatita [198], [199]. El carbonato de calcio se puede presentar como una fase amorfa o en tres formas cristalinas (calcita rómbica, aragonita en forma de aguja y vaterita esférica) [200]. Oyane y colaboradores [201], establecieron que la solución de SBF se encuentra subsaturada con respecto

a la precipitación de carbonato de calcio en forma de calcita, infiriendo de esta manera que tiene el potencial de formar hidroxiapatita pero no presenta potencial para formar carbonato de calcio [202] en las superficies de prueba. De los datos obtenidos a partir de EDS (Tabla 5.1.7.1), se evidencia un incremento en el porcentaje atómico de C (en algunas superficies con una concentración atómica mayor al 50%), no se detecta la presencia de P y la concentración atómica de O y Ca disminuye con respecto a la muestras sin tratamiento en SBF.

Tabla 5.1.7.1. Medidas de EDS de los sustratos tratados térmicamente con y sin inmersión en SBF obtenidos a 10kV.

Muestra	C(%at)	O(%at)	Na(%at)	Cl(%at)	Ti(%at)	Ca(%at)	P(%at)
BNa ₄₀₀		68,41	4,18		26,02	1,22	
BNa ₄₀₀ (72h)	47,84	38,93	3,2	1,86	7,16	1,02	
BAPQNa ₄₀₀		65,19	3,96		24,78	5,83	0,23
BAPQNa ₄₀₀ (72h)	37,87	48,69	1,34		10,01	2,09	
BNa ₆₀₀		69,44	3,02		26,7	0,85	
BNa ₆₀₀ (72h)	58,87	20,8	1,48	1,12	16,28	1,46	
BAPQNa ₆₀₀		69,6	3,55		20,98	5,77	0,09
BAPQNa ₆₀₀ (72h)	37,69	40,15	1,03		18,26	2,87	
BNa ₈₀₀		51,36			39,69	1,95	
BNa ₈₀₀ (72h)	47,36	39,86	0,92	0,33	10,89	0,63	
BAPQNa ₈₀₀		62,81			28,73	7,89	0,87
BAPQNa ₈₀₀ (72h)	52,35	32,5	2,36	1,18	9,91	1,7	

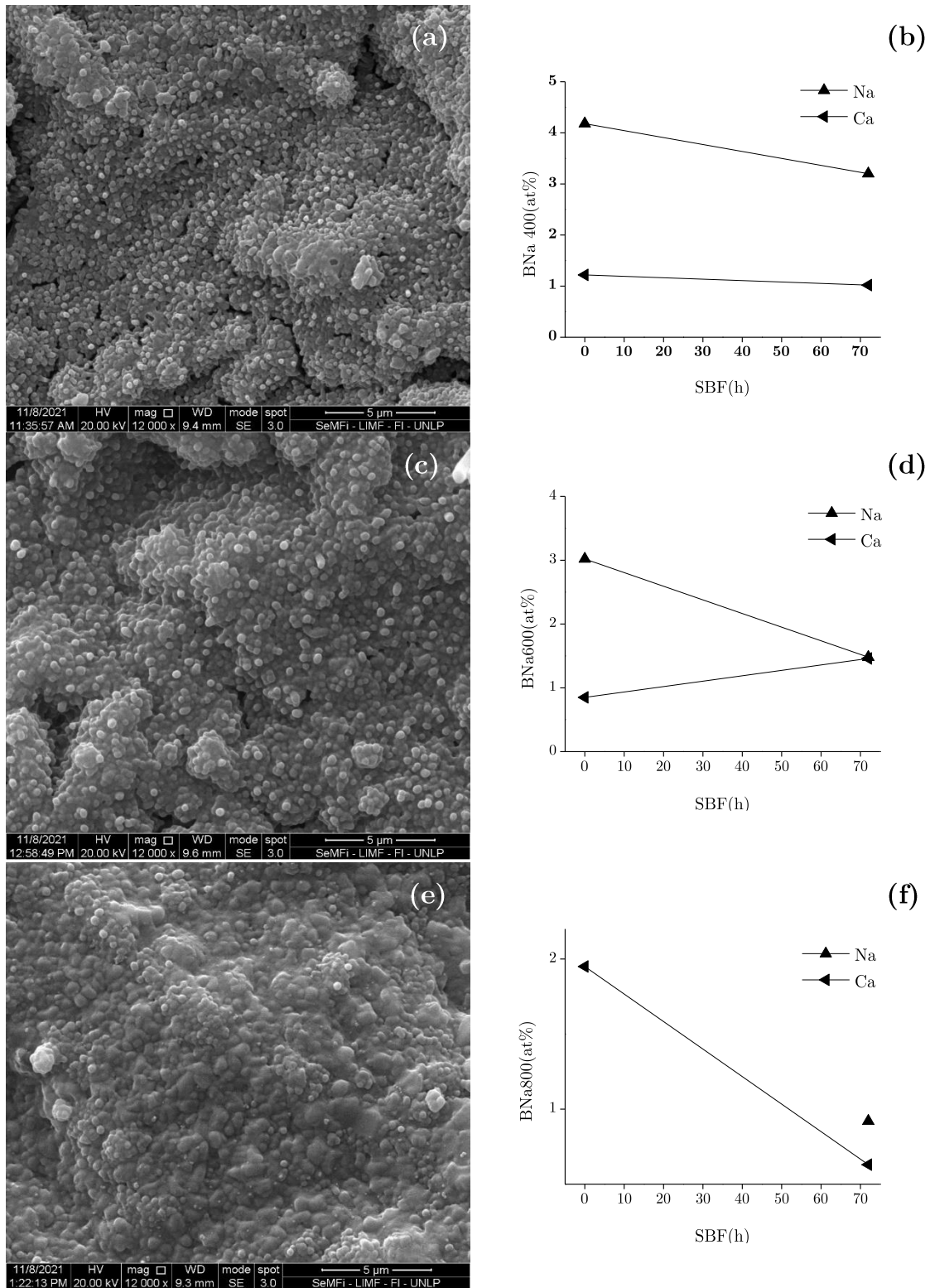


Figura 5.1.7.1. Imágenes MEB y porcentaje atómico de Na, Ca y P de las muestras BNa400(a,b), BNa600(c,d), BNa800 (e,f) luego de la inmersión a 72 horas en SBF. En todas las superficies se evidencian precipitados nanométricos que corresponderían a carbonato de calcio.

La muestra BNa400(72h) (figura 5.1.7.1 (a)), presenta un depósito con una morfología esférica de tamaño nanométrico distribuido en toda su superficie. Sin embargo, se observan áreas donde aún son visibles las fisuras generadas durante el tratamiento alcalino y térmico. Al analizar los datos de EDS de la muestra BNa400(72h) y compararlos con la muestra BNa400 (tabla 5.1.7.1 y figura 5.1.7.1(b)), se evidencia la presencia de C con un alto porcentaje atómico. Se observa una disminución en las concentraciones atómicas de Na en aproximadamente un 23% y de Ca en aproximadamente un 16%. No se detecta la presencia de fósforo. Además, se identifica la presencia de Cl en la superficie.

La muestra BNa600(72h) (figura 5.1.7.1 (c)), exhibe en su superficie un depósito esférico de tamaño nanométrico similar al observado en la muestra BNa400(72h). No obstante, aún se aprecian fisuras en la superficie derivadas del tratamiento alcalino y térmico. Al analizar los datos de EDS de la muestra BNa600(72h) y compararlos con la muestra BNa600 (tabla 5.1.7.1 y figura 5.1.7.1(d)), se constata la presencia C con un alto porcentaje atómico. Se observa una notable disminución en la concentración atómica de Na en aproximadamente un 51%, mientras que la concentración de Ca presenta un aumento de aproximadamente un 72%. No se detecta la presencia de fósforo, además, se identifica la presencia de Cl en la superficie.

La muestra BNa800 (72h) (figura 5.1.7.1 (e)), muestra un depósito esférico de tamaño nanométrico similar al observado en las muestras BNa400 (72h) y BNa600 (72h), distribuido homogéneamente en toda la superficie. Al analizar los datos de EDS de la muestra BNa800 (72h) y compararlos con la muestra BNa800 (tabla 5.1.7.1 y figura 5.1.7.1(f)), se confirma la presencia de C con un alto porcentaje atómico. Es importante señalar que la muestra BNa800 no presentaba Na en su superficie inicialmente, pero después de la inmersión en SBF (BNa800(72h)), se detecta la presencia de este elemento en la superficie. Además, se observa una

disminución en la concentración atómica de Ca en un 68%. No se detecta la presencia de fósforo. También se identifica la presencia de Cl en la superficie.

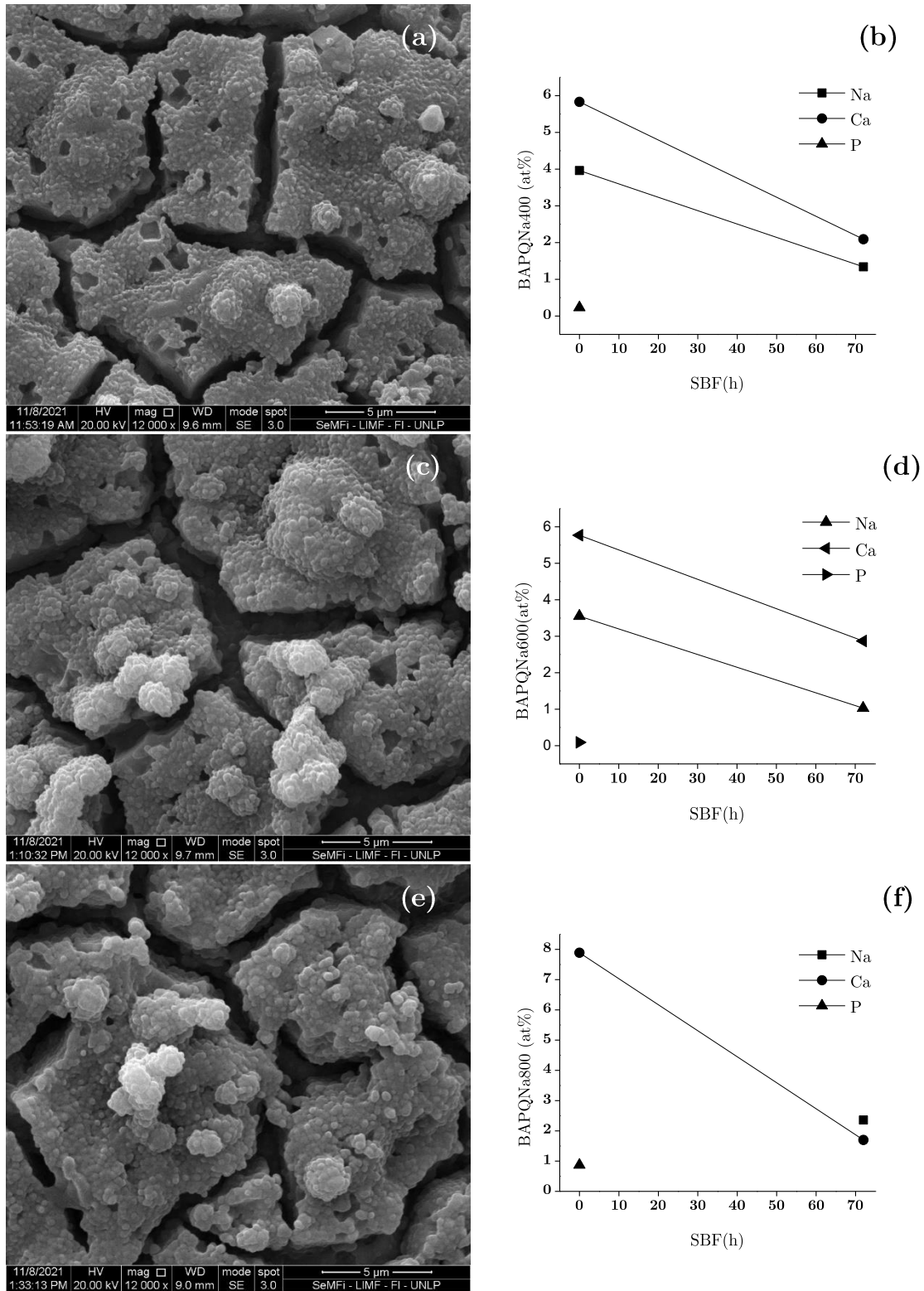


Figura 5.1.7.2. Imágenes MEB y porcentaje atómico de Na, Ca y P de las muestras BAPQNa400(a, b), BAPQNa600(c, d) y BAPQNa800 (e, f) luego de la inmersión a 72 horas en SBF. En todas las superficies se evidencian precipitados nanométricos que corresponderían a carbonato de calcio.

La muestra BAPQNa400(72h) (figura 5.1.7.2 (a)), presenta en su superficie un depósito con características morfológicas similares a las observadas en las muestras BNa400/600/800 (72h) (figura 5.1.7.1(a, c, d)). El proceso de nucleación y crecimiento se produce en la superficie, sin recubrir las fisuras que conforman la capa craquelada generada por el tratamiento alcalino y térmico. Al analizar los datos de EDS de la muestra BAPQNa400(72h) y compararlos con la muestra BAPQNa400 (tabla 5.1.7.1 y figura 5.1.7.2(b)), se confirma la presencia de C con un alto porcentaje atómico. Se observa una significativa disminución en las concentraciones atómicas de Na en aproximadamente un 66% y de Ca en aproximadamente un 64%. No se detecta la presencia de fósforo en la muestra.

La muestra BAPQNa600(72h) (figura 5.1.7.2(c)), presenta en su superficie el mismo depósito encontrado en la muestra BAPQNa400(72h). Se considera que la nucleación y crecimiento del depósito nanométrico se produce inicialmente formando una capa homogénea para luego volver a nuclear, crecer y formar nuevas agrupaciones, el proceso se mantiene sin recubrir las fisuras preexistentes en la capa craquelada, como consecuencia del tratamiento alcalino y térmico. Al analizar los datos de EDS de la muestra BAPQNa600(72h) y compararlos con la muestra BAPQNa600 (tabla 5.1.7.1 y figura 5.1.7.2 (d)), se detecta la presencia de C con un alto porcentaje atómico. Se observa una marcada disminución en las concentraciones atómicas de Na, aproximadamente del 71%, y de Ca en un 50%. No se detecta la presencia de fósforo en la muestra.

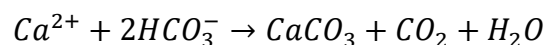
La muestra BAPQNa800(72h) (figura 5.1.7.2(e)), mantiene el proceso de nucleación y crecimiento del depósito nanométrico, similar al observado en las muestras BAPQNa400(72h) y BAPQNa600(72h). Al analizar los datos de EDS de la muestra BAPQNa800(72h) y compararlos con la muestra BAPQNa800 (tabla 5.1.7.1 y figura 5.1.7.2(f)), se confirma la presencia de C con un alto

porcentaje atómico. Se observa un aumento en el porcentaje atómico de Na y una disminución significativa en la concentración atómica de Ca en un 78%. Además, se detecta la presencia de cloro (Cl) en la superficie. No se detecta la presencia de fósforo en la muestra.

Tras comparar las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800 sometidas a un ensayo de 72 horas en SBF (figura 5.1.7.1 y 5.1.7.2), se observó una disminución en la concentración Na entre 400-600°C. Además, se detectó la presencia de sodio en la superficie de las muestras BNa800(72h) y BAPQNa800(72h), lo cual se atribuye a la difusión de los iones Na⁺ presentes en la solución de SBF. La concentración atómica de Ca disminuye en las muestras BNa400/800(72h) y BAPQNa400/600/800(72h); sin embargo, se registra un aumento en la concentración de calcio en la muestra BNa600(72h). Al analizar la concentración atómica de Ti, se sugiere que el espesor del precipitado formado durante la inmersión en SBF sería mayor en las muestras tratadas a 400 y 800 °C (BNa400/800(72h) y BAPQNa400/800(72h)) en comparación con las tratadas a 600 °C (BNa600(72h) y BAPQNa600(72h)). Basándose en los datos obtenidos de SEM-EDS y literatura [201], se considera que el depósito presente en las muestras BNa400/600/800 (72h) y BAPQNa400/600/800 (72h) sería carbonato de calcio.

Estudios realizados en vidrios bioactivos, muestran que existen diversos factores que influyen en la precipitación de carbonato de calcio en las superficies que son expuestas en SBF. Uno de los factores fundamentales es la alta concentración de iones de calcio (Ca⁺²) en la superficie de los vidrios bioactivos como en el medio circundante; la concentración de iones de calcio liberados estará influenciada por la composición del vidrio la estructura del vidrio y el tamaño de partículas de vidrio.

Se considera que el carbonato de calcio presente en las muestras BNa400/600/800 (72h) y BAPQNa400/600/800 (72h) seguiría el siguiente mecanismo de nucleación y crecimiento. La liberación de iones de calcio desde la superficie de las muestras, junto con la presencia de iones bicarbonato en la solución de SBF, facilitaría la precipitación de carbonato de calcio mediante la siguiente reacción:



En esta reacción, los iones de calcio (Ca^{2+}) liberados desde la superficie de las muestras reaccionan con los iones bicarbonato (HCO_3^-), generado durante la disolución del CO_2 atmosférico presente en la solución de SBF, dando lugar a la formación de carbonato de calcio, dióxido de carbono y agua.

Según Oyane y colaboradores [201], la solución de SBF tiene el potencial de formar hidroxiapatita, pero no presenta potencial para formar carbonato de calcio. Se considera que la precipitación de carbonato de calcio se debería a la mayor cristalinidad de la capa de titanato de sodio y a la presencia de rutilo en la superficie de las muestras a medida que aumenta la temperatura de tratamiento.

5.2 CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se llevó a cabo la caracterización de las propiedades superficiales obtenidas mediante el tratamiento térmico realizado a distintas temperaturas (400, 600 y 800 °C) en las superficies con tratamiento alcalino a las dos superficies utilizadas en la industria de los implantes dentales: el blastinado con partículas de fosfato de calcio y el anodizado por plasma químico.

En primer lugar, la topografía, composición química y fases presentes en las superficies base se encuentran en concordancia con la literatura consultada y el tratamiento térmico posterior generó una cristalización en distintos grados del hidrogel de titanato de sodio nanoporoso y dicha capa se deshidrata y densifica a medida que la temperatura aumenta de 400 °C a 800°C.

Los resultados obtenidos de los parámetros de rugosidad de las superficies indican que las superficies se encuentran dentro de las condiciones de rugosidad establecidas en la bibliografía ($S_a=1-2 \mu\text{m}$). La dimensión fractal D indica que las muestras blastinadas con tratamiento térmico presentan menor irregularidad comparadas con las muestras anodizadas con tratamiento térmico. En cuanto al parámetro d_{min} no presenta variación con la temperatura tanto para la muestra blastinada como la anodizada, aunque en el parámetro D_{per} , los valores obtenidos son menores en las muestras con anodizado que con blastinado. Por otro lado, en las muestras anodizadas, se observa que a medida que aumenta la temperatura, disminuye el parámetro D_{per} y podría estar relacionado a la cristalización del titanato de sodio. En el caso del parámetro Λ , las muestras blastinadas presentan menor anisotropía que las muestras con anodizado, siendo la muestra blastinada con tratamiento térmico a 400 °C la que presenta menor anisotropía y la muestra anodizada con tratamiento térmico a 600 °C la que presenta la mayor anisotropía.

Al comparar los distintos sustratos, las muestras blastinizadas con tratamiento térmico presentaron un mejor comportamiento mecánico en comparación con las muestras anodizadas. A medida que aumentaba la temperatura, la mayor cristalinidad provocó una mayor fragilidad del recubrimiento.

Todas las muestras presentaron superficies superhidrofílicas que indicarían superficies con una alta energía superficial, adhesividad y mojabilidad. Este resultado se refleja en los valores de potencial Z, donde se puede observar que todas las superficies presentaron desviaciones estándar más alta de lo normal (0.5-1mV), que indicaría que las superficies van a presentar cierta reactividad en la solución acuosa (SBF) durante la medición.

Por último, la bioactividad *in-vitro* se evaluó sumergiendo las muestras durante 72 h en SBF. Se observó la precipitación de una posible apatita en todas las superficies cuya morfología se correspondería con un carbonato de calcio.

CAPITULO 6

ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO BIOACTIVO CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES

El comportamiento celular (adhesión, cambios morfológicos, alteración funcional, proliferación, diferenciación, etc) en la interfaz célula-implante se ve estimulado o comprometido por las propiedades superficiales (composición rugosidad, hidrofilia, textura y morfología) de los materiales utilizados [19], [203]. La viabilidad de las células dependerá del anclaje que se desarrolle en la interfaz célula-material, esta conexión requerirá una superficie adhesiva que genere fuerzas de unión y en consecuencia las células puedan extenderse y desarrollarse [203].

En la actualidad los estudios *in-vitro* se realizan como requisito previo para evaluar el comportamiento *in-vivo* de un implante. Uno de los métodos *in-vitro* desarrollados para estimar el comportamiento de la interfaz tejido blando-implante consiste en realizar cultivos celulares a diferentes tiempos y de esta forma evaluar el comportamiento biológico que desarrollará el tejido periimplantario. El cultivo con células es uno de los estudios más difundidos y fáciles de realizar, el método consiste en efectuar un cultivo celular (fibroblastos gingivales, fibroblastos periodontales, osteoblastos, células madre mesenquimales, etc) directamente sobre la superficie del implante a diferentes tiempos, luego analizar mediante distintas técnicas de caracterización (microscopia de fluorescencia, electrónica de barrido y confocal, entre otras) el comportamiento celular (osteogénesis, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular) [204].

Uno de los métodos de estudio *in-vitro* es el cultivo con células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales (CMM) son células

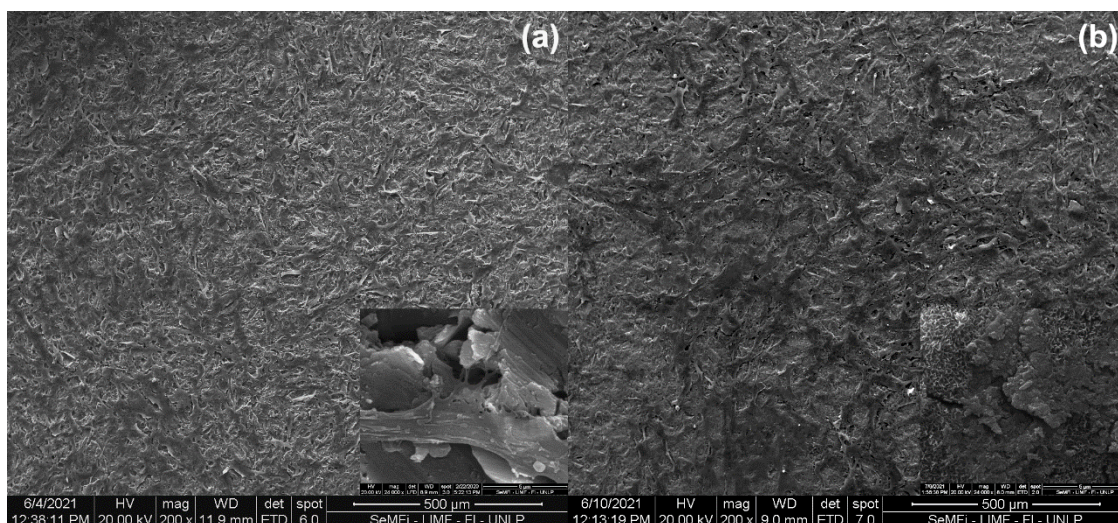
multipotentes, expresan marcadores de superficie específicos y tienen potencial de diferenciación a múltiples linajes [204], [205]. Se pueden obtener de diferentes tejidos (adiposo, médula ósea, cordón umbilical, pulpa y saco dental), las CMM extraídas del tejido dental poseen la capacidad de diferenciar a osteoblastos, condrocitos y adipocitos [204]; expresan marcadores osteoblásticos típicos como la fosfatasa alcalina (ALP), la osteopontina (OPN) y la osteocalcina (OCN) [204]. El patrón de expresión génica de las proteínas que conforman los huesos (osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea, colágeno tipo I y ALP) generalmente se ve afectado por la topografía de la superficie [206], [207]. Se ha documentado la formación de un organoide similar a la dentina luego del cultivo en CMM extraídas de pulpa dental [204]

Este último capítulo está orientado al estudio y análisis del comportamiento de las CMM luego del cultivo durante 48 horas en los distintos sustratos modificados superficialmente. Se estimará la adhesión, los cambios morfológicos, proliferación y la posible diferenciación de las CMM. El capítulo se divide en dos apartados, el primer apartado tratará el cultivo *in-vitro* de las superficies B, BNa, BAPQ y BAPQNa; en un segundo apartado se describirán los resultados obtenidos del cultivo *in-vitro* de las superficies BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800. Las técnicas de caracterización utilizadas fueron SEM y EDS.

6.1 RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1.1 Ensayo *in-vitro* con células madre mesenquimales (CMM) en superficies bioactivas sin tratamiento térmico.

En la figura 6.1.1.1 se presentan las distintas superficies luego de 48 horas de cultivo con CMM, en las cuales se observan las células adheridas y en crecimiento, con la presencia de proyecciones citoplasmáticas, que formaron uniones localizadas con el sustrato. Por otro lado, no se observaron efectos citotóxicos. Además, se evidenció comunicación intercelular, considerado esto como uno de los factores más importantes para la diferenciación celular. En las superficies tratadas superficialmente en NaOH (Figura 6.1.1.1), se evidenció la presencia de un precipitado alrededor de las células adheridas y se determinó mediante SEM-EDS que estos estaban compuestos por calcio y fósforo, presentando una relación Ca/P similar a la proporción de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano [183]. Altas tasas de osteogénesis se han observado en superficies de Ti superhidrofílicas (ángulos de contacto $\sim 0^\circ$) con alta energía superficial [208], [209], además se ha sugerido que superficies nanoporosas de desorden controlado [210] con estructuras cristalinas-amorfas generan sustratos adecuados para la expresión de marcadores osteogénicos [211]. La precipitación de cristales de hidroxiapatita se considera generalmente un marcador temprano de diferenciación osteogénica [206].



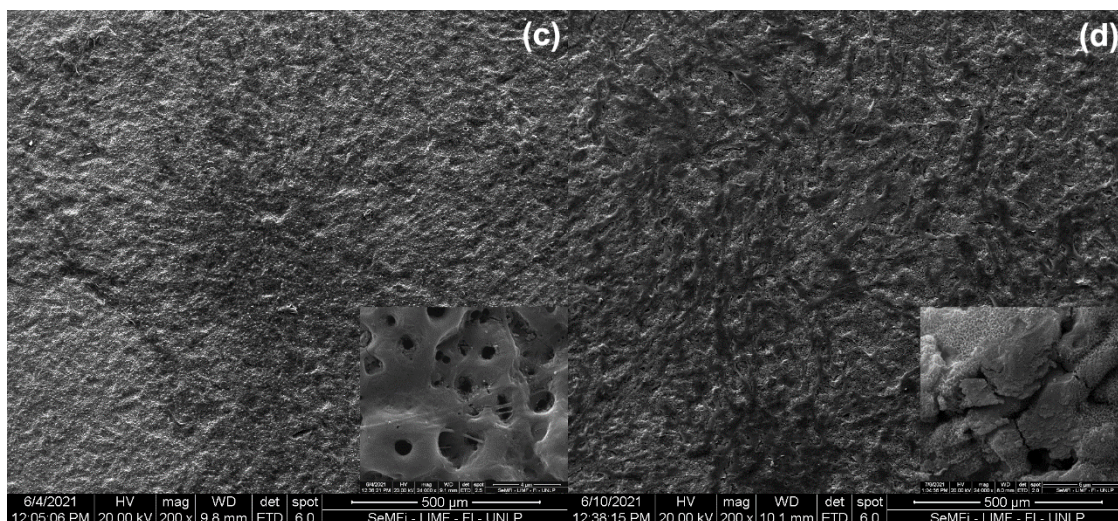


Figura 6.1.1.1. Imágenes SEM de las muestras B(a), BNa(b), BAPQ(c) y BAPQNa(d) luego del cultivo con CMM durante 48 h.

Tabla 6.1.1.1. Resultados de EDS luego del cultivo durante 48 h con CMM de las muestras BNa y BAPQNa

Muestra	Relación Ca/P
BNa	1,66(5)
BAPQNa	1,76(7)

Del análisis de la muestra B (Figura 6.1.1.1 (a)) se puede observar una buena adherencia y crecimiento celular de morfologías fibroblastoides, alargadas, aplanadas y con una distribución al azar en toda la superficie; estos cambios morfológicos son fenómenos típicos que se desarrollan durante el proceso de adhesión celular. Se considera que las partículas de fosfato de calcio adheridas a la superficie producto del tratamiento de blastinizado mejoraría la calidad de unión celular inicial; el uso de partículas biocompatibles, osteoconductoras y reabsorbibles no afectan los procesos de osteointegración en comparación con superficies blastinizadas con partículas de Al_2O_3 o TiO_2 [206]. La topografía de la superficie estimularía la adhesión, el crecimiento y la comunicación celular, lo cual se evidencia a partir del desarrollo de finas y largas proyecciones citoplasmáticas

del tipo filopodios que se extienden uniéndose a la superficie rugosa producto del tratamiento de blastinizado [212], [213].

La muestra BNa (Figura 6.1.1.1(b)) exhibe comportamientos de crecimiento y adhesión celular. En comparación con la muestra B (Figura 6.1.1.1(a)) las células presentan morfologías tendiendo a la forma de huso o fusiforme, el núcleo mantiene su forma redondeada con una distribución al azar en toda la superficie. Se observa un incremento en la cantidad y el grosor de las proyecciones citoplasmáticas las cuales se unen a la estructura esquelética de red nanoporosa producto del tratamiento alcalino en NaOH. La muestra BNa presentó un tamaño de poro de 230.71 ± 42.30 nm, se ha informado que estructuras con diámetros de poros entre 50-100 nm reproducen los ambientes celulares favoreciendo la adhesión celular, dando lugar a una capacidad osteogénica mesenquimatosa mejorada [214], [215]. Se observó (Figura 6.1.1 (b)) la presencia de precipitados alrededor de las células adheridas, el análisis a partir de SEM-EDS, identificó que estos estaban compuestos por calcio y fósforo, presentando una relación Ca/P de 1.66 similar a la relación de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano [183]. Los depósitos caracterizados indicarían la presencia de fosfatos de calcio con una morfología similar a la estructura de hidroxiapatita [216]. El potencial de diferenciación osteogénica de las CMM se expresa a partir de la presencia de varios marcadores osteoblásticos, dentro de los cuales se encuentran la precipitación de partículas cerámicas de hidroxiapatita [216]

La muestra BAPQ (figura 6.1.1.1 (c)) presenta zonas aisladas donde se producen la adhesión y crecimiento de las CMM, se observan cuerpos celulares aplanados, alargados y con proyecciones citoplasmáticas del tipo filopodios que se unen a los microporos de la superficie de titanio anodizada por plasma químico. Las medidas de porosidad realizadas a la superficie exhibieron valores de diámetros de poro de 1.18 ± 0.38 μ m, si bien se ha informado que superficies con diámetros de poros del

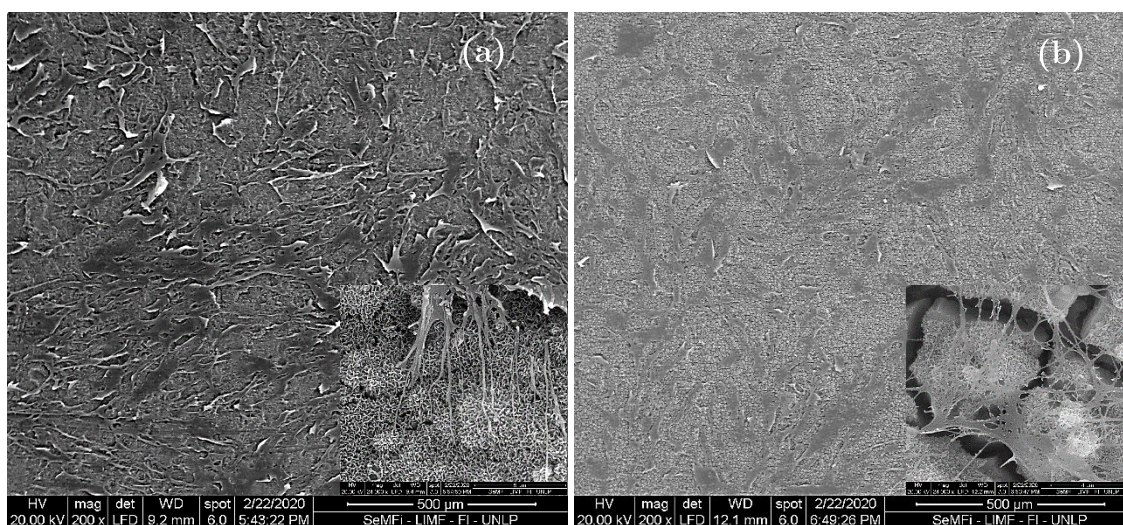
orden de la nanoescala conducen a una capacidad osteogénica mesenquimatosa mejorada [214], [215], se evidencia adhesión, crecimiento y comunicación intercelular lo cual revelaría una superficie no citotóxica [212], [213].

La muestra BAPQNa exhibe morfologías de huso o fusiforme, aunque el núcleo conserva su forma redondeada. Se evidencia adhesión, crecimiento y comunicación intracelular a partir del desarrollo de proyecciones citoplasmáticas del tipo filopodios con una distribución al azar en toda la superficie. En comparación con la muestra BNa, la superficie de la muestra BAPQNa exhibe comportamientos similares, aunque cualitativamente se observa una menor proliferación de CMM. Del análisis de las proyecciones citoplasmáticas se observan uniones estrechas a la superficie nanoporosa, la muestra BAPQNa presentó un tamaño de poro de 214.94 ± 32.74 nm. Como ya se expuso, topografías del orden de la nanoescala conducirán a una capacidad osteogénica mejorada [214], [215]. En la Figura 6.1.1.1(d), se puede observar la presencia de depósitos alrededor de las CMM, al igual que la muestra BNa, estos depósitos estaban compuestos por calcio y fósforo. El análisis de los depósitos reveló una relación de Ca/P de 1.76 siendo este valor similar a la relación de hidroxiapatita (Ca/P 1.67) del tejido óseo humano [183]. Las características morfológicas de los depósitos fueron similares a las caracterizadas en la muestra BNa, indicando la presencia de partículas esféricas de hidroxiapatita [216]. Es necesario destacar que la diferencia en los valores de las relaciones Ca/P de las muestras BNa y BAPQNa, indicarían una mejora en las tasas de osteogénesis de las muestras de titanio blastinizadas y tratadas con hidróxido de sodio.

6.1.2 Ensayo *in-vitro* con células madre mesenquimales (CMM) en superficies bioactivas con tratamiento térmico

En la figura 6.1.2.1 se presentan las micrografías SEM de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800 luego de 48 h de cultivo con CMM. Del análisis de las distintas superficies, se observa adherencia, crecimiento y comunicación intercelular de las CMM, con la presencia de proyecciones citoplasmáticas que forman uniones localizadas con la superficie de los distintos sustratos. Cualitativamente las muestras BNa400/600/800 presentaron una mayor cantidad de CMM adheridas al sustrato en comparación a las células adheridas a las superficies de las muestras BAPQNa400/600/800.

La presencia de C (Tabla 6.1.2.1.) en la superficie de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800 indicaría que se está desarrollando actividad biológica celular, dando lugar a la formación de un precipitado [217].



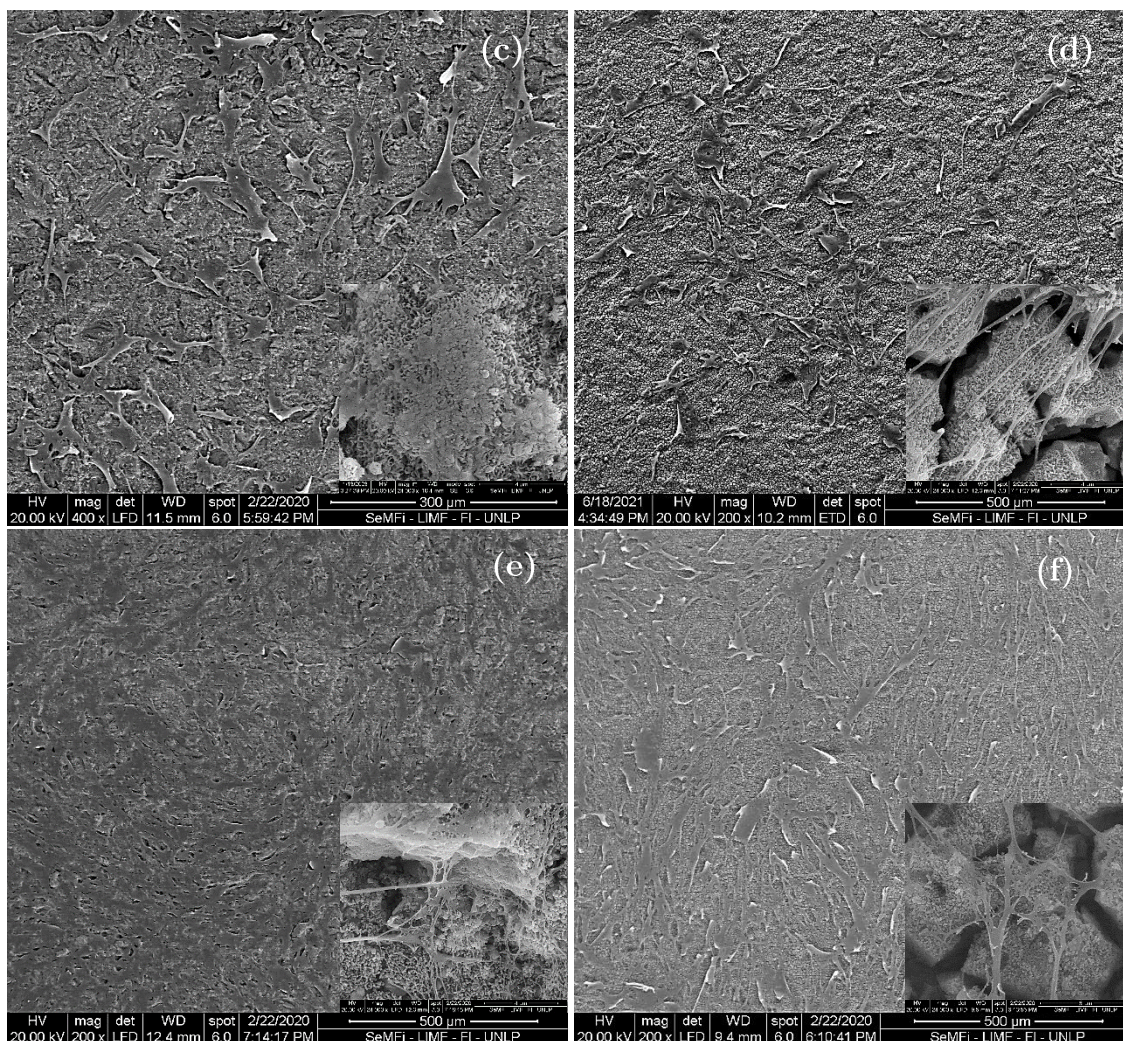


Figura 6.1.2.1. Imágenes SEM de las muestras BNa400(a), BAPQNa400 (b), BNa600(c), BAPQNa600(d), BNa800(e) y BAPQNa(f) luego del cultivo con CMM durante 48 h.

Las muestras BNa400/600/800 (figura 6.1.2.1(a, c y d)) exhiben comportamientos de adhesión y crecimiento celular, con la presencia de proyecciones citoplasmáticas las cuales se unen a la estructura nanoporosa producto del tratamiento alcalino en NaOH. Presentan una morfología en forma de huso o fusiforme con una distribución al azar en toda la superficie. Se observa, cualitativamente un incremento en la cantidad de células adheridas a los distintos sustratos a medida que aumenta la temperatura de tratamiento térmico (400-800°C). En todas las muestras (figura 6.1.2.2) se hallaron precipitados alrededor de las células adheridas, las medidas realizadas a partir de SEM-EDS (área y en secciones puntuales) identificaron que estos depósitos estaban compuestos por calcio y

fosforo, elementos formadores de hidroxiapatita, componente principal del hueso humano. Las relaciones Ca/P tomadas en el área fueron (figura 6.2.2.3), $Ca/P_{(BNa400)}=1.9$, $Ca/P_{(BNa600)}=1.96$, $Ca/P_{(BNa800)}=3,80$. Entre 400 y 600 °C la relación Ca/P se mantiene relativamente constante, la concentración atómica de Ca y P aumenta (figura 6.1.2.3); sin embargo, a 800 °C la concentración atómica de P disminuye y la concentración atómica de Ca aumenta resultando en un valor mucho mayor que el hallado en las muestras BNa400 y BNa600. Las relaciones Ca/P determinadas en los depósitos fueron $Ca/P_{(BNa400)}=1.87\pm 0.44$, $Ca/P_{(BNa600)}=1.84\pm 0.22$, $Ca/P_{(BNa800)}=2.17\pm 0.35$. La relación Ca/P aumenta con el incremento de la temperatura de tratamiento térmico, siendo la muestra BNa400 la muestra con un valor de 1.9 (figura 6.1.2.3, medida en el área) y de 1.87 ± 0.44 en las medidas puntuales, revelando el valor de relación más cercano al de hidroxiapatita (1.67) del tejido óseo humano.

Del análisis de la concentración atómica de Ti, se observa que la muestra BNa₄₀₀ presenta la mayor concentración y la muestra BNa₆₀₀ la menor concentración atómica. La menor concentración atómica de Ti en la muestra BNa₆₀₀ indicaría, que los precipitados formados se encuentran más homogéneamente distribuidos y con un mayor volumen en la superficie de la muestra; con lo cual los datos recolectados por EDS provendrían en su mayoría de los precipitados y en menor proporción de la superficie de las muestras.

Tabla 6.1.2.1. Medidas de EDS realizadas en el área de las muestras BNa400/600/800 y BAPQNa400/600/800(mapeo de EDS).

Muestra	O (at%)	Ca (at%)	Ti (at%)	C(at%)	Na(at%)	P(at%)
BNa ₄₀₀	56,29	2,38	18,72	20,49	0,87	1,25
BAPQNa ₄₀₀	61,54	2,31	13,73	20,15	1,86	0,41
BNa ₆₀₀	53,28	3,18	15,72	25,21	0,99	1,62
BAPQNa ₆₀₀	57,92	3,4	16,61	20,23	1,28	0,55
BNa ₈₀₀	56,35	4,68	16,35	20,27	1,13	1,23
BAPQNa ₈₀₀	62,09	2,9	15,88	16,65	2,36	0,12

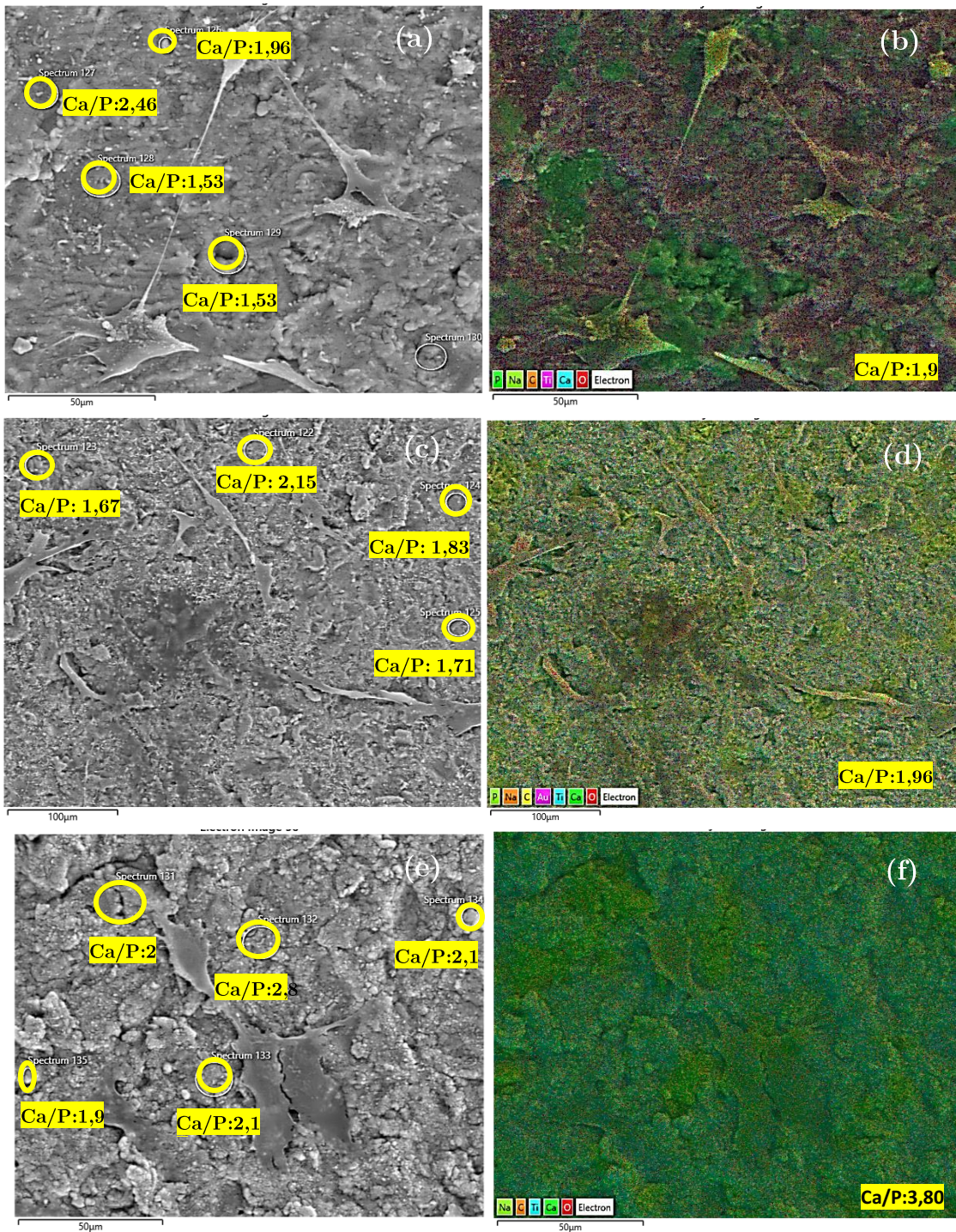


Figura 6.1.2.2. Mapeo de área y de punto de las muestras (b) BNa400/600/800 luego del cultivo en CMM durante 48 h. Muestra BNa400 (a, b) BNa600 (c, d) y BNa800, (e, f).

Las muestras BAPQNa400/600/800 presentan adhesión, proliferación y comunicación intercelular con la formación de proyecciones citoplasmáticas del tipo filopodios que se unen a la estructura nanoporosa. Cualitativamente se evidencia una menor proliferación de las CMM con el aumento de la temperatura,

con una morfología fusiforme pero más alargada en comparación con las muestras BNa400/600/800. En la figura 6.1.2.4 se observa la presencia de depósitos alrededor de las CMM, al igual que en las muestras BNa400/600/800 estos depósitos estaban compuestos por calcio y fósforo (Figura 6.2.2.5). Las relaciones Ca/P determinadas en el área para las superficies BAPQNa400/600/800 (Figura 6.2.2.5) fueron, $\text{Ca/P}_{(\text{BAPQNa400})} = 5.6$, $\text{Ca/P}_{(\text{BAPQNa600})} = 6.2$, $\text{Ca/P}_{(\text{BAPQNa800})} = 24.2$. Se observa un incremento de la relación Ca/P con el aumento de la temperatura, si bien se produce un incremento de la concentración de Ca entre 400-600°C y una disminución en la concentración a 800 °C; los resultados obtenidos son producto de las bajas concentraciones de P en las distintas superficies BAPQNa_{400/600/800} (figura 6.2.2.5). Las relaciones Ca/P determinadas en los depósitos fueron $\text{Ca/P}_{(\text{BAPQNa400})} = 2.08 \pm 0.28$, $\text{Ca/P}_{(\text{BAPQNa600})} = 2.10 \pm 0.22$, $\text{Ca/P}_{(\text{BAPQNa800})} = 2.02 \pm 0.36$; no se evidencian cambios en las relaciones Ca/P con el incremento de la temperatura de tratamiento (BAPQNa400/600/800), el valor se mantiene relativamente constante.

En lo que respecta a la concentración atómica de Ti, la muestra BAPQNa600 presenta la mayor concentración atómica y la muestra BAPQNa400 la menor concentración. La menor concentración atómica de Ti en la muestra BAPQNa400 indicaría una distribución más uniforme de los precipitados en la superficie de la muestra y con un mayor volumen; con lo cual los datos recolectados por EDS provendrían en su mayoría de los precipitados y en menor proporción de la superficie de las muestras.

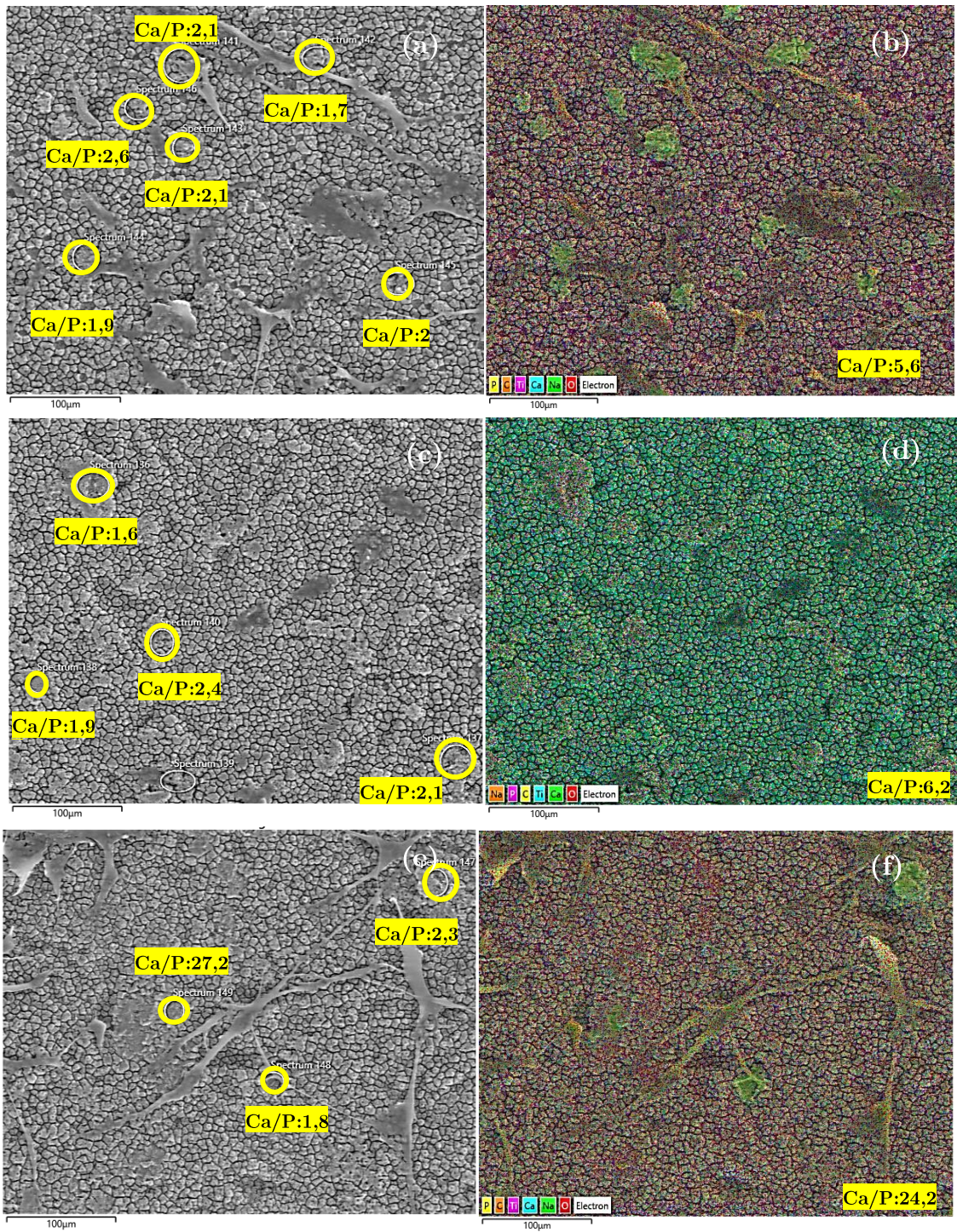


Figura 6.2.2.3. Mapeo puntual y superficial de las muestras (b) BAPQNa400/600/800 luego del cultivo en CMM durante 48 h. Muestra BAPQNa400 (a, b) BAPQNa600 (c, d) y BAPQNa800, (e, f).

6.2 CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se realizó un análisis de los resultados obtenidos del ensayo *in-vitro* con CMM a 48 horas de cultivo.

Todas las muestras presentan un comportamiento biocompatible y se evidencia adhesión, crecimiento y comunicación intercelular, lo cual revelaría una superficie no citotóxica. En las muestras base, blastinizadas y anodizadas, no se observa presencia de precipitado. En cambio, en las muestras con tratamiento alcalino presentan un precipitado de Ca y P con una relación similar a la hidroxiapatita del tejido óseo humano. En estas superficies, se observan las células de morfologías fusiformes con proyecciones citoplasmáticas, las cuales se unen a la estructura esquelética de red nanoporosa producto del tratamiento alcalino en hidróxido de sodio.

Las muestras tratadas térmicamente, tienen el mismo comportamiento que las muestras anteriores (adhesión, crecimiento y comunicación intercelular). La muestra blastinizada con tratamiento térmico presentó mayor cantidad de células (cualitativamente) que las muestras anodizadas con tratamiento térmico. Todas las muestras presentaron un precipitado de Ca, salvo las muestras blastinizadas con tratamiento térmico a 400 y 600 °C, que presentaron además la presencia de P.

Se observa que, dependiendo de las características superficiales, las células tienen un comportamiento diferente.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis se planteó como objetivo reconocer las características, propiedades y aptitud para su desempeño funcional, de recubrimientos superficiales bioactivos sobre titanio Gr4 para implantes dentales, obtenidos por anodizados por plasma químico (APQ), tratamientos alcalinos en NaOH y tratamientos térmicos.

Para lograr este propósito, se utilizaron diferentes técnicas de caracterización de materiales a fin de estudiar las propiedades resultantes de los distintos tratamientos superficiales efectuados en este trabajo y contrastar si cumplen con los requisitos necesarios para ser considerados biomateriales implantables en términos de biocompatibilidad, bioactividad, composición química y fases, topografía y rugosidad, carga y energía superficial.

Si bien las discusiones y conclusiones particulares se han incorporado en cada uno de los capítulos donde fueron presentados los resultados obtenidos, a continuación, se presentan las conclusiones generales.

En primer lugar, el tratamiento alcalino realiza una modificación de las propiedades superficiales tanto en la muestra blastinizada como la anodizada. Se genera un hidrogel de titanato de sodio nanoporoso y amorfo que presenta una gran bioactividad en un medio SBF.

Posteriormente, se efectuó un tratamiento térmico a las muestras con tratamiento alcalino con el fin de obtener un titanato de sodio más estable y se estudiaron las propiedades obtenidas a tres temperaturas de tratamiento térmico (400°, 600° y 800°). La muestra que presentó mejores propiedades químicas, superficiales (topografía y rugosidad), adhesión del recubrimiento, carga superficial, fue la superficie blastinizada con tratamiento alcalino y térmico a 400 °C.

Por último, para evaluar la biocompatibilidad y la bioactividad *in-vitro* se efectuó un ensayo de cultivo en células madre mesenquimales a 48 horas, todas las muestras presentaron adhesión, crecimiento y comunicación intercelular que evidencia que las superficies son biocompatibles y no citotóxicas. Sin embargo, las muestras que presentaron cualitativamente mejor comportamiento *in-vitro* fueron la blastinizada con tratamiento alcalino; blastinizada con tratamiento alcalino y térmico a 400 y 600 °C.

A partir de los resultados presentados en esta tesis, las perspectivas de investigación que se derivan se orientan a la evaluación y caracterización de la influencia de los tratamientos superficiales bioactivos en la adhesión y diferenciación de células madre mesenquimales a células osteoblásticas en distintas condiciones de cultivo. En particular, es de interés elaborar un protocolo de ensayo para evaluación de biocompatibilidad de implantes de titanio con diferentes tratamientos superficiales. Finalmente, efectuar el tratamiento alcalino en la aleación de titanio, Ti6Al4V (Ti gr 5) e investigar las propiedades superficiales resultantes para su aplicación en implantes dentales y/o en implantes maxilares fabricados con manufactura aditiva.

BILIOGRAFIA

- [1] K. R. St. John, "Biocompatibility of Dental Materials," *Dent. Clin. North Am.*, vol. 51, no. 3, pp. 747–760, 2007, doi: 10.1016/j.cden.2007.03.003.
- [2] P. Gubbi and T. Wojtisek, "The role of titanium in implant dentistry," in *Titanium in Medical and Dental Applications*, Elsevier, 2018, pp. 505–529.
- [3] B. D. Ratner, "A History of Biomaterials," *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*. Elsevier Inc., pp. xli–liii, Jan. 01, 2013, doi: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00154-6.
- [4] C. M. Abraham, "Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net 50 The Open Dentistry Journal," 2014.
- [5] Z. Khurshid, S. Najeeb, M. S. Zafar, and F. Sefat, *Advanced Dental Biomaterials*. 2019.
- [6] J. P. Matinlinna, *Handbook of Handbook Handbook of of Oral Biomaterials Oral Oral Biomaterials Biomaterials Handbook of*. 2015.
- [7] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2004.
- [8] P. I. Brånemark, U. Breine, R. Adell, B. O. Hansson, J. Lindström, and A. Ohlsson, "Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies," *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, vol. 3, no. 2, pp. 81–100, 1969, doi: 10.3109/02844316909036699.
- [9] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, "Fourth-generation biomedical materials," *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, 2016, doi: 10.1016/j.mattod.2015.11.005.
- [10] M. S. Ibrahim *et al.*, "Tuning nano-amorphous calcium phosphate content in novel rechargeable antibacterial dental sealant," *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 9, 2018, doi: 10.3390/ma11091544.
- [11] C. Pushpalatha *et al.*, "Nanohydroxyapatite in dentistry: A comprehensive review," *Saudi Dent. J.*, vol. 35, no. 6, pp. 741–752, 2023, doi: 10.1016/j.sdentj.2023.05.018.
- [12] N. Jafari, M. S. Habashi, A. Hashemi, R. Shirazi, N. Tanideh, and A. Tamadon, "Application of bioactive glasses in various dental fields," *Biomater. Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1186/s40824-022-00274-6.
- [13] G. Amarnath, B. Muddugangadhar, S. Tripathi, S. Dikshit, and D. MS, "Biomaterials for Dental Implants: An Overview," *Int. J. Oral Implantol. Clin. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–24, Apr. 2011, doi: 10.5005/jp-journals-10012-1030.
- [14] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, and D. Williams, "Key terminology in biomaterials and biocompatibility," *Current Opinion in Biomedical*

- Engineering*, vol. 10. Elsevier B.V., pp. 45–50, Jun. 01, 2019, doi: 10.1016/j.cobme.2019.02.004.
- [15] W. Murphy, J. Black, and G. Hastings, *Handbook of biomaterial properties, second edition*. 2016.
- [16] ISO - International Organization for Standardization, *Implants for Surgery: In Vitro Evaluation for Apatite-forming Ability of Implant Materials*. Published in Switzerland, 2012.
- [17] A. Hudecki, G. Kiryczyński, and M. J. Łos, “Biomaterials, definition, overview,” in *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, Elsevier, 2018, pp. 85–98.
- [18] D. Duraccio, F. Mussano, and M. G. Faga, “Biomaterials for dental implants: current and future trends,” *Journal of Materials Science*, vol. 50, no. 14. Kluwer Academic Publishers, pp. 4779–4812, Jul. 01, 2015, doi: 10.1007/s10853-015-9056-3.
- [19] V. S. de Viteri and E. Fuentes, “Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials,” in *Tribology - Fundamentals and Advancements*, InTech, 2013.
- [20] A. Hudecki, G. Kiryczyński, and M. J. Łos, “Biomaterials, definition, overview,” *Stem Cells Biomater. Regen. Med.*, no. ii, pp. 85–98, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1.
- [21] M. Kulkarni, A. Mazare, and P. Schmuki, “Titanium and Titanium Alloys for Medical,” *Nanomedicine*, no. November, 2014.
- [22] H. Ananth, V. Kundapur, H. S. Mohammed, M. Anand, G. S. Amarnath, and S. Mankar, “A Review on Biomaterials in Dental Implantology,” 2015. [Online]. Available: www.ijbs.org.
- [23] F. H. Froes, “04 - Titanium - Physical Metallurgy, Processing, and Applications,” *ASM Int.*, pp. 75–94, 2015.
- [24] T. Y. Xiong *et al.*, “Effect of Surface Morphology and Crystal Structure on Bioactivity of Titania Films Formed on Titanium Metal via Anodic Oxidation in Sulfuric Acid Solution,” in *Key Engineering Materials*, 2004, vol. 254–256, pp. 375–378, doi: 10.4028/www.scientific.net/kem.254-256.375.
- [25] T. Kokubo, H.-M. Kim, M. Kawashita, and T. Nakamura, “REVIEW Bioactive metals: preparation and properties,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, no. 2, pp. 99–107, 2004, doi: 10.1023/B:JMSM.0000011809.36275.0c.
- [26] T. Hanawa, “Transition of surface modification of titanium for medical and dental use,” in *Titanium in Medical and Dental Applications*, Elsevier, 2018, pp. 95–113.
- [27] D. A. H. Hanaor and C. C. Sorrell, “Review of the anatase to rutile phase transformation,” *J. Mater. Sci.*, vol. 46, no. 4, pp. 855–874, 2011, doi: 10.1007/s10853-010-5113-0.

- [28] P. I. Gouma and M. J. Mills, "Anatase-to-Rutile Transformation in Titania Powders," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 84, no. 3, pp. 619–622, 2001, doi: 10.1111/j.1151-2916.2001.tb00709.x.
- [29] M. H. Ahmed *et al.*, *Characteristics and applications of titanium oxide as a biomaterial for medical implants*. Elsevier Masson SAS., 2012.
- [30] T. Hanawa, "Biofunctionalization of titanium for dental implant," *Japanese Dental Science Review*, vol. 46, no. 2, pp. 93–101, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.jdsr.2009.11.001.
- [31] G. Balasundaram and T. J. Webster, "A perspective on nanophase materials for orthopedic implant applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 16, no. 38, pp. 3737–3745, 2006, doi: 10.1039/b604966b.
- [32] M. A. Arenas *et al.*, "Doped TiO₂ anodic layers of enhanced antibacterial properties," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 105, pp. 106–112, May 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.12.051.
- [33] K. Ishikawa, Y. Miyamoto, M. Nagayama, and K. Asaoka, "Blast Coating Method: New Method of Coating Titanium Surface with Hydroxyapatite at Room Temperature," John Wiley & Sons, 1997.
- [34] W. H. Song, Y. K. Jun, Y. Han, and S. H. Hong, "Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania," *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3341–3349, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.103.
- [35] E. G. Zemtsova, A. Y. Arbenin, R. Z. Valiev, and V. M. Smirnov, "Modern techniques of surface geometry modification for the implants based on titanium and its alloys used for improvement of the biomedical characteristics," in *Titanium in Medical and Dental Applications*, Elsevier, 2018, pp. 115–145.
- [36] A. Wennerberg, T. Albrektsson, C. Johansson, and B. Andersson, "Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography," *Biomaterials*, vol. 17, no. 1, pp. 15–22, 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)80750-2.
- [37] J. Miranda-Rius, E. Lahor-Soler, L. Brunet-Llobet, D. de Dios, and F. X. Gil, "Treatments to Optimize Dental Implant Surface Topography and Enhance Cell Bioactivity," *Dent. Implantol. Biomater.*, 2016, doi: 10.5772/62682.
- [38] A. Chateauminois, "ASM Handbook: Surface Engineering (Vol 5)," *Tribol. Int. - TRIBOL INT*, vol. 33, p. 67, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0301-679X(00)00006-2.
- [39] D. Buser, T. Nydegger, H. P. Hirt, D. L. Cochran, and L. P. Nolte, "Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs.," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 13, no. 5, pp. 611–9, 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9796144>.
- [40] K. Arvidson, H. Bystedt, A. Frykholm, L. Von Konow, and E. Lothigius, "Five-

- year prospective follow-up report of the Astra Tech Dental Implant System in the treatment of edentulous mandibles,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 9, no. 4. pp. 225–234, 1998, doi: 10.1034/j.1600-0501.1998.090403.x.
- [41] A. Wennerberg *et al.*, “Titanium release from implants prepared with different surface roughness: An in vitro and in vivo study,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 15, no. 5, pp. 505–512, 2004, doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01053.x.
- [42] A. Wennerberg, T. Albrektsson, H. Ulrich, and J. J. Krol, “An optical three-dimensional technique for topographical descriptions of surgical implants,” *J. Biomed. Eng.*, vol. 14, no. 5, pp. 412–418, 1992, doi: 10.1016/0141-5425(92)90087-2.
- [43] L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq, “Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration,” *Dental Materials*, vol. 23, no. 7. pp. 844–854, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.dental.2006.06.025.
- [44] A. Wennerberg and T. Albrektsson, “Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 20, no. SUPPL. 4, pp. 172–184, 2009, doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
- [45] A. Arvidsson, B. A. Sater, and A. Wennerberg, “The role of functional parameters for topographical characterization of bone-anchored implants,” *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, vol. 8, no. 2, pp. 70–76, 2006, doi: 10.1111/j.1708-8208.2006.00001.x.
- [46] C. R. Choi *et al.*, “Bone cell responses of titanium blasted with bioactive glass particles,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 25, no. 2, pp. 99–117, 2010, doi: 10.1177/0885328209337345.
- [47] K. W. Kang, A. L. Lemos Barboza, J. M. Echarri, and C. Llorente, “Caracterización Superficial y Transversal de Implantes Dentales de Titanio Blastinizados y Anodizados por Plasma Químico,” *Actas del CIBIM*, no. January, pp. 1108–1117, 2013, [Online]. Available: www.kntmedical.com.
- [48] A. Novaes-Jr, S. Scombatti de Souza, P. Oliveira, and A. Souza, “Histomorphometric Analysis of the Bone-Implant Contact Obtained with 4 Different Implant Surface Treatments Placed Side by Side in the Dog Mandible,” *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 17, pp. 377–383, May 2002.
- [49] M. Piattelli, A. Scarano, M. Paolantonio, G. Iezzi, G. Petrone, and A. Piattelli, “BONE RESPONSE TO MACHINED AND RESORBABLE BLAST MATERIAL TITANIUM IMPLANTS: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS KEY WORDS Bone growth Sandblasting Surface roughness Titanium implants,” 2002.
- [50] W. D. Müller *et al.*, “Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 14, no. 3, pp. 349–356, 2003, doi: 10.1034/j.1600-

0501.2003.00791.x.

- [51] C. Aparicio, F. Javier Gil, C. Fonseca, M. Barbosa, and J. A. Planell, "Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 2, pp. 263–273, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00314-9.
- [52] A. S. Fawzy and M. A. Amer, "An in vitro and in vivo evaluation of bioactive titanium implants following sodium removal treatment," *Dent. Mater.*, vol. 25, no. 1, pp. 48–57, 2009, doi: 10.1016/j.dental.2008.05.007.
- [53] C. Aparicio, F. J. Gil, J. A. Planell, and E. Engel, "Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 12, pp. 1105–1111, 2002, doi: 10.1023/A:1021173500990.
- [54] F. J. Gil, A. Padrós, J. M. Manero, C. Aparicio, M. Nilsson, and J. A. Planell, "Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental implants," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 22, no. 1, pp. 53–60, 2002, doi: 10.1016/S0928-4931(01)00389-7.
- [55] A. Jemat, M. J. Ghazali, M. Razali, and Y. Otsuka, "Surface modifications and their effects on titanium dental implants," *BioMed Research International*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, 2015, doi: 10.1155/2015/791725.
- [56] G. P. Wirtz, S. D. Brown, and W. M. Kriven, "Ceramic coatings by anodic spark deposition," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 6, no. 1, pp. 87–115, 1991, doi: 10.1080/10426919108934737.
- [57] L. H. Li, H. W. Kim, S. H. Lee, Y. M. Kong, and H. E. Kim, "Biocompatibility of titanium implants modified by microarc oxidation and hydroxyapatite coating," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 73, no. 1, pp. 48–54, 2005, doi: 10.1002/jbm.a.30244.
- [58] D. Wei, Y. Zhou, D. Jia, and Y. Wang, "Characteristic and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO₂-based coating after chemical treatment," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 5, pp. 817–827, 2007, doi: 10.1016/j.actbio.2007.03.001.
- [59] M. Skeldon, K. Shimizu, P. Skeldon, G. E. Thompson, and G. C. Wood, "The migration of Cl⁻ and I⁻ ions in anodic alumina," *Corros. Sci.*, vol. 37, no. 9, pp. 1473–1488, 1995, doi: 10.1016/0010-938X(95)00059-S.
- [60] J. Pavón *et al.*, "Anodic oxidation of titanium for implants and prosthesis: Processing, characterization and potential improvement of osteointegration," *IFMBE Proc.*, vol. 33 IFMBE, pp. 176–179, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-21198-0_45.
- [61] C. Aparicio, A. Padrós, and F. J. Gil, "In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 8, pp. 1672–1682, Nov. 2011, doi:

10.1016/j.jmbbm.2011.05.005.

- [62] H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 32, no. 3, pp. 409–417, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B.
- [63] H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 8, no. 6, pp. 341–347, 1997, doi: 10.1023/A:1018524731409.
- [64] H. Takadama, H. M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "TEM-EDX study of mechanism of bonelike apatite formation on bioactive titanium metal in simulated body fluid," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 441–448, 2001, doi: 10.1002/1097-4636(20011205)57:3<441::AID-JBM1187>3.0.CO;2-B.
- [65] S. Nishiguchi, S. Fujibayashi, H. M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Biology of alkali- and heat-treated titanium implants," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 67, no. 1, pp. 26–35, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10540.
- [66] A. Carradò *et al.*, "Nanoporous hydroxyapatite/sodium titanate bilayer on titanium implants for improved osteointegration," *Dent. Mater.*, vol. 33, no. 3, pp. 321–332, 2017, doi: 10.1016/j.dental.2016.12.013.
- [67] T. Kokubo and S. Yamaguchi, *Biomaterialization of Metals Using Chemical and Heat Treatments*. Elsevier Ltd., 2016.
- [68] M. Jaffe, W. Hammond, P. Tolia, and T. Arinzeh, "Characterization of biomaterials," *Characterization of Biomaterials*. pp. 1–318, 2012, doi: 10.1533/9780857093684.
- [69] A. Bandyopadhyay and S. Bose, *Characterization of Biomaterials*. 2013.
- [70] B. D. CULLITY, *Elements of X-Ray Diffraction*. 1978.
- [71] C. El Ghouch and J. Yusuf Isse, "Information Theoretic Similarity Measures for Robust Image Matching (Multimodal imaging-Infrared and visible light)," no. June, 2016, doi: 10.13140/RG.2.1.3209.1769.
- [72] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, 2nd ed. CRC Press, 2011.
- [73] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, vol. 8. 2005.
- [74] I. R. Lewis and H. Edwards, *Handbook of Raman Spectroscopy*. New York: CRC Press, 2001.
- [75] L. A. Giannuzzi, "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis 4th Edition, Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Joseph R. Michael, Nicholas W.M. Ritchie, John Henry J. Scott, David C. Joy, Springer, 2018, 550 pp. ISBN:978-1-4939-6674-5," *Microsc. Microanal.*, vol. 24, no. 6, p. 768, 2018, doi: DOI:

10.1017/S1431927618015271.

- [76] W. P. Dong, P. J. Sullivan, and K. J. Stout, “Comprehensive study of parameters for characterising three- dimensional surface topography. III: Parameters for characterising amplitude and some functional properties,” *Wear*, vol. 178, no. 1–2, pp. 29–43, 1994, doi: 10.1016/0043-1648(94)90127-9.
- [77] Y. Xia, M. Bigerelle, J. Marteau, P.-E. Mazeran, S. Bouvier, and A. Iost, “Effect of surface roughness in the determination of the mechanical properties of material using nanoindentation test.,” *Scanning*, vol. 36, no. 1, pp. 134–149, 2014, doi: 10.1002/sca.21111.
- [78] H. M. Kim *et al.*, “Influence of the titanium implant surface treatment on the surface roughness and chemical composition,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 505–512, Dec. 2020, doi: 10.1007/s12663-020-01437-5.
- [79] F. Rupp, L. Liang, J. Geis-Gerstorfer, L. Scheideler, and F. Hüttig, “Surface characteristics of dental implants: A review,” *Dental Materials*, vol. 34, no. 1. Elsevier Inc., pp. 40–57, Jan. 01, 2018, doi: 10.1016/j.dental.2017.09.007.
- [80] A. Wennerberg and T. Albrektsson, “Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces.,” *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 15, no. 3, pp. 331–44, 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874798>.
- [81] D. M. Dohan Ehrenfest, P. G. Coelho, B. S. Kang, Y. T. Sul, and T. Albrektsson, “Classification of osseointegrated implant surfaces: Materials, chemistry and topography,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 198–206, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.003.
- [82] G. R. M. Matos, “Surface Roughness of Dental Implant and Osseointegration,” *J. Maxillofac. Oral Surg.*, vol. 20, no. 1, 2021, doi: 10.1007/s12663-020-01437-5.
- [83] A. I. Nicolas-Silvente, E. Velasco-Ortega, I. Ortiz-Garcia, L. Monsalve-Guil, J. Gil, and A. Jimenez-Guerra, “Influence of the titanium implant surface treatment on the surface roughness and chemical composition,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 2, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3390/ma13020314.
- [84] M. A. F. Martinez *et al.*, “Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic properties derived from human,” *Int. J. Implant Dent.*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s40729-020-00243-5.
- [85] B. D. Boyan, A. Cheng, R. Olivares-Navarrete, and Z. Schwartz, “Implant Surface Design Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Maturation,” *Adv. Dent. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 10–17, 2016, doi: 10.1177/0022034515624444.
- [86] T. Provder and B. Kunz, “Application of profilometry and fractal analysis to the characterization of coatings surface roughness,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 27, no. 1–4, pp. 219–226, 1996, doi: 10.1016/0300-9440(94)00538-9.

- [87] R. D. Bonetto and J. L. Ladaga, “The variogram method for characterization of scanning electron microscopy images,” *Scanning*, vol. 20, no. 6, pp. 457–463, 1998, doi: 10.1002/sca.1998.4950200606.
- [88] E. Ponz, J. L. Ladaga, and R. D. Bonetto, “Measuring surface topography with SEM. I. EZEImage. a program to obtain 3D surface data.pdf,” pp. 170–177, 2006.
- [89] S. Amada and A. Satoh, “Fractal analysis of surfaces roughened by grit blasting,” *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 14, no. 1, pp. 27–41, 2000, doi: 10.1163/156856100742096.
- [90] M. Bramowicz, L. Braic, F. A. Azem, S. Kulesza, I. Birlik, and A. Vladescu, “Mechanical properties and fractal analysis of the surface texture of sputtered hydroxyapatite coatings,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 379, pp. 338–346, 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.04.077.
- [91] W. Kwaśny, L. A. Dobrzański, M. Pawlyta, and W. Gulbiński, “Fractal nature of surface topography and physical properties of the coatings obtained using magnetron sputtering,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 157–158, no. SPEC. ISS., pp. 188–193, 2004, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2004.09.028.
- [92] G. Reisel and R. B. Heimann, “Correlation between surface roughness of plasma-sprayed chromium oxide coatings and powder grain size distribution: A fractal approach,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 185, no. 2–3, pp. 215–221, 2004, doi: 10.1016/j.surfcoat.2004.01.018.
- [93] T. Silk, Q. Hong, J. Tamm, and R. G. Compton, “AFM studies of polypyrrole film surface morphology II. Roughness characterization by the fractal dimension analysis,” *Synth. Met.*, vol. 93, no. 1, pp. 65–71, 1998, doi: 10.1016/s0379-6779(98)80132-x.
- [94] T. R. Thomas, B. G. Rosén, and N. Amini, “Fractal characterisation of the anisotropy of rough surfaces,” *Wear*, vol. 232, no. 1, pp. 41–50, 1999, doi: 10.1016/S0043-1648(99)00128-3.
- [95] R. D. Bonetto, E. Forlerer, and J. L. Ladaga, “Texture characterization of digital images quasi-periodicity,” *Abrasives*, vol. 13, pp. 1458–1466, 2002.
- [96] R. D. Bonetto, J. L. Ladaga, and E. Ponz, “Measuring surface topography by scanning electron microscopy. II. Analysis of three estimators of surface roughness in second dimension and third dimension,” *Microsc. Microanal.*, vol. 12, no. 2, pp. 178–186, 2006, doi: 10.1017/S143192760606003X.
- [97] S. R. Nayak, J. Mishra, and G. Palai, “Analysing roughness of surface through fractal dimension: A review,” *Image Vis. Comput.*, vol. 89, pp. 21–34, 2019, doi: 10.1016/j.imavis.2019.06.015.
- [98] F. D. Bianchi and R. D. Bonetto, “FERImage: An interactive program for fractal dimension, dper and dmin calculation,” *Scanning*, vol. 23, no. 3, pp. 193–197, 2001, doi: 10.1002/sca.4950230305.

- [99] K. W. Kang, “Caracterización superficial de aleaciones para implantes mediante técnicas espectroscópicas y microscopía electrónica de barrido,” pp. 1–168, 2017, [Online]. Available: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/63513>.
- [100] V. 3198 Verein Deutscher Ingenieure Normen, “Verein Deutscher Ingenieure Normen.” VDI-Verlag, Dusseldorf, 1991.
- [101] T. Luxbacher, “The ZETA guide: Principles of the streaming potential technique,” *Ant. Paar GmbH Graz, Austria*, 2014.
- [102] K. Pate and P. Safier, “12 - Chemical metrology methods for CMP quality,” S. B. T.-A. in C. M. P. (CMP) Babu, Ed. Woodhead Publishing, 2016, pp. 299–325.
- [103] K. W. Kang, M. D. Pereda, M. E. Canafoglia, P. Bilmes, C. Llorente, and R. Bonetto, “Uncertainty studies of topographical measurements on steel surface corrosion by 3D scanning electron microscopy,” *Micron*, vol. 43, no. 2–3, pp. 387–395, 2012, doi: 10.1016/j.micron.2011.10.005.
- [104] J. I. Rosales-Leal *et al.*, “Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 365, no. 1–3, pp. 222–229, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.12.017.
- [105] F. Baino and S. Yamaguchi, “The use of simulated body fluid (SBF) for assessing materials bioactivity in the context of tissue engineering: Review and challenges,” *Biomimetics*, vol. 5, no. 4, pp. 1–19, 2020, doi: 10.3390/biomimetics5040057.
- [106] M. Borie *et al.*, “Peri-implant soft tissue integration in humans – influence of materials: A study protocol for a randomised controlled trial and a pilot study results,” *Contemp. Clin. Trials Commun.*, vol. 19, p. 100643, 2020, doi: 10.1016/j.conctc.2020.100643.
- [107] M. Herrero-Climent *et al.*, “Relevant design aspects to improve the stability of titanium dental implants,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 8, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/MA13081910.
- [108] I. K. Karoussis, U. Brägger, G. E. Salvi, W. Bürgin, and N. P. Lang, “Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: A 10-year prospective cohort study of the ITI® Dental Implant System,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 8–17, 2004, doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.00983.x.
- [109] J. T. Steigenga, K. F. Al-Shammari, F. H. Nociti, C. E. Misch, and H. L. Wang, “Dental implant design and its relationship to long-term implant success,” *Implant Dent.*, vol. 12, no. 4, pp. 306–317, 2003, doi: 10.1097/01.ID.0000091140.76130.A1.
- [110] J. W. Nicholson, “Titanium Alloys for Dental Implants: A Review,” *Prosthesis*, vol. 2, no. 2, pp. 100–116, 2020, doi: 10.3390/prosthesis2020011.
- [111] T. Albrektsson and C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,” *Eur. Spine J.*, vol. 10, pp. S96–S101, 2001, doi:

10.1007/s005860100282.

- [112] V. Goriainov, R. Cook, J. M. Latham, D. G. Dunlop, and R. O. C. Oreffo, “Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 10, pp. 4043–4057, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.004.
- [113] M. S. Zafar, I. Farooq, M. Awais, S. Najeeb, Z. Khurshid, and S. Zohaib, *Bioactive surface coatings for enhancing osseointegration of dental implants*. Elsevier Ltd., 2018.
- [114] S. Ferraris *et al.*, “Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation,” *Acta Biomater.*, vol. 102, pp. 468–480, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.11.024.
- [115] G. Kaur, O. P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, and G. Pickrell, “A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 1, pp. 254–274, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34690.
- [116] N. López-valverde, J. Flores-fraile, J. M. Ramírez, B. M. de Sousa, S. Herrero-hernández, and A. López-valverde, “Bioactive surfaces vs. Conventional surfaces in titanium dental implants: A comparative systematic review,” *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 1–28, 2020, doi: 10.3390/jcm9072047.
- [117] M. S. Zafar *et al.*, “Properties of dental biomaterials,” in *Advanced Dental Biomaterials*, Elsevier, 2019, pp. 7–35.
- [118] B. Priyadarshini, M. Rama, Chetan, and U. Vijayalakshmi, “Bioactive coating as a surface modification technique for biocompatible metallic implants: a review,” *J. Asian Ceram. Soc.*, vol. 7, no. 4, pp. 397–406, 2019, doi: 10.1080/21870764.2019.1669861.
- [119] K.-I. Jeong, Y.-K. Kim, S.-W. Moon, S.-G. Kim, S.-C. Lim, and P.-Y. Yun, “Histologic analysis of resorbable blasting media surface implants retrieved from humans: a report of two cases,” *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 42, no. 1, p. 38, 2016, doi: 10.5125/jkaoms.2016.42.1.38.
- [120] F. Zamparini, C. Prati, L. Generali, A. Spinelli, P. Taddei, and M. G. Gandolfi, “Micro-nano surface characterization and bioactivity of a calcium phosphate-incorporated titanium implant surface,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 12, no. 1, 2021, doi: 10.3390/jfb12010003.
- [121] M. Qadir, Y. Li, A. Biesiekierski, and C. Wen, “Surface Characterization and Biocompatibility of Hydroxyapatite Coating on Anodized TiO₂Nanotubes via PVD Magnetron Sputtering,” *Langmuir*, vol. 37, no. 16, pp. 4984–4996, 2021, doi: 10.1021/acs.langmuir.1c00411.
- [122] D. Wang, G. Wu, X. Lin, and Y. Liu, “Coatings for osseointegration of metallic biomaterials,” *Surf. Coat. Modif. Met. Biomater.*, no. 1985, pp. 345–358, 2015, doi: 10.1016/B978-1-78242-303-4.00011-9.

- [123] W. A. Camargo *et al.*, “Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation,” *Acta Biomater.*, vol. 57, pp. 511–523, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.016.
- [124] R. Kobatake *et al.*, “Comparative Study of Surface Modification Treatment for Porous Titanium,” *J. Oral Maxillofac. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 1–8, 2020, doi: 10.5037/jomr.2020.11205.
- [125] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [126] X. P. Jiang *et al.*, “Enhancement of fatigue and corrosion properties of pure Ti by sandblasting,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 429, no. 1–2, pp. 30–35, 2006, doi: 10.1016/j.msea.2006.04.024.
- [127] J. Lausmaa, “Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium,” pp. 231–266, 2001, doi: 10.1007/978-3-642-56486-4_8.
- [128] X. Liu, P. K. Chu, and C. Ding, “Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications,” *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 47, no. 3–4, pp. 49–121, Dec. 24, 2004, doi: 10.1016/j.mser.2004.11.001.
- [129] G. B. de Souza *et al.*, “Tribo-mechanical characterization of rough, porous and bioactive Ti anodic layers,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 5, pp. 796–806, 2011, doi: 10.1016/j.jmbbm.2010.09.012.
- [130] P. Zhang, Z. Zhang, W. Li, and M. Zhu, “Effect of Ti-OH groups on microstructure and bioactivity of TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 268, pp. 381–386, 2013, doi: 10.1016/j.apsusc.2012.12.105.
- [131] V. M. Frauchiger, M. Textor, F. Schlottig, B. Gasser, and N. D. Spencer, “Anodic plasma-chemical treatment of titanium implant surfaces,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 1, no. SUPPL. 2, p. 26, 2001.
- [132] D. Quintero, O. Galvis, J. A. Calderón, J. G. Castaño, and F. Echeverría, “Effect of electrochemical parameters on the formation of anodic films on commercially pure titanium by plasma electrolytic oxidation,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 258, pp. 1223–1231, 2014, doi: 10.1016/j.surfcoat.2014.06.058.
- [133] Q. Du *et al.*, “The effect of applied voltages on the structure, apatite-inducing ability and antibacterial ability of micro arc oxidation coating formed on titanium surface,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 4, pp. 426–433, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.06.001.
- [134] A. L. Yerokhin, X. Nie, A. Leyland, A. Matthews, and S. J. Dowey, “Plasma electrolysis for surface engineering,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 122, no. 2–3, pp. 73–93, 1999, doi: 10.1016/S0257-8972(99)00441-7.

- [135] D. K. Pattanayak, S. Yamaguchi, T. Matsushita, and T. Kokubo, “Nanostructured positively charged bioactive TiO₂ layer formed on Ti metal by NaOH, acid and heat treatments,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 8, pp. 1803–1812, 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4372-x.
- [136] M. D. Wadge *et al.*, “Developing highly nanoporous titanate structures via wet chemical conversion of DC magnetron sputtered titanium thin films,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 566, pp. 271–283, 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2020.01.073.
- [137] G. L. Zhao, L. Xia, B. Zhong, S. S. Wu, L. Song, and G. W. Wen, “Effect of alkali treatments on apatite formation of microarc-oxidized coating on titanium alloy surface,” *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)*, vol. 25, no. 4, pp. 1151–1157, 2015, doi: 10.1016/S1003-6326(15)63710-4.
- [138] S. YAMAGUCHI, H. TAKADAMA, T. MATSUSHITA, T. NAKAMURA, and T. KOKUBO, “Cross-sectional analysis of the surface ceramic layer developed on Ti metal by NaOH-heat treatment and soaking in SBF,” *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 117, no. 1370, pp. 1126–1130, 2009, doi: 10.2109/jcersj.2.117.1126.
- [139] M. Wei, H. M. Kim, T. Kokubo, and J. H. Evans, “Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 125–134, 2002, doi: 10.1016/S0928-4931(02)00022-X.
- [140] F. L. R. e. Silva *et al.*, “Polarized Raman, FTIR, and DFT study of Na₂Ti₃O₇ microcrystals,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 49, no. 3, pp. 538–548, Mar. 2018, doi: 10.1002/jrs.5316.
- [141] S. Papp, L. Kőrösi, V. Meynen, P. Cool, E. F. Vansant, and I. Dékány, “The influence of temperature on the structural behaviour of sodium tri- and hexatitanates and their protonated forms,” *J. Solid State Chem.*, vol. 178, no. 5, pp. 1614–1619, May 2005, doi: 10.1016/j.jssc.2005.03.001.
- [142] H. Liu *et al.*, “A Raman spectroscopic and TEM study on the structural evolution of Na₂Ti₃O₇ during the transition to Na₂Ti₆O₁₃,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 41, no. 10, pp. 1331–1337, 2010, doi: 10.1002/jrs.2561.
- [143] B. C. Viana, O. P. Ferreira, A. G. Souza Filho, J. M. Filho, and O. L. Alves, “Structural, Morphological and Vibrational Properties of Titanate Nanotubes and Nanoribbons,” 2009.
- [144] U. Anjaneyulu, D. K. Pattanayak, and U. Vijayalakshmi, “Snail Shell Derived Natural Hydroxyapatite: Effects on NIH-3T3 Cells for Orthopedic Applications,” *Mater. Manuf. Process.*, vol. 31, no. 2, pp. 206–216, 2016, doi: 10.1080/10426914.2015.1070415.
- [145] F. Bakan *et al.*, “Direct Focused Ion Litography of Biphasic Calcium Phosphate (BCP) Bioceramics Surfaces,” pp. 773–776, 2018.
- [146] U. Balachandran and N. G. Eror, “Raman Spectra of Titanium Dioxide,” 1982.

- [147] P. Kern and O. Zinger, “Purified titanium oxide with novel morphologies upon spark anodization of Ti alloys in mixed H₂SO₄/H₃PO₄ electrolytes,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 80, pp. 283–96, 2007, doi: 10.1002/jbm.a.
- [148] M. Ocaña, J. V. Garcia-Ramos, and C. J. Serna, “Low-Temperature Nucleation of Rutile Observed by Raman Spectroscopy during Crystallization of TiO₂,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 75, no. 7, pp. 2010–2012, 1992, doi: 10.1111/j.1151-2916.1992.tb07237.x.
- [149] T. Ohsaka, F. Izumi, and Y. Fujiki, “Raman spectrum of anatase, TiO₂,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 7, no. 6, pp. 321–324, 1978, doi: 10.1002/jrs.1250070606.
- [150] M. R. Garsivaz Jazi *et al.*, “Corrosion mechanisms in titanium oxide-based films produced by anodic treatment,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 285, no. 9, pp. 357–361, 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2017.03.011.
- [151] Y. Hu, Z. Wang, J. Ai, S. Bu, and H. Liu, “Preparation of coating on the titanium surface by micro-arc oxidation to improve corrosion resistance,” *Coatings*, vol. 11, no. 2, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/coatings11020230.
- [152] H. Liu *et al.*, “A Raman spectroscopic study on the active site of sodium cations in the structure of Na₂Ti₃O₇ during the adsorption of Sr²⁺ and Ba²⁺ cations,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 41, no. 12, pp. 1792–1796, 2010, doi: 10.1002/jrs.2634.
- [153] N. Buzgar and A. Ionut Apopei, “The Raman study of Carbonates,” *Geologie*, vol. 55, no. 2, pp. 97–112, 2009.
- [154] S. Tugulu, K. Löwe, D. Scharnweber, and F. Schlottig, “Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 10, pp. 2751–2763, 2010, doi: 10.1007/s10856-010-4138-x.
- [155] M. R. Garsivaz Jazi, M. A. Golozar, K. Raeissi, and M. Fazel, “Surface characteristics and electrochemical impedance investigation of spark-anodized Ti-6Al-4V alloy,” *J. Mater. Eng. Perform.*, vol. 23, no. 4, pp. 1270–1278, 2014, doi: 10.1007/s11665-014-0911-1.
- [156] I. Hacisalihoglu, A. Samancioglu, F. Yildiz, G. Purcek, and A. Alsaran, “Tribocorrosion properties of different type titanium alloys in simulated body fluid,” *Wear*, vol. 332–333, pp. 679–686, 2015, doi: 10.1016/j.wear.2014.12.017.
- [157] D. Veys-Renaux, Z. Ait El Haj, and E. Rocca, “Corrosion resistance in artificial saliva of titanium anodized by plasma electrolytic oxidation in Na₃PO₄,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 285, pp. 214–219, 2016, doi: 10.1016/j.surfcoat.2015.11.028.
- [158] O. P. Ferreira, A. G. Souza Filho, J. Mendes Filho, and O. L. Alves, “Unveiling the structure and composition of titanium oxide nanotubes through ion exchange chemical reactions and thermal decomposition processes,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 17, no. 2, pp. 393–402, 2006, doi: 10.1590/s0103-50532006000200025.

- [159] N. Chosa, M. Taira, S. Saitoh, N. Sato, and Y. Araki, “Characterization of apatite formed on alkaline-heat-treated Ti,” *J. Dent. Res.*, vol. 83, no. 6, pp. 465–469, 2004, doi: 10.1177/154405910408300606.
- [160] S. Yamaguchi *et al.*, “Two-in-one biointerfaces—Antimicrobial and bioactive nanoporous gallium titanate layers for titanium implants,” *Nanomaterials*, vol. 7, no. 8, 2017, doi: 10.3390/nano7080229.
- [161] T. Kawai *et al.*, “Apatite formation on surface titanate layer with different Na content on Ti metal,” *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 118, no. 1373, pp. 19–24, 2010, doi: 10.2109/jcersj2.118.19.
- [162] Y. Shu, G. Ou, L. Wang, J. Zou, and Q. Li, “Surface modification of titanium with heparin-chitosan multilayers via layer-by-layer self-assembly technique,” *J. Nanomater.*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/423686.
- [163] D. Chen, E. H. Jordan, M. Gell, and M. Wei, “Apatite formation on alkaline-treated dense TiO₂ coatings deposited using the solution precursor plasma spray process,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 3, pp. 553–559, 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2007.11.008.
- [164] I. Becker, I. Hofmann, and F. A. Müller, “Preparation of bioactive sodium titanate ceramics,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 27, no. 16, pp. 4547–4553, 2007, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.03.024.
- [165] N. Ren *et al.*, “In situ construction of a titanate-silver nanoparticle-titanate sandwich nanostructure on a metallic titanium surface for bacteriostatic and biocompatible implants,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 36, pp. 19151–19160, 2012, doi: 10.1039/c2jm32434b.
- [166] V. Štengl *et al.*, “Sodium titanate nanorods: Preparation, microstructure characterization and photocatalytic activity,” *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 20–30, 2006, doi: 10.1016/j.apcatb.2005.09.006.
- [167] M. Khan, A. H. Naqvi, and M. Ahmad, “Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles,” *Toxicol. Reports*, vol. 2, pp. 765–774, 2015, doi: 10.1016/j.toxrep.2015.02.004.
- [168] M. Chellappa, U. Anjaneyulu, G. Manivasagam, and U. Vijayalakshmi, “Preparation and evaluation of the cytotoxic nature of TiO₂ nanoparticles by direct contact method,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, no. October, pp. 31–41, 2015, doi: 10.2147/IJN.S79978.
- [169] S. Durdu, G. Cihan, E. Yalcin, and A. Altinkok, “Characterization and mechanical properties of TiO₂ nanotubes formed on titanium by anodic oxidation,” *Ceram. Int.*, vol. 47, no. 8, pp. 10972–10979, 2021, doi: 10.1016/j.ceramint.2020.12.218.
- [170] K. Nakamoto, “Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Handbook of Vibrational Spectroscopy,” *Handb. Vib. Spectrosc.*, pp. 1872–1892, 2006, doi: 10.1002/9780470027325.s4104.

- [171] I.-H. Kim, T.-Y. Kwon, and K.-H. Kim, "Wetting Behavior of Dental Implants," in *Wetting and Wettability*, InTech, 2015.
- [172] F. Rupp *et al.*, "A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 2894–2906, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.040.
- [173] S. Ferraris *et al.*, "Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 3, pp. 533–545, 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4246-2.
- [174] J. W. Park, J. H. Jang, C. S. Lee, and T. Hanawa, "Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 2311–2321, 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.026.
- [175] J. Kim *et al.*, "Characterization of titanium surface modification strategies for osseointegration enhancement," *Metals (Basel)*, vol. 11, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/met11040618.
- [176] K. J. Tan, M. I. Idris, and H. Z. Abdullah, "Investigation of surface properties of titanium treated with combined alkali and sodium removal treatments," *Mater. Sci. Forum*, vol. 840, pp. 225–230, 2016, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.840.225.
- [177] K. Nakata and A. Fujishima, "TiO₂ photocatalysis: Design and applications," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 13, no. 3, pp. 169–189, 2012, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.06.001.
- [178] M. Lorenzetti, T. Luxbacher, S. Kobe, and S. Novak, "Electrokinetic behaviour of porous TiO₂-coated implants," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 6, pp. 2–5, 2015, doi: 10.1007/s10856-015-5521-4.
- [179] S. Ferraris, M. Cazzola, V. Peretti, B. Stella, and S. Spriano, "Zeta potential measurements on solid surfaces for in Vitro biomaterials testing: Surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. MAY, pp. 1–7, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00060.
- [180] A. A. Farghali, A. H. Zaki, and M. H. Khedr, "Control of selectivity in heterogeneous photocatalysis by tuning TiO₂ morphology for water treatment applications," *Nanomater. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–6, 2016, doi: 10.5772/62296.
- [181] R. Xu, "Electrophoretic Light Scattering BT - Particle Characterization: Light Scattering Methods," R. Xu and B. Scarlett, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002, pp. 289–343.
- [182] S. Ferraris *et al.*, "The mechanical and chemical stability of the interfaces in bioactive materials: The substrate-bioactive surface layer and hydroxyapatite-bioactive surface layer interfaces," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 116, no. April, p.

111238, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.111238.

- [183] H. Wang, J. K. Lee, A. Moursi, and J. J. Lannutti, “Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite in vitro,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 67, no. 2, pp. 599–608, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10538.
- [184] M. Uchida, H. M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, and T. Nakamura, “Effect of water treatment on the apatite-forming ability of NaOH-treated titanium metal,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 63, no. 5, pp. 522–530, 2002, doi: 10.1002/jbm.10304.
- [185] M. Uchida, H. M. Kim, T. Kokubo, K. Tanaka, and T. Nakamura, “Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 64, no. 1284, pp. 164–70, 2003, doi: 10.2109/jcersj.110.710.
- [186] H. M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, J. H. Lee, T. Kokubo, and T. Nakamura, “Surface potential change in bioactive titanium metal during the process of apatite formation in simulated body fluid,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 67, no. 4, pp. 1305–1309, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.20039.
- [187] S. Fujibayashi *et al.*, “Bioactive titanium: Effect of sodium removal on the bone-bonding ability of bioactive titanium prepared by alkali and heat treatment,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 56, no. 4, pp. 562–570, 2001, doi: 10.1002/1097-4636(20010915)56:4<562::AID-JBM1128>3.0.CO;2-M.
- [188] M. Ravelingien *et al.*, “Thermal decomposition of bioactive sodium titanate surfaces,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 23, pp. 9539–9542, 2009, doi: 10.1016/j.apsusc.2009.07.091.
- [189] H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, “Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 38, no. 2, pp. 121–127, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199722)38:2<121::AID-JBM6>3.0.CO;2-S.
- [190] M. Ravelingien *et al.*, “Thermal decomposition of bioactive sodium titanate surfaces,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 23, pp. 9539–9542, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.apsusc.2009.07.091.
- [191] M. Fujio, S. Komasa, H. Nishizaki, T. Sekino, and J. Okazaki, “Biocompatibility of titanium surface nanostructures following chemical processing and heat treatment,” *Front. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 6, pp. 1–10, 2016, doi: 10.15761/fnn.1000143.
- [192] M. G. De Oliveira, P. A. Radi, D. A. Pereira Reis, and A. G. Dos Reis, “Titanium bioactive surface formation via alkali and heat treatments for rapid osseointegration,” *Mater. Res.*, vol. 24, no. 5, 2021, doi: 10.1590/1980-5373-MR-2020-0514.
- [193] X. Chen *et al.*, “A high bioactive alkali-treated titanium surface induced by induction heat treatment,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 385, Mar. 2020, doi:

10.1016/j.surfcoat.2020.125362.

- [194] F. L. R. e. Silva *et al.*, “Polarized Raman, FTIR, and DFT study of Na₂Ti₃O₇ microcrystals,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 49, no. 3, pp. 538–548, 2018, doi: 10.1002/jrs.5316.
- [195] X. Chen *et al.*, “A high bioactive alkali-treated titanium surface induced by induction heat treatment,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 385, no. October 2019, p. 125362, 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.125362.
- [196] Y. Arima and H. Iwata, “Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 20, pp. 3074–3082, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.013.
- [197] S. N. Rodrigues, I. C. Gonçalves, M. C. L. Martins, M. A. Barbosa, and B. D. Ratner, “Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 31, pp. 5357–5367, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.010.
- [198] M. Mozafari, S. Banijamali, F. Baino, S. Kargozar, and R. G. Hill, “Calcium carbonate: Adored and ignored in bioactivity assessment,” *Acta Biomater.*, vol. 91, pp. 35–47, 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.039.
- [199] C. M. Tang, F. Y. Fan, W. T. Lin, L. Wang, and W. C. Lin, “Effect of bioactivity of surface topography and coating forming by infrared light-induced on titanium for bone repair,” *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 22, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/app10228158.
- [200] Y. Svenskaya *et al.*, “Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer,” *Biophys. Chem.*, vol. 182, pp. 11–15, 2013, doi: 10.1016/j.bpc.2013.07.006.
- [201] A. Oyane, H. M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, and T. Nakamura, “Preparation and assessment of revised simulated body fluids,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 65, no. 2, pp. 188–195, May 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10482.
- [202] A. Oyane, H. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, and T. Nakamura, “Preparation and assessment of revised simulated body fluids,” vol. Part A, no. 65(2), pp. 188–195, 2003.
- [203] E. Martínez *et al.*, “Stem cell differentiation by functionalized micro- and nanostructured surfaces,” *Nanomedicine*, vol. 4, no. 1, pp. 65–82, 2009, doi: 10.2217/17435889.4.1.65.
- [204] L. Gan, Y. Liu, D. Cui, Y. Pan, L. Zheng, and M. Wan, “Dental Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application,” *Stem Cells Int.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8864572.
- [205] B. S. Kim, J. S. Kim, Y. M. Park, B. Y. Choi, and J. Lee, “Mg ion implantation

- on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1554–1560, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2012.12.061.
- [206] S. Won, Y. H. Huh, L. R. Cho, H. S. Lee, E. S. Byon, and C. J. Park, “Cellular Response of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells to Titanium Surfaces Implanted with Calcium and Magnesium Ions,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 123–131, 2017, doi: 10.1007/s13770-017-0028-3.
- [207] G. Thalji and L. F. Cooper, “Molecular Assessment of Osseointegration In Vitro: A Review of Current Literature,” *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 29, no. 2, pp. e171–e199, 2014, doi: 10.11607/jomi.te55.
- [208] R. Olivares-Navarrete *et al.*, “Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, pp. 2728–2735, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.029.
- [209] Y. N. Shin *et al.*, “Adhesion comparison of human bone marrow stem cells on a gradient wettable surface prepared by corona treatment,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 2, pp. 293–296, 2008, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.173.
- [210] M. J. Dalby *et al.*, “The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder,” *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 12, pp. 997–1003, 2007, doi: 10.1038/nmat2013.
- [211] Y. Yang, D. Dennison, and J. L. Ong, “Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities,” *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.*, vol. 20, no. 2, pp. 187–192, 2005.
- [212] M. J. Dalby *et al.*, “Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2980–2987, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.010.
- [213] D. H. Li, B. L. Liu, J. C. Zou, and K. W. Xu, “Improvement of Osseointegration of Titanium Dental Implants by a Modified Sandblasting Surface Treatment: An in Vivo Interfacial Biomechanics Study,” *Implant Dent.*, vol. 8, no. 3, pp. 289–294, 1999, doi: 10.1097/00008505-199903000-00014.
- [214] R. G. Flemming, C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman, and P. F. Nealey, “Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 6, pp. 573–588, 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(98)00209-9.
- [215] J. S. Khaw, C. R. Bowen, and S. H. Cartmell, “Effect of tio2 nanotube pore diameter on human mesenchymal stem cells and human osteoblasts,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 11, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/nano10112117.
- [216] C. Matta *et al.*, “Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is enhanced by an aragonite scaffold,” *Differentiation*, vol.

107. pp. 24–34, 2019, doi: 10.1016/j.diff.2019.05.002.

- [217] F. A. Shah, S. Sayardoust, P. Thomsen, and A. Palmquist, “Extracellular matrix composition during bone regeneration in the human dental alveolar socket,” *Bone*, vol. 127, no. June, pp. 244–249, 2019, doi: 10.1016/j.bone.2019.06.003.