



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Obtención y caracterización de una capa bioactiva de fosfato de calcio sobre implantes dentales de titanio por vía química

Joaquim Nogueras Bayona



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Departament d'Odontostomatologia

Universitat de Barcelona

Programa: Tècniques Clíniques en Odontostomatologia

Bienio 1998-2000

# Obtención y caracterización de una capa bioactiva de fosfato de calcio sobre implantes dentales de titanio por vía química

Joaquim Nogueras Bayona

Odontólogo

Para optar al título de Doctor en Odontología

Directores:

Prof. Dr. Joan Salsench Cabré

Prof. Dr. Francisco Javier Gil Mur



Trabajo realizado bajo convenio entre la Universitat de Barcelona y la Divisió de Biomaterials del Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700872381

1700872384

# ÍNDICE

1. Introducción.	3
1.1. Justificación.	5
1.2. Respuesta de los tejidos biológicos a los implantes dentales.	7
1.2.1. Respuesta gingival al implante.	7
1.2.2. Respuesta ósea al implante.	9
1.2.2.1. Biología ósea.	10
1.2.2.2. Resp. del tejido óseo a la inserción implante.	11
1.3. Biomateriales.	13
1.3.1. Metales.	13
1.3.1.1. Acero inoxidable.	14
1.3.1.2. Aleaciones de cobalto.	14
1.3.1.3. Titanio – Aleaciones de titanio.	15
1.3.2. Cerámicas	19
1.3.2.1.1. Óxidos de Aluminio	19
1.3.2.1.2. Fosfatos de Calcio	20
1.3.2.1.3. Vitro-cerámica	29
1.3.2.1.4. Carbonos	30
1.3.3. Materiales poliméricos	31
1.4. Interacciones de la interfase biomaterial-hueso	31
1.4.1. Osteointegración	32
1.4.2. Biomecánica	34
2. Hipótesis de trabajo	35
3. Objetivos	39
4. Material y Método	43
4.1. Material	45
4.2. Preparación de muestras para microscopio óptico y electrónico	45
4.2.1. Encastación de las muestras	46
4.2.2. Pulido y ataque de las muestras	47
4.2.3. Microscopía óptica	47
4.2.4. Microscopía óptica de barrido y microanálisis de energía dispersa	48
4.3. Determinación de la rugosidad de los materiales	50
4.4. Metodología de preparación de la capa bioactiva	51
4.4.1. Bioactivación de superf. del Ti por tratamiento químico y térmico	51
4.4.2. Deposición in vitro de la capa de fosfato de calcio	53
4.5. Microscopía electrónica ambiental	56
4.6. Determinación de la rugosidad de la capa de fosfato de calcio	57
4.7. Determinación de microdurezas	58
4.8. Método de arrancamiento	59
4.9. Métodos estadísticos	
5. Resultados	61
5.1. Caracterización metalúrgica del titanio	63
5.2. Caracterización de las capas bioactivas	64

5.2.1.	Caracterización de capa después del tratamiento químico y térmico	65
5.2.2.	Caracterización de capa tras la inmersión en SBF	66
5.3	Determinación de la rugosidad de las muestras	71
5.4	Microdurezas de la capa depositada	73
5.5	Método de arrancamiento	73
6	Discusión	75
6.1	Caracterización metalúrgica del titanio	77
6.2	Caracterización de las capas bioactivas	77
6.2.1	Formación de la cap de titanato	78
6.2.2	Formación de la capa de fosfato de calcio	80
6.3	Rugosidad de las muestras	84
6.4	Microdureza	85
6.5	Método de arrancamiento	85
7	Perspectivas de futuro y estudios anexos	87
8	Conclusiones	95
9	Bibliografía	99

## **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

Las prótesis dentales sobre implantes osteointegrados son actualmente el tratamiento de elección de numerosos pacientes deseados de sustituir sus dientes ausentes de forma sencilla y confortable, ya que suponen una alternativa viable al tratamiento con prótesis removibles y prótesis fijas que obligan a la utilización de incómodos dispositivos o al tallado de dientes sanos. Todo esto ha provocado que la implantología haya sido una de las materias con un mayor desarrollo, y que más haya atraído a los profesionales dentales en las últimas décadas del siglo XX.

Son muy numerosos y de diferente naturaleza los factores que influyen en el éxito o el fracaso de los tratamientos con implantes. La correcta integración de estos materiales en el tejido óseo mandibular y maxilar ha sido, y sigue siendo, el principal problema que hay que afrontar. Así, la elaboración de un implante con una superficie externa que presente una forma y un material que permita una unión al hueso vivo de forma rápida y efectiva es el principal objetivo para conseguir unos buenos resultados a largo plazo.

Las ciencias básicas son, el soporte necesario para descubrir y analizar nuevos sistemas y materiales que puedan ser aplicados en clínica, una vez hayan sido mejorados y desarrollados en el laboratorio. La ciencia de los biomateriales dentales se ha ido desarrollando en las últimas décadas paralelamente a la expansión de los tratamientos con implantes, con la intención de encontrar fórmulas que permitan mejorar y acortar el tiempo de osteointegración.

El recubrimiento de los implantes osteointegrados con una capa bioactiva de fosfatos de calcio, particularmente la hidroxiapatita (HA), con capacidad osteoconductora y de enlazarse químicamente con el hueso vivo, pareció ser una solución muy acertada a los problemas de integración.

Han sido diversas las técnicas utilizadas para lograr la confección de esta superficie bioactiva de recubrimiento sobre los implantes (deposición electroforética, emisión de iones, sistema de radiofrecuencia, ablación láser...), pero ninguna de ellas se utiliza industrialmente a excepción del método de proyección de plasma (plasma spray). No obstante, las distintas

deficiencias que presenta este método no han permitido obtener los resultados esperados a largo plazo.

El sistema de recubrimiento de implantes por proyección de plasma a altas temperaturas no permite el control de la correcta composición, cristalización y estructuración de la capa de los cristales de fosfato de calcio, provocándose una deficiente unión con el sustrato metálico del implante y con el hueso vivo, que a la larga conlleva el desprendimiento de esta capa bioactiva. Todo esto puede traer como resultado la pérdida del implante. La importancia clínica de este hecho es objeto de debate entre partidarios de los recubrimientos por dicha técnica y los que prefieren utilizar implantes de titanio sin recubrir.

Con la idea de superar todos estos inconvenientes, se han desarrollado líneas de investigación para la formación de una capa bioactiva de fosfatos de calcio sobre implantes de titanio, o de alguna de sus aleaciones, por vía química.

La elaboración de esta capa de fosfato de calcio por inmersión en una disolución que simula el fluido fisiológico, que presente las características de uniformidad, grosor y bioactividad necesarias para su correcta osteointegración, permitirá mejorar las características mecánicas del implante al lograrse una unión química entre el sustrato de titanio y la superficie externa de fosfato de calcio.

Así pues, el estudio y la obtención de una superficie bioactiva de fosfato de calcio sobre implantes dentales por método químico constituye un tema abierto en el que las investigaciones en biomateriales puedan solucionar algunos problemas surgidos por la utilización de otros sistemas de deposición de capas bioactivas.

## 1.2 RESPUESTA DE LOS TEJIDOS BIOLÓGICOS A LOS IMPLANTES DENTALES

Los odontólogos están acostumbrados a utilizar materiales inertes para restaurar las pérdidas de tejido dental producidas por las caries y los traumatismos. La característica esencial del diente es que se trata de una estructura de tejido duro que no cambia ni se degenera en contacto con el material de restauración; a excepción de que se produzca la lesión de la pulpa viva, en cuyo caso se procede a su tratamiento con materiales igualmente inertes.

Con la utilización de los implantes endoóseos se produce la invasión de un espacio biológico en el que los tejidos afectados generan una respuesta celular y hística al material del implante y a la prótesis que debe soportar. En el caso de los implantes bucales los tejidos biológicos afectados serán el tejido gingival y el tejido óseo.

### 1.2.1 Respuesta gingival al implante

Todos los implantes óseos presentan una supraestructura que debe atravesar inexorablemente la encía oral recubierta por un epitelio escamoso estratificado.

El principal interés de la respuesta biológica de la encía respecto al implante endoóseo reside en la formación del sellado biológico<sup>1</sup>, que supone la barrera física protectora entre la cavidad bucal y el medio óseo interno, impidiendo el paso de bacterias, toxinas y cualquier otra sustancia nociva que pueda provocar el fracaso del implante. Este sellado se logra con la regeneración de la encía insertada alrededor del pilar del implante<sup>2,3</sup>.

Los estudios histológicos de los tejidos gingivales periimplantarios muestran que sus estructuras son parecidas a las que se encuentran alrededor de un diente. La encía, una vez sometida a tratamiento quirúrgico por la colocación del pilar emergente transepitelial, cura alrededor de este aditamento formando un nuevo reborde gingival con un surco gingival y una hendidura gingival libre.

Las células epiteliales del surco gingivo-implantario presentan una morfología similar a las células epiteliales del surco gingivo-dental:

- ausencia de queratina
- ausencia de mamelones en el tejido conjuntivos
- disminución del número de capas celulares desde la punta hasta la base

En el fondo de este surco gingival están las células epiteliales en contacto con la superficie del implante a la que se adhieren por medio de la lámina basal, de hemidesmosomas y de una capa de mucopolisacáridos o glucoproteínas; todas ellas son estructuras de inserción que son reconocidas como componentes normales de la biología celular.

La lámina basal de este complejo de inserción está compuesta fundamentalmente de colágeno tipo IV. Los hemidesmosomas son placas de inserción que mantienen las células epiteliales unidas a la lámina basal. También participan en esta unión un glucocáliz (también conocido como cuerpo lineal), capa muy delgada de glucoproteínas que reviste las células epiteliales; y la laminina, enzima que actúa como agente de unión molecular entre las células epiteliales y las capas de la lámina basal<sup>4</sup>.

Aunque los componentes de colágeno del glucocáliz no se unen fisiológicamente a la superficie del implante, el elevado contenido de mucopolisacáridos (glucosaminoglucanos) en contacto con el implante ofrece la adhesividad necesaria para crear una adhesión biológicamente activa en el surco gingival.

El proceso de formación del complejo de inserción del sellado biológico ocurre durante el proceso de regeneración de la encía insertada y la formación del borde gingival libre. Los fibroblastos recubren la superficie del implante con glucosaminoglucanos, a la vez que producen fibronectina, que permitirá la adherencia de la lámina basal a otras estructuras. Esta lámina basal, con hemidesmosomas, es creada por las células epiteliales del surco regenerado; en este proceso se sintetiza también laminina. La laminina y los hemidesmosomas fijan la lámina basal a las células epiteliales. La fibronectina actúa como material de adhesión molecular entre la capa de glucosaminoglucanos y la lámina basal.

La unión y la proliferación de los fibroblastos gingivales parecen estar influenciada por la textura y las propiedades de la superficie del implante<sup>5,6</sup>. Así, las superficies lisas o electropulidas pueden presentar características óptimas para estar en contacto con los tejidos blandos favoreciendo el crecimiento y adhesión de los fibroblastos de la encía.

El tejido conjuntivo subyacente al epitelio de unión presenta características igualmente similares a las fibras gingivales dentarias en lo referente a la orientación de las fibras de colágeno.

La fisiología de este surco gingivoimplantario también resulta similar a la gingivodental. La existencia de un buen sellado fisiológico evita la proliferación intraósea bacteriana a través de este surco.

En la figura 1<sup>7</sup> se muestran las estructuras anatómicas que forman el mecanismo de inserción entre el epitelio de unión regenerado y la superficie del implante: La membrana citoplasmática epitelial (Pm) conteniendo el hemidesmosoma (HD) con sus diferentes elementos, las estructuras periféricas densas (Pd) y los filamentos finos (ff), que se extienden hacia el citoplasma y la lámina basal. La lámina basal, por su parte, está compuesta por la lámina lúcida (LL), la lámina densa (LD) y la sublámina lúcida (SLL) que contiene cadenas de fibronectina. El glucocálix (Gly) o cuerpo lineal se encuentra sobre la superficie del implante (IM).

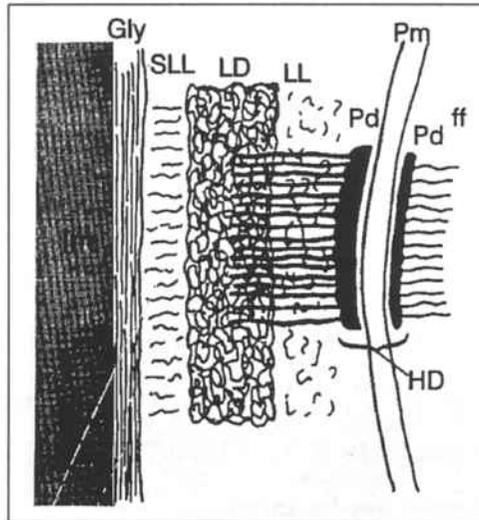


Figura 1. Mecanismo de inserción entre epitelio de unión regenerado y superficie del implante<sup>7</sup>

### 1.2.2 Respuesta ósea al implante

El hueso, a diferencia de los dientes, es un tejido sometido a cambios constantes, durante toda la vida se va creando hueso nuevo que sustituye al antiguo. Esto le permite ser uno de los pocos órganos que puedan regenerarse y curarse en caso de lesión. Así, muchos profesionales “recomiendan” a sus hijos que es preferible fracturarse un hueso que posteriormente puede regenerarse que no un diente cuya lesión puede sustituirse pero nunca curarse biológicamente.

La capacidad regenerativa del tejido óseo maxilar y mandibular nos permite la colocación de implantes en su interior para la posterior sujeción de una prótesis dental. La reparación ósea alrededor del implante, bajo unas condiciones controladas, permitirá la integración del mismo y el éxito de nuestro tratamiento.

Morfológicamente, el tejido óseo se puede clasificar en hueso compacto y hueso trabecular.

El hueso compacto o cortical se sitúa conformando la superficie externa de los huesos, siendo bastante denso y con pocos espacios dentro del tejido. Por el contrario, el hueso trabecular o esponjoso presenta bastantes espacios dentro de su tejido, denominados cavidad medular, en cuyo interior se aloja una médula que, en muchas ocasiones, se encarga de la síntesis de las células sanguíneas (médula roja). La médula roja se convierte en la mayoría de las ocasiones en un lugar para el almacenamiento de grasa (médula amarilla).

### 1.2.2.1 Biología Ósea

La osteogénesis es el mecanismo básico de formación de tejido óseo.(Fig. 2-A, 2-B, 2-C)<sup>7</sup>

Los osteoblastos (Fig. 2-A-B, n°1) son las células formadoras de hueso, y se originan a partir de las células osteogénicas (Fig. 2-A, n°2) que, a su vez, se originan a partir de las células mesenquimatosas, más primitivas que las anteriores.

En caso de necesidad de formación de hueso, las células osteogénicas reciben la señal de diferenciarse en osteoblastos. Estos emiten prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 2-A-B, n°3) que entran en contacto entre sí, formando una especie de estructura reticular dejando espacios amplios sin ocupar (espacio intercelular). Entonces los osteoblastos segregan a este espacio intercelular compuestos orgánicos que presentan un componente fibroso y uno amorfo. El componente fibroso es fundamentalmente colágeno de tipo I, mientras que el amorfo se compone de proteoglucanos, proteínas no colágenas y glucoproteínas. Estos componentes orgánicos junto al agua forman la matriz orgánica (Fig. 2-B, n°4) que rellena el espacio intercelular. Esta matriz producida por los osteoblastos no está mineralizada y se denomina preósea u osteoide.

La siguiente fase de formación de hueso es la mineralización de la matriz preósea con la deposición de iones calcio y fosfato (cristales de hidroxapatita). Este proceso se cree que está también bajo el control de los osteoblastos.

Una vez terminada la fase de mineralización, las células rodeadas de matriz mineralizada (Fig. 2-C, n°5) (antiguos osteoblastos) pasan a denominarse osteocitos. (Fig. 2-C, n°6)

Los osteocitos reciben los nutrientes a través de las prolongaciones celulares originadas por los osteoblastos, ya que la matriz mineralizada les impide cualquier tipo de intercambio por difusión. Todo el espacio existente entre las prolongaciones (canaliculo) (Fig. 2-C, n°7) y entre el osteocito y la matriz (laguna ósea) (Fig. 2-C, n°8) se rellena de líquido tisular por donde circulan los compuestos con dirección u origen en las células atrapadas en él.

No todos los osteoblastos se transforman en osteocitos, ya que algunos emigran al formarse la matriz orgánica, quedando atrapados en la superficie del hueso nuevo y formando las membranas que cubren la superficie de todos los huesos (periostio y endostio).

En la superficie ósea también se encuentra otro tipo de células denominado osteoclasto que derivan de los monocitos que emigran desde la sangre circulante a los espacios extravasculares. Estas son las células responsables de la osteoclasia o eliminación de tejido óseo.

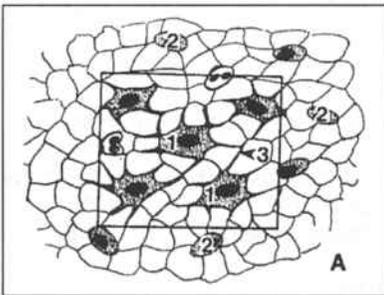


Figura 2A

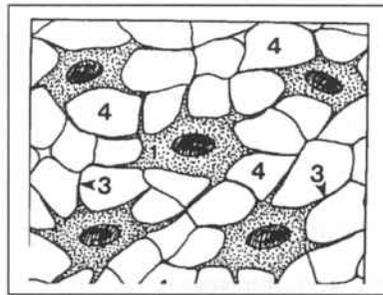


Figura 2B

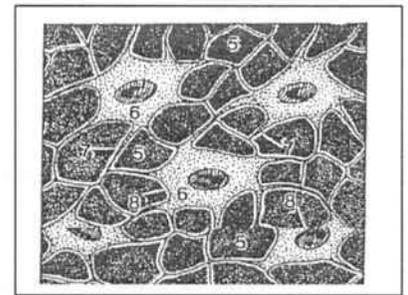


Figura 2C

### 1.2.2.2 Respuesta del tejido óseo a la inserción del implante

La preparación del lecho para el implante y su posterior colocación provocará la muerte del hueso adyacente que será menor cuanto más cuidadosa sea la técnica preparatoria. La extensión de esta zona necrótica alrededor del implante dependerá del calor de fricción generado durante la operación y el estado del hueso previo a la intervención.

El hueso puede reaccionar de tres formas como respuesta a la necrosis:

- formación de tejido fibroso
- formación de sequestro óseo
- formación de hueso nuevo de cicatrización

Albrektsson<sup>8</sup> indicó que la reparación ósea requiere la presencia de tres factores:

-Un estímulo inicial: la cicatrización ósea será iniciada por un trauma previo que puede ser una inflamación, cambios vasculares, o transformaciones bioquímicas o eléctricas. En el caso de la colocación de implantes es el traumatismo infligido al hueso durante la preparación ósea quien actuará como “estímulo” activador.

-Una célula adecuada: la reparación de la zona circundante necrótica dependerá de la acción conjunta y coordinada del osteoblasto y el osteoclasto que comportará la sustitución progresiva del tejido enfermo por hueso nuevo. También tendrán su importancia las células mesenquimatosas primitivas no diferenciadas que pueden ser estimuladas en preosteoblastos y finalmente en osteoblastos. Estas células mesenquimatosas necesitan el estímulo adecuado ya que también pueden transformarse en fibroblastos, que es lo que se pretende evitar

-Una correcta nutrición de las células: La reparación ósea sólo se inicia cuando aparece la circulación sanguínea local.

Una vez colocado el implante, entre su superficie y la pared ósea de la zona quirúrgica los osteoblastos depositan una fina capa de hueso inmaduro, de tipo trabecular, que no tiene suficiente fuerza para soportar las cargas masticatorias. Si dejamos un tiempo sin sobrecargarlo los espacios que quedan entre la capa de hueso inmaduro son rellenados por hueso maduro, de forma que casi toda el área comprendida entre el lugar quirúrgico original y el implante está rellena de tejido óseo compactado, que resiste las fuerzas de la masticación.

A la vez que tiene lugar este proceso, el hueso necrosado es eliminado por la actividad osteoclástica de la superficie que mira al implante o en la profundidad del hueso dañado. Los osteoclastos eliminan este hueso necrosado situado en profundidad mediante unas cuñas de corte que excavan en el hueso desvitalizado.

El mantenimiento de la interfase hueso-implante exige la continua remodelación del hueso por la acción coordinada de los osteoblastos y osteoclastos. Estos últimos tienden a eliminar el hueso más mineralizado que suele ser el más antiguo y vulnerable.

### 1.3. BIOMATERIALES

Con la intención de tratar diferentes lesiones o enfermedades se utilizan gran número de materiales no-vivos. Un biomaterial se define como un material sintético usado para remplazar parte de un sistema vivo o una función con contacto íntimo con el tejido vivo.<sup>9</sup>

La segunda conferencia de consenso sobre definiciones en el campo de los biomateriales celebrada en Chester (Reino Unido) en 1991 consensuó la siguiente definición de Biomaterial: Un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo.<sup>10</sup>

Los usos de los biomateriales son diversos y los encontramos en todas las especialidades médicas: Sustitución de una parte u órgano del cuerpo perdido por culpa de una enfermedad o traumatismo (implante dental), ayuda en sanar situaciones patológicas (suturas) o mejorar funciones vitales (válvulas cardíacas.)

La mejora en la confección y utilización de estos biomateriales ha representado un empujón definitivo para el éxito de los implantes dentales endoóseos.

Los biomateriales más utilizados en la confección de los implantes dentales son los metales (entre los que destaca el titanio y sus aleaciones), las cerámicas (sobre todo los recubrimientos de hidroxiapatita), y los polímeros.

#### 1.3.1 Metales

Los metales y sus aleaciones son los biomateriales más utilizados en los implantes dentales. Las características mecánicas y técnicas de estos materiales se conocen en profundidad, así las normas sobre las propiedades superficiales de los implantes quirúrgicos han sido publicadas por el Comité F-4 de la "American Society for Testing and Materials" (ASTMF-4).<sup>11</sup>

La mayoría de biomateriales metálicos son sometidos a un proceso de pasivación de su superficie como uno de los procesos de acabado<sup>7, 12</sup>. La presencia de una capa externa de óxido insoluble es la base para la resistencia a la corrosión que sufren estos materiales en los fluidos corporales<sup>13</sup>. Esta capa debe presentar la característica de regenerarse si es destruida, como sucede en la cirugía de colocación de los implantes dentales.

Los metales y aleaciones más utilizados en la fabricación de los implantes dentales son el acero inoxidable, el cobalto y sus aleaciones y, principalmente, el titanio y sus aleaciones.

### 1.3.1.1 Acero inoxidable

Las aleaciones de acero inoxidable utilizadas como implantes dentales han sido casi totalmente sustituidas por las de titanio.

La composición del acero inoxidable ha ido variando con el tiempo con la intención de mejorar sus propiedades clínicas y mecánicas. La aleación más utilizada en implantología dental es la denominada 316L (tabla 1)<sup>9</sup> ya que presenta una mayor resistencia a la corrosión que otros tipos de aceros.

La concentración de carbono en peso debe ser del máximo de 0,03% para mejorar esta resistencia a la corrosión. La inclusión del molibdeno aumenta la resistencia a la corrosión por picaduras en medio salino y necesitaremos una concentración mínima del 11% en peso de cromo para que se forme la capa de óxido protectora. El níquel sirve para estabilizar la fase austenítica a temperatura ambiente, factor que también evita la pronta corrosión del metal.

Las propiedades mecánicas del acero inoxidable para usos quirúrgicos son excelentes.

	Carbono	Manganeso	Fósforo	Sulfuro	Silicio	Cromo	Níquel	Molibdeno
Grado1	0,08 max	2,00 max	0,03 max	0,03 max	0,75 max	17-20	12-14	2-4
Grado2	0,03 max	2,00 max	0,03 max	0,03 max	0,75 max	17-20	12-14	2-4

Tabla 1. Composición ( en % en peso) del Acero Inoxidable 316, 316L(ASTM Standers)

### 1.3.1.2 Aleaciones de cobalto

Las aleaciones coladas de cobalto suelen utilizarse, entre otros, en la confección de diseños dentales individualizados.

La ASTM lista cuatro tipos diferentes de aleaciones de cobalto recomendadas para la confección de implantes quirúrgicos<sup>11</sup>: CoCrMo F76 (colado), CoCrWNi F90 (forjado), CoNiCrMo F562 (forjado) y CoNiCrMoWFe F563 (forjado). Sus composiciones químicas son bastante diferentes.

La aleación colada de CoCrMo se ha estado utilizando desde hace décadas en odontología. La aleación forjada de CoNiCrMo se ha utilizado para prótesis en articulaciones que deben aguantar gran cantidad de peso como la rodilla y la cadera.

La aleación de cobalto colada es bastante inerte, una vez pasivada, y la superficie de óxido de cromo reduce significativamente los fenómenos de corrosión. Si se necesita una mayor resistencia se opta por las aleaciones forjadas mecánicamente. La mayor resistencia a la fatiga y a la tracción de la aleación de CoNiCrMo la hace más indicada en aquellos casos que necesitemos soportar cargas a largo plazo.

### 1.3.1.3 Titanio – Aleaciones de titanio

El titanio y sus aleaciones son los metales actualmente de elección en la mayoría de los implantes dentales osteointegrados, debido a su excelente biocompatibilidad<sup>14</sup>, resistencia a la corrosión y a sus buenas propiedades mecánicas y físicas<sup>15</sup>.

Existen cuatro tipos de titanio sin aleación con aplicaciones implantológicas que se diferencian por su contenido en impurezas (tabla 2)<sup>9</sup>: las proporciones de oxígeno, hierro y nitrógeno deben ser controladas cuidadosamente. El oxígeno, por ejemplo, tiene gran influencia en la ductilidad y la resistencia. La aleación de titanio de preferencia en la confección de los implantes dentales es el Ti6Al4V y su composición en peso viene determinada en la tabla 2.

El titanio puro es un material alotrópico que presenta una estructura cristalina hexagonal completa (alfa-Ti) hasta los 882°C momento en que sufre una transformación pasando a una estructura cúbica centrada en el cuerpo (beta-Ti) hasta su fusión a 1672°C.

El aluminio en las aleaciones de titanio tiende a estabilizar la fase alfa-Ti al aumentar la temperatura de transformación a la fase beta, permitiendo que el material trabaje a alta temperatura. El vanadio, por el contrario, estabiliza la fase beta disminuyendo la temperatura de transformación de alfa a beta. Las aleaciones que presentan en su composición el aluminio y el vanadio (Ti6Al4V) presentan a temperatura ambiente una mezcla de ambas fases (alfa-Ti y beta-Ti).

Las aleaciones alfa-Ti presentan una microestructura cristalina en monofase que le ofrece una buena capacidad de unión. Al añadir cantidades controladas de sustancias estabilizadoras de la fase beta (vanadio...) permite que la fase beta-Ti persista por debajo de la temperatura de transformación y tiene como resultado la formación de un sistema de dos fases. Los precipitados de la fase beta aparecerán por tratamiento a altas temperaturas en la fase sólida y el subsiguiente templeado del metal.

	Grado 1	Grado 2	Grado3	Grado 4	Ti6Al4V
N	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05
C	0,10	0,10	0,10	0,10	0,08
H	0,015	0,015	0,015	0,015	0,0125
Fe	0,20	0,30	0,30	0,50	0,25
O	0,18	0,25	0,35	0,40	0,13
Ti	Balance	Balance	Balance	Balance	Balance
Al					6 (5,5-6,5)
V					4(3,5-4,5)
Otros					0,1-0,4%

Tabla2. Composición química del titanio y sus aleaciones

Las propiedades mecánicas de los diferentes grados de Ti se muestran en la tabla 3<sup>o</sup>.

Grado	Resistencia máxima (MPa)	Límite elástico 0.2% (MPa)	Alargamiento (%)	Reducción de área (%)
1	240	170	24	30
2	345	275	20	30
3	450	380	18	30
4	550	483	15	25

Tabla 3. Propiedades mecánicas del titanio dependiendo de su Grado

Debido a que el efecto de diversos iones metálicos sobre los tejidos vivos podría dividirse en tóxico (cobalto, níquel, cobre y vanadio), deficiente (aluminio, hierro, molibdeno, plata, oro, acero inoxidable y aleaciones de cobalto), y de excelente biocompatibilidad (circonio, titanio,

neobidio, tantalio, paladio y platino); y con la finalidad de mejorar el crecimiento de osteoblastos y fibroblastos, y disminuir la adhesión bacteriana sobre los implantes metálicos se han desarrollado nuevas aleaciones de titanio libres de vanadio y aluminio con fines implantológicos: Ti-15Zr-4Nb-4Ta-0,2Pd-0,2O-0,05N, Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0,2Pd-0,2O-0,05N<sup>16</sup>. Estas aleaciones presentan una alta resistencia a la corrosión en soluciones salinas fisiológicas. La adición del 0,02% de O y el 0,05% de N mejora sus propiedades mecánicas a temperatura ambiente.

La razón principal de la expansión y incremento en la utilización del titanio como material implantológico es su excelente comportamiento anticorrosivo y su biocompatibilidad, sobretodo si se compara con otras aleaciones usadas en odontología<sup>17, 18, 19</sup> (Co-Cr-Mo, Ni, aceros inoxidable...).

Las propiedades físicas y químicas de la superficie de los biomateriales determinan sus interacciones con el entorno con el que están en contacto. Esto se hace muy patente en el titanio, en el que se forma una capa espontánea de óxido que lo recubre y que impide su corrosión y mejora su biocompatibilidad.

En condiciones ambientales la superficie del titanio está siempre cubierta por una capa amorfa o de baja cristalización de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) de unos 20nm de grosor, con un grado de disolución de unos 0,043 nm/día al pH fisiológico de 7,4<sup>12</sup>, valor que no representa ningún problema médico. El óxido de Ti que forma esta capa tiene, antes de su inmersión o colocación en algún medio, una composición casi ideal, de fórmula TiO<sub>2</sub> cubierta por dos tipos de grupos hidroxilos: OHs ácidos unidos por enlace doble al Ti, y grupos Ti-OH básicos unidos por enlace simple.

Este es un compuesto termodinámicamente muy estable evitando en gran medida el intercambio de electrones con el medio y, por consiguiente, la aparición de un flujo de iones hacia los tejidos. Este efecto aislante puede explicarse por su constante dieléctrica superior a la del agua. No obstante siempre existe una pequeña disolución de iones Ti en el medio y una significativa absorción de iones fosfato (Ti-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Ti-HPO<sub>4</sub>)<sup>20, 21</sup>. Por otra parte, se ha observado una formación preferencial de fosfato de calcio sobre la superficie del titanio al ser sumergido en un biolíquido artificial<sup>22, 23</sup>.

La capa superficial de óxido de titanio, que puede ser destruida o alterada durante la inserción de los implantes por abrasión con el hueso u otros materiales, sufre un proceso de repasivación que le permite regenerarse espontáneamente<sup>12</sup>. Esto hace que el titanio mantenga intactas todas sus características de oseointegración y de baja corrosión una vez terminada la

cirugía implantológica. Un estudio de Klaubert<sup>24</sup> sobre seis sistemas comerciales de implantes de titanio indica que todos ellos presentan un grosor similar en la capa de óxido de Ti con un rango entre 20 y 34 Å.

La pasividad de esta capa de óxido sobre las aleaciones de titanio puede mejorarse con un tratamiento térmico de calor, lográndose una disminución de la liberación de iones de titanio, aluminio y vanadio al medio oral<sup>25,26</sup>.

Además de las características químicas de la superficie del metal, hay que considerar sus características físicas.

Diversos autores han observado que una superficie de contacto con el hueso más rugosa y con una capa de óxido más gruesa presenta condiciones favorables a la integración durante las primeras semanas después de su implantación<sup>27, 28, 29, 30</sup>, logrando un aumento de la actividad celular de los osteoblastos sobre la superficie del titanio<sup>31, 32, 33, 34</sup>.

La formación de una capa macroporosa de titanio sobre un implante induciría a la formación uniforme de apatita ósea después de su implantación. El hueso que se formaría alrededor podría crecer ocupando los poros hasta el fondo de los espacios huecos, uniendo los implantes mecánicamente al hueso<sup>35</sup>. Esta capa macroporosa podría formarse por proyección de plasma de titanio.

Los resultados obtenidos por Peltola<sup>36</sup> indican que la estructura nanométrica de la superficie del óxido de titanio es de mayor importancia en la bioactividad, provocando incluso cambios en las propiedades químicas superficiales del sustrato (grupos reactivos, densidad de carga...). Una distribución de los picos de entre 15 y 50 nm en la microrugosidad superficial parece favorecer esta bioactividad.

Para mejorar la topografía de superficie se han utilizado diversos sistemas, como el chorreado con diferentes sustancias ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ), que consiguen aumentar su rugosidad y mejorar la unión y la actividad celular del tejido óseo con el implante<sup>37, 38</sup>; o diferentes tratamientos químicos en soluciones alcalinas que aceleren y refuercen la unión hueso-titanio<sup>39,40</sup>.

Por el contrario, una superficie del titanio lisa (electropulida) o suavemente gravada favorece la unión y el crecimiento de los fibroblastos gingivales<sup>41</sup> importante para la formación del sellado biológico.

La popularidad del titanio como implante dental y ortopédico es el resultado de las características que aquí se han expuesto: buenas propiedades mecánicas, gran biocompatibilidad

gracias a la capa de óxido superficial que se forma por pasivación, y facilidad en su fabricación<sup>42</sup>. No obstante el titanio, ni ningún otro metal, se enlazan químicamente al hueso<sup>43,44</sup>.

### 1.3.2 Cerámicas

Las cerámicas se utilizan en odontología desde hace algunas décadas para la realización de coronas dentales debido a que son materiales inertes a los fluidos orales, tienen una buena resistencia a las fuerzas de compresión y presentan una excelente estética.

Químicamente, las cerámicas son componentes policristalinos, normalmente inorgánicos, que incluyen los silicatos, óxidos metálicos y varios híbridos refractarios, sulfatos y selénidos.

Entre las cerámicas utilizadas para la confección de implantes dentales se hayan el óxido de aluminio (alumina y zafiro), el carbón y los compuestos de carbón-silicona, los fosfatos cálcicos y las vitro-cerámicas.

Los materiales cerámicos son materiales inorgánicos, constituidos por elementos metálicos y no metálicos unidos mediante enlaces iónicos y/o covalentes. Las composiciones químicas de los materiales cerámicos varían considerablemente, desde compuestos sencillos a mezclas de muchas fases complejas enlazadas entre sí<sup>45</sup>.

Al contrario que los metales y los polímeros, las cerámicas son difíciles de deformar plásticamente debido a los enlaces de sus componentes. En general, estos materiales son típicamente duros y frágiles con baja tenacidad y ductilidad, y se comportan como buenos aislantes eléctricos y térmicos debido a la ausencia de electrones conductores; normalmente poseen temperaturas de fusión relativamente altas.

Los materiales cerámicos presentan una baja resistencia a la tracción lo que provoca que sean estructuras muy sensibles a las microfisuras, ya que en lugar de sufrir deformaciones plásticas, se fracturan elásticamente una vez que la fisura se propaga.

#### 1.3.2.1 Óxidos de aluminio

La ASTM especifica que el porcentaje de óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (alumina) puro debe ser del 99,5% y menos del 0,1% de  $\text{SiO}_2$  para la utilización de este tipo de materiales para uso dental<sup>9</sup>.

La alumina presenta una gran dureza como principal propiedad mecánica (valor 9 en la escala de Moh)

### 1.3.2.2 Fosfatos de calcio

Los fosfatos de calcio bioactivos han aportado a la industria de los tejidos duros dentales y ortopédicos diversos productos que han logrado mejoras evidentes en medicina y odontología; todo ello gracias a su parecido químico al mineral óseo.

Los fosfatos de calcio pueden encontrarse cristalizados en sales, hidroxiapatita y beta-whitloquita dependiendo de la proporción Ca/P, presencia de agua y de impurezas, y de su temperatura<sup>9</sup>. En un medio húmedo y a baja temperatura (<900°C), es más fácil encontrarlos en forma de hidroxiapatita, mientras que en medio húmedo y a altas temperaturas es más fácil que se encuentre la forma beta-whitloquita.

La hidroxiapatita (HA) es el componente mineral inorgánico principal del hueso y diente, característica que provocó que la mayoría de estudios escogieran este material como favorable a ser aceptado por el organismo, en detrimento de otros fosfatos cálcicos (fosfato tricálcico, whitloquita..)<sup>46</sup>

La HA, de composición química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , presenta una estructura cristalina en prismas rómbicos hexagonales, una proporción Ca/P de 1,67, idéntica al mineral óseo, y una densidad de 3,219 gr/cm<sup>3</sup>. La sustitución de los grupos OH por iones F provocará la formación de una estructura química más estable debido a la coordinación más cercana de los iones F con los iones Ca. Esta es la razón por la que los dientes correctamente fluorados presentan una mayor resistencia a la caries. La HA en el hueso humano está carbonatada parcialmente (5%), y contiene otros iones como el  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{F}^-$ .

Propiedades mecánicas de la HA (tabla 4)<sup>9</sup> son la fragilidad y baja resistencia al impacto y a la tracción<sup>47</sup>, por lo que debe ser utilizada en situaciones sin carga<sup>48</sup>. Por el contrario, presenta unas características de biocompatibilidad muy superiores a otros materiales. La resistencia a la flexión es considerablemente menor que la resistencia a la compresión, y ambas disminuyen

considerablemente cuando aumenta su porosidad. Su resistencia a fatiga se considera particularmente débil.

Propiedades	Valor
Módulo elástico (Gpa)	40-117
Resistencia a la compresión (MPa)	294
Resistencia a la flexión (Mpa)	147
Dureza (Gpa)	3,43
Relación de Poisson	0,27
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	3,16

Tabla 4. Propiedades físicas del fosfato de calcio (HA)

La HA presenta una ausencia de toxicidad sistémica y local con los tejidos con los que entra en contacto, sin provocar ningún tipo de respuesta inflamatoria que lleve al rechazo.

La ventaja principal de la HA es su capacidad para unirse químicamente al hueso cuando se utiliza como implante, característica que no se ha encontrado en ninguna otra sustancia<sup>49</sup>, actuando como un entramado que favorece la deposición de hueso nuevo a su alrededor, quedando integrada en su interior<sup>50,51,52</sup>.

La HA no es ni osteogénica (formación de tejido mineralizado por osteoblastos), ni osteoinductiva (conversión de células de tejido blando en células de tejido óseo). La HA es osteofílica y osteoconductiva, formando un entramado para el crecimiento y la deposición de nuevo hueso<sup>49</sup>.

Debido a sus deficientes características mecánicas, la HA no se utiliza como material único para la confección de implantes, sino como fino recubrimiento sobre un sustrato metálico, habitualmente de titanio, que sí que presenta las características mecánicas necesarias para soportar cargas.

Los implantes recubiertos de HA presentan una adaptación ósea más rápida que los implantes de titanio que no tienen esta capa, logrando una reducción del tiempo de osteointegración y una unión mas fuerte entre el implante y el hueso<sup>53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60</sup>. Su

utilización también mejora las condiciones de biocompatibilidad, disminuyendo la liberación de iones metálicos subyacentes.

Meffert<sup>61, 62</sup> indicó que los implantes recubiertos de HA estarían indicados cuando sean necesarios implantes cortos (de 10 mm de longitud o menos), y en pacientes con hueso esponjoso de baja calidad (tipo 4), lechos óseos donde se ha producido una extracción reciente, o cuando es necesario el levantamiento de senos maxilares o nasales.

A pesar de estas aparentes ventajas, diversos autores<sup>46, 63, 64, 65, 66</sup> indican que para el recubrimiento de HA sea útil, debe presentar unas características estructurales de alta cristalinidad, sin la presencia de fases amorfas u otros materiales de fosfatos cálcicos, que puedan provocar su pronta degradación. Gross<sup>67</sup> demostró "in vitro" que bajo condiciones que simulaban estados de infección bacteriológica, caracterizadas por una disminución del pH, las fases amorfas de fosfatos de calcio se diluían con más facilidad que las correctamente cristalinas.

Las pruebas mecánicas demuestran que los implantes recubiertos de HA presentan una mayor resistencia a las fuerzas de cizalla, dureza y una mayor fuerza de unión al hueso que los implantes de titanio puros comercialmente (Ti c.p.).<sup>68, 69, 70</sup> Además, histológicamente, el tejido óseo mineraliza directamente sobre la superficie del fosfato cálcico sin la interposición de ninguna capa de tipo fibroso.<sup>71, 72, 73</sup>

Kuriola<sup>74</sup> examinó como diversas propiedades físicas de la HA influían en su comportamiento implantológico, indicando que granos de un tamaño entre 30 y 200 micras de diámetro mostraban tanto una buena conducción como una buena estabilidad.

Los implantes recubiertos con fosfatos tricálcicos también presentan una gran biocompatibilidad y favorecen el proceso de mineralización ósea, pero sus peores características mecánicas y histológicas en la interfase hueso-implante respecto la HA,<sup>75</sup> y el ser considerados materiales potencialmente reabsorbibles, provocó que fueran cayendo en desuso a favor de la HA.

Se pensó que los materiales de fosfato de calcio iban a ser la solución a los problemas de osteointegración. Sin embargo, numerosos estudios<sup>69, 76, 77</sup> observaron a largo plazo fracasos clínicos por la disolución intraósea de la capa de revestimiento dejando un titanio al descubierto, con una superficie contaminada que favorece la colonización bacteriana y la pérdida del hueso

periimplantario. El análisis de los restos de HA demostró que el calcio y el fósforo habían casi desaparecido encontrando en su lugar carbono, nitrógeno, sodio y azufre.<sup>78</sup>

#### Métodos de formación de la capa de HA:

A lo largo de la historia se han descrito numerosos sistemas para la confección de una capa de HA perfectamente cristalizada sobre un sustrato metálico; hecho que demuestra la controversia que existe sobre la conveniencia o no de utilizar este tipo de implantes.

Entre los diferentes métodos de recubrimiento que se han utilizado hasta la actualidad podríamos indicar los siguientes:<sup>79</sup>

- Revestimiento por baño del implante
- Inmersión en disoluciones acuosas
- Por presión isostática<sup>80</sup>
- Deposición electroforética<sup>81, 82</sup>
- Chisporroteado por magnetrón de radiofrecuencia
- Sistema de proyección de plasma (plasma-spray)
- Deposición electroquímica<sup>83</sup>
- Ablación por láser<sup>84, 85</sup>

#### Sistema de proyección de plasma:

El sistema de proyección de plasma de HA sobre un sustrato de titanio (plasma-spray) es el más popular y el único que se utiliza en la actualidad con fines comerciales.

Este método se basa en la fusión a alta temperatura de la cerámica de HA en partículas que son proyectadas sobre un sustrato metálico, normalmente de titanio, sobre cuya superficie se enfrían fijándose y confeccionando el recubrimiento por adición de múltiples capas hasta conseguir un grosor de unas 50 a 75 micrómetros.<sup>86</sup>

La HA que se forma será parcialmente amorfa y no se adhiere químicamente al sustrato.<sup>87</sup> Sus características dependerán de diversos factores a tener en cuenta, como son la naturaleza y el tamaño de las partículas de HA,<sup>48, 88</sup> variaciones en la temperatura del plasma,<sup>49</sup> naturaleza del sustrato y controles de la calidad del propio método. Wang<sup>89</sup> indica que al aplicar tratamientos

térmicos en el intervalo de 850 a 1000 °C aparecen numerosas impurezas y la cristalinidad de la HA disminuye considerablemente.

Yang<sup>66</sup> afirma que las características mecánicas de estos recubrimientos de HA están condicionadas por numerosos factores: su grosor, microestructura, rugosidad y tipo de metal del sustrato, propiedades de viscosidad y fuerza del adhesivo utilizado, y otras características propias del recubrimiento, como su cristalinidad y la presencia de impurezas.

Según Ding<sup>90</sup>, los recubrimientos obtenidos por proyección de plasma presentan una apatita menos cristalina que sus productos originales, de manera que el propio proceso de formación provoca la descomposición de la apatita y diferentes reacciones químicas entre sus fases.

Gross<sup>91, 92</sup> demostró que los diferentes parámetros que podemos controlar en el proceso de la proyección de plasma de HA pueden variar la cristalinidad de la HA: la excesiva deshidratación de la partícula emitida durante la proyección, el grado de enfriamiento al entrar en contacto con el sustrato y la temperatura de este sustrato pueden favorecer la aparición de fases amorfas que se encuentran en mayor proporción en la interfase metal-HA. El control de este proceso debe evitar la pérdida de los grupos hidroxilos y fosfatos para aumentar el grado de HA cristalizado.

Si la popularidad de este tipo de implantes se basa en la capacidad de unión entre la capa de HA y el hueso, el éxito de estos tratamientos puede comprometerse por una deficiente unión entre la capa de fosfato de calcio y el sustrato metálico. La interfase metal-cerámica es una parte esencial en este sistema de implantes, representando el punto más débil del método.<sup>47, 93</sup>

Existen muchos estudios que corroboran el fracaso de la unión metal-capas de hidroxiapatita<sup>51,63,55,77,94,95,96,97,98,99,100</sup>, mientras que otros resuelven a favor de la estabilidad de esta interfase.

La fuerza de unión entre la HA y el sustrato metálico debe soportar las tensiones que recibirá durante la colocación del implante en el hueso, de manera que no se desprenda la capa de fosfato de calcio.

Con la utilización del sistema de proyección de plasma, la capa de HA resultante no presentará una estructura suficientemente densa y cristalina,<sup>101</sup> y un grosor uniforme para resistir las fuerzas de carga a las que será sometida en el medio oral.<sup>51</sup> También pueden aparecer microfracturas internas a la capa de fosfato de calcio.<sup>100</sup> Tufcecki<sup>102</sup> y Ashroff<sup>103</sup> indicaron que el

porcentaje de cristalinidad de la capa bioactiva varía entre un 49 y un 60 % apareciendo fases de alfa- y beta-fosfato tricálcico y fosfato tetracálcico que interfieren negativamente en su estabilidad. (Figuras 3 y 4)

Filiaggi y col<sup>97</sup> evaluaron la interfase titanio-HA de los implantes dentales demostrando que presentaba valores muy bajos de resistencia a la tracción debida a la ausencia de una unión química entre ambas superficies. Mann y col<sup>104</sup> indicaron que las zonas de la interfase Ti-HA que soportan cargas compresivas o de cizalla tienen menos posibilidades de desenlazarse que aquellas zonas que sufren fuerzas de tensión.

La falta de iones  $O^{2-}$  y  $OH^-$  próximos a la interfase con el titanio indica la existencia de fases diferentes a la HA (fosfato tricálcico y hidroxiapatita), que pueden resultar en una excesiva reabsorción del recubrimiento.<sup>105</sup> La localización de estas fases estaría relacionada con los cambios bruscos de temperatura que sufren las partículas de hidroxiapatita a altas temperaturas cuando impactan sobre el metal a temperatura ambiente. La dinámica del proceso, por el impacto a velocidades altísimas (aprox. 200 m/s) y la rápida solidificación de la capa podrían también generar una fuerza extra que provocase estas transformaciones.

Otros autores<sup>63, 94, 106</sup> indicaron que la unión química entre el hueso y la HA presentaba una mayor resistencia que la interfase, de naturaleza únicamente mecánica, entre el sustrato metálico y la HA.

MacDonald<sup>107</sup> realizó un estudio sobre los cambios físicos y químicos ocurridos en implantes fracasados recubiertos con HA por el método de proyección de plasma. Sus resultados indicaron que estos implantes habían sufrido una progresiva disminución del grosor de la capa apatítica con la aparición de zonas de titanio al descubierto provocando la pérdida de inserción del mismo. Esto sucede por la disolución de las fases no-apatíticas del recubrimiento (fosfato de calcio amorfo, fosfato beta-tricálcico, fosfato tetracálcico y óxido de calcio) ya presentes antes de su implantación.

Baltag<sup>108</sup> también compara implantes recubiertos de apatita antes de utilizar y una vez fracasados, indicando que estos últimos presentan la pérdida parcial del recubrimiento, especialmente en su parte apical y en las caras proximales, aumentando gradualmente su rugosidad. La HA remanente se hace más delgada y lisa en las zonas centrales y cervicales. Químicamente se observa un aumento de los iones Cl y Mg acompañado de una disminución de los grupos  $OH^-$  que provocan cambios importantes en la composición y cristalinidad de la capa. Los cambios morfológicos en los implantes fracasados parecen estar relacionados con la carga soportada por el hueso en contacto y su movilidad.

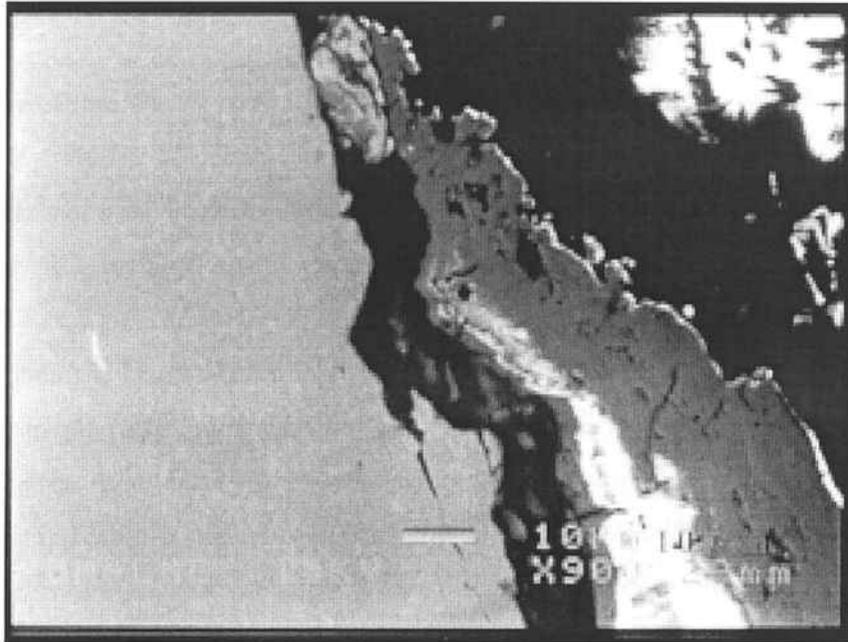


Imagen 3. Corte de la interfase Ti-HA de un implante en su parte más coronal vista por microscopio electrónico de barrido, cortesía del Dept. Ciencia dels Materials de la UPC. Se observa la presencia de poros entre las dos superficies, diferentes grosores de la capa de fosfato cálcico, poros internos y líneas de fractura.

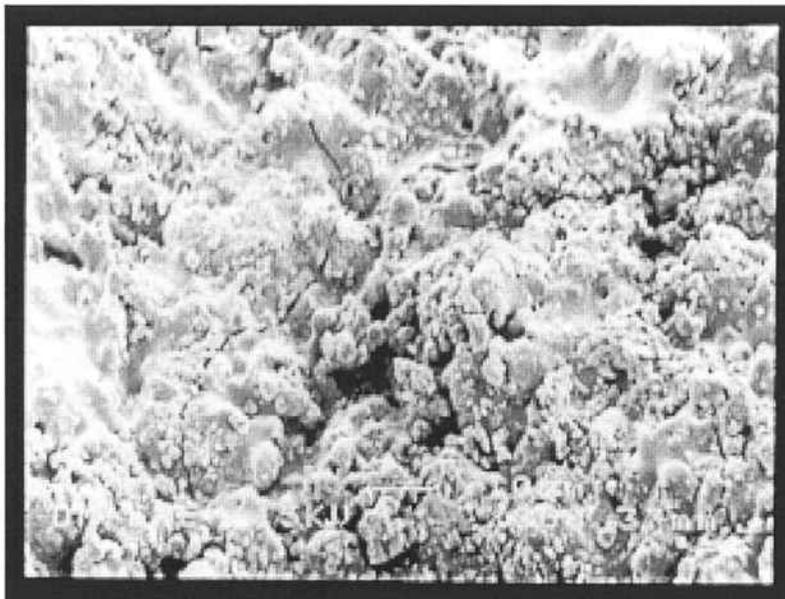


Imagen 4. Imagen de la capa de HA vista por microscopio electrónico de barrido cortesía del Dept. de Ciències dels Materials de la UPC. Se observa una cristalinidad amorfa de la HA, con la presencia de microfracturas internas.

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de la capa de fosfato de calcio, se han realizado algunas variaciones en este sistema de proyección de plasma, como mezclar titanio en polvo a la apatita, previo a su proyección en forma de plasma sobre el sustrato metálico, aumentándose así la fuerza de unión de la capa resultante, sin afectar significativamente la bioactividad de la misma.<sup>109</sup>

Otros sistemas para la elaboración de superficies de fosfatos de calcio sobre implantes:

A pesar de que, actualmente, el sistema por proyección de plasma de HA sobre un sustrato metálico es el único método que se utiliza comercialmente en la confección de implantes con una capa superficial bioactiva, se han realizado intentos varios de desarrollar otras técnicas que mejoren las propiedades químicas y mecánicas de este tipo de implantes.

El sistema de recubrimiento por chisporroteado por radio-frecuencias se basa en el bombardeo con átomos de argón a alta velocidad sobre un blanco de HA de manera que se desprenden diminutas partículas que se dirigen sobre un sustrato metálico formándose una fina capa libre de porosidades.

Diversos autores<sup>60, 79, 110, 111</sup> evaluaron esta técnica comprobando que el recubrimiento resultante presentaba una mayor adhesión sobre el sustrato en comparación con otros métodos, porque las partículas de HA impactaban contra el metal con suficiente energía para penetrar en su superficie sin alterar sus propiedades mecánicas. La capa de fosfato de calcio resultante con este método presentaba unas características de densidad y uniformidad que le hacía idónea para recubrir superficies de topografía irregular. Por el contrario, la cerámica resultante presentaba formas amorfas con una baja cristalización.

La ablación por láser permite obtener capas apatíticas con una proporción de iones Ca/P idónea, no obstante las altas temperaturas a que sometemos al sustrato provocan la aparición de fases de baja cristalinidad que pueden comprometer los resultados clínicos a largo plazo<sup>84</sup>.

Con el sistema de formación de HA por presión isostática conseguimos recubrimientos densos y de menor porosidad que los obtenidos por plasma-spray, a temperaturas de 700 a 850°C y a un máximo de 1000 bar de presión. Por otro lado, se han observado la presencia de grietas

verticales, debidas, posiblemente, a las diferencias en el módulo elástico y en el coeficiente de expansión térmico entre el Ti y la HA.<sup>80</sup>

En la actualidad, y con la intención de superar los problemas que han situado en tela de juicio a los implantes recubiertos con HA, se elaboran sistemas basados en la inmersión del sustrato metálico, habitualmente titanio, en disoluciones acuosas que permitan la formación de la biocapa por métodos químicos.<sup>40,43,112,113,114,115,116</sup> Con esto se pretende mejorar las características propias de la interfase titanio-HA, de manera que se consiga una superficie de recubrimiento unida químicamente al metal<sup>40, 117</sup>, y con el grosor, uniformidad y cristalinidad idóneas para impedir su desprendimiento o degradación a largo plazo.<sup>118</sup>

Las disoluciones utilizadas en estos estudios simulan fluidos fisiológicos y se pretende intervenir sobre las diferentes variables del procedimiento (tipo de disolución utilizada<sup>119,120,121,122,123,124,125</sup>, componentes de la disolución de inmersión<sup>126,127,128</sup>, termodinámica del sistema<sup>129</sup>, temperatura del tratamiento térmico<sup>130,131</sup>, pH<sup>132</sup>, morfología superficial del sustrato<sup>133</sup>...) con el fin de obtener una capa con las características mecánicas y bioquímicas idóneas.

La elaboración de capas de fosfato de calcio con diferentes cristalinidades por vía química y a baja temperatura no sólo es factible sobre un sustrato de titanio, sino que es posible su realización sobre otras superficies sólidas como matrices de tejidos orgánicos, vitro-cerámicas o polímeros orgánicos<sup>134</sup>.

#### Susceptibilidad a la colonización bacteriana de las superficies de HA:

La introducción de los biomateriales en la cavidad oral plantea interrogantes sobre el comportamiento bacteriano que entra en contacto sobre sus superficies, ya que la acumulación de placa bacteriana sobre los dientes naturales también ocurre sobre las diferentes estructuras implantológicas que se encuentran en contacto con el medio oral, siendo éste un factor importantísimo en el éxito de nuestros actos clínicos.

Las bacterias patógenas periodontales que se fijan en los dientes también lo hacen sobre los diferentes materiales que forman los implantes provocando la formación de la placa bacteriana. Los fenómenos físico-químicos subyacentes incluyen interacciones electroestáticas,

interacciones químicas específicas entre grupos funcionales de la película adquirida y de la superficie sólida del biomaterial, y interacciones laterales entre las moléculas o los cuerpos que se fijan en la superficie de la placa.<sup>135</sup>

La topografía y microestructura de la superficie del biomaterial influyen fuertemente sobre la capacidad de las células tisulares para orientarse, migrar y producir arreglos organizados.<sup>136</sup>

Para diversos autores<sup>96,98,137,138</sup>, la superficie rugosa propia de las HA favorece la retención de placa aumentando la colonización de anaerobios Gram negativos y otros patógenos periodontales que pueden predisponer a la periimplantitis. Ong<sup>139</sup> indica que se debe tener en consideración la mayor susceptibilidad de la HA a sufrir colonizaciones bacterianas que los implantes de titanio, factor que puede predisponer al fracaso clínico.

### 1.3.2.3 Vitro-cerámica

Las cerámicas compuestas por vidrios de sílice (Bioglass y Ceravital) se han estudiado como material de adhesión directa al hueso. Actualmente sus prestaciones como implantes dentales están muy limitadas.

La formación de las vitro-cerámicas ocurre por la nuclearización y crecimiento de pequeños cristales de menos de 1 micra de diámetro<sup>9</sup>, a una temperatura muy inferior a la temperatura de fusión. La cristalización se obtiene en más del 90% con granos de 0,1 a 1 micra de tamaño, medida muy inferior al resto de cerámicas convencionales.

Las vitro-cerámicas desarrolladas para la implantación presentan los siguientes compuestos:  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  y  $\text{Li}_2\text{O-ZnO-SiO}_2$ .

La bioactividad de estas vitro-cerámicas se atribuye a la formación in vivo de apatita sobre su superficie.<sup>140,141</sup>

Su adhesión al hueso está relacionada con la formación de simultánea de una capa de fosfato de calcio y  $\text{SiO}_2$  en su superficie. Si el porcentaje de  $\text{SiO}_2$  en la cerámica está entre el 46 y el 55 %, la capa de fosfato de calcio se formará con posterioridad, o no llegará a formarse (concentración de  $\text{SiO}_2$  superior al 60%); en ambos casos no se producirá la deseable unión directa con el hueso. Otros estudios<sup>142, 143, 144</sup> también demuestran la formación de una capa de fases de apatita en la superficie de la capa de vitro-cerámica cuando son tratadas químicamente

por inmersión en una disolución iónica que simula el plasma sanguíneo humano (SBF). La condición esencial para que las vitro-cerámicas se unan al hueso es la formación in vivo de esta capa de fosfato de calcio, aunque no hace falta que la apatita forme parte del material original<sup>145</sup>.

La capa de SiO<sub>2</sub> se une firmemente al titanio, impidiendo la liberación de iones del metal al medio bucal y disminuyendo la acumulación de placa bacteriana.<sup>146, 147, 148, 149</sup>

Las vitro-cerámicas presentan un coeficiente de expansión térmica muy bajo y una resistencia a la abrasión parecida al zafiro. La resistencia a la tracción puede mejorarse controlando el tamaño del cristal. Su principal inconveniente es que se trata de un material muy quebradizo.

Con el fin de mejorar la osteointegración de estas vitro-cerámicas podemos recubrirlas con una capa apatítica siguiendo un procedimiento químico, por inmersión en soluciones que simulen el plasma humano, similar al utilizado para el Ti<sup>150</sup>.

Los grupos Si-OH son efectivos en la nuclearización de la apatita de una forma indirecta, a través de la formación de sus componentes cálcicos y su posterior formación de fosfato cálcico amorfo, de proporción Ca/P baja.

#### 1.3.2.4 Carbonos

Los compuestos de carbono y carbono-silicona son inertes pudiéndose fabricar materiales con propiedades elásticas muy similares a las del hueso. Por el contrario, su fragilidad y su conductibilidad eléctrica y térmica son sus principales desventajas.<sup>7</sup>

En teoría, el carbono podría ser un material ideal para el recubrimiento de implantes metálicos, pero cuando entra en contacto con el acero inoxidable en un ambiente salino puede provocar una degradación electrolytica del metal.

### 1.3.3 Materiales poliméricos

La palabra polímero significa etimológicamente “muchas partes”. Por material polimérico se considera aquel que contiene muchas unidades enlazadas químicamente, normalmente por un enlace covalente.

Los polímeros no se han utilizado mucho como componente principal de los implantes dentales debido a su resistencia relativamente baja y a su gran ductilidad, limitándose su aplicación a recubrimientos de superficie y a pilares de fijación.

## **1.4 INTERACCIONES DE LA INTERFASE BIOMATERIAL-HUESO Y OSTEOINTEGRACIÓN**

Los biomateriales se pueden diferenciar según el tipo de interfase ósea que provocan al ser implantados.

Los metales y sus aleaciones no ofrecen una fuerza de adhesión a los tejidos blandos periodontales. Se han descrito algunas interacciones superficiales que recomiendan el electropulido de la superficie<sup>41</sup> para mejorar la formación de los tejidos adyacentes.

En cuanto a la interfase ósea, las aleaciones de acero inoxidable (316L) se asocian a la formación de un tejido fibroso, mientras que el titanio se une directamente al hueso sin la presencia de adhesión química.<sup>43, 44, 95, 151</sup>

Una superficie lisa de las cerámicas, entre ellas la hidroxiapatita, también favorece la adaptación de los tejidos periodontales periimplantarios, a la vez que impide la acumulación de placa dental.

Los materiales cerámicos de fosfatos de calcio (fosfato tricálcico y HA) son los únicos materiales que se han demostrado que tienen capacidad de unirse químicamente al hueso.

Los polímeros se consideran como materiales capaces de estabilizar la interfase tejido blando-interfase,<sup>7</sup> pero que no se unen químicamente a las estructuras óseas.

Se puede decir que los materiales implantológicos con superficie rugosa en contacto con las estructuras periodontales dificultan la higiene necesaria para la formación del sellado biológico y el éxito del tratamiento.

Según Weinlaender<sup>152</sup> existen cuatro tipos diferentes de interfases entre el hueso y el implante dependiendo del material utilizado en cada caso:

Los materiales biotolerados, como las aleaciones de cobalto, polimetilmetacrilato y el acero, originarán una osteogénesis “a distancia”, pudiendo provocar una fibrointegración.

Los materiales bioinertes (óxido de aluminio y carbonatos) originarán una osteogénesis “de contacto”, en la que la interfase hueso-implante será mínima, sin unión química y con capacidad de carga.

El titanio y el tantalio son materiales bioadhesivos para el hueso provocando una osteogénesis “de adhesión”, con uniones químicas y capacidad de carga.

Los materiales bioactivos, como las cerámicas de hidroxapatita, inducirán a la osteogénesis “de intercambio”, con una interfase mediada por uniones químicas y un intercambio iónico entre el hueso y el material.

### **1.4.1 Osteointegración**

El éxito de los tratamientos implantológicos dependerá del grado de interacción entre el hueso vivo y la superficie externa del implante.

La osteointegración fue definida por Branemark en 1977<sup>153</sup> como la conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a una carga funcional; aunque mucho tiempo antes, en 1969, ya había postulado el concepto de contacto directo entre el hueso vital y el implante de titanio, sin la interposición de tejido conectivo fibroso entre ellos<sup>154</sup>. Por lo tanto, el conocimiento de las respuestas biológicas de los tejidos duros y blandos orales a la preparación quirúrgica de la zona receptora del implante será imprescindible para el éxito del tratamiento protésico.

Albrektsson<sup>94, 155</sup> ofrece una definición clínica de la osteointegración, calificándola como la ausencia de movimiento al aplicar una fuerza sobre un implante óseo; en contraposición con los implantes que presentan tejido conectivo en la interfase, que si presentan movilidad.

Otros signos clínicos que nos demuestren la existencia de osteointegración son la percusión correcta, la ausencia de dolor y el buen estado gingival.

Además de los signos y síntomas clínicos, existen diversos métodos para determinar la correcta osteointegración implantaria.

Con las radiografías periapicales podemos determinar algunos signos de la correcta integración ósea de los implantes, como la continuidad ósea entre el hueso y el implante y la ausencia de zonas radiolúcidas<sup>156</sup>, pero estamos limitados en los estudios a largo plazo por la difícil cuantificación del estado óseo. Estos inconvenientes se pueden superar con la utilización de la radiografía digital y la radivisiografía digital que permiten un control longitudinal en el tiempo de los defectos óseos periimplantarios<sup>157</sup>.

Otro mecanismo que explica la retención del implante dental funcional es la fibrointegración o retención fibroósea, que es definida por la Asociación Americana de Implantología (AAID)<sup>158</sup> como la interposición de tejido colagenoso denso y sano entre el implante y el hueso.

Weiss<sup>159</sup> defiende este modelo de integración, ya que la presencia de fibras de colágeno en la interfase hueso-implante tienen un efecto osteogénico, formándose un pseudo-ligamento periimplantario que, al ser cargado fisiológicamente, estimula la diferenciación hacia elementos del tejido conjuntivo asociados al mantenimiento del hueso.

En la actualidad se habla de retención bioactiva o biointegración, que implica la unión química del hueso vivo con la superficie del implante, independiente a la utilización de cualquier mecanismo de unión mecánica, y evidenciable a nivel del microscopio electrónico. La hidroxiapatita es el material bioactivo representativo capaz de provocar la unión química con el hueso que rodea al implante.<sup>56, 160, 161, 162</sup> Por el contrario, la osteointegración adaptativa es aquella en la que el tejido óseo está en íntimo contacto con la superficie del implante sin la presencia de tejidos blandos intercalados, y identificable con la ayuda de un microscopio electrónico.

Gammage<sup>163</sup> opina que la utilización de los términos osteointegración, fibrointegración y biointegración es un ejercicio académico y léxico; lo importante para conseguir el éxito de los implantes es mantener la salud periimplantaria.

La osteointegración significa que hay células óseas en contacto con la superficie del implante, de manera que el hueso no lo considere como un elemento extraño.

Los fracasos en la osteointegración pueden ocurrir por diferentes factores generales, como una edad avanzada o una salud general deficiente del paciente, o por factores locales, como las complicaciones quirúrgicas, mala higiene bucal o cargas oclusales tempranas o excesivas.<sup>164</sup>

### **1.4.2 Biomecánica**

El éxito clínico a largo plazo de los implantes dentales se basa, como la totalidad de las soluciones restauradoras orales, en admitir las fuerzas fisiológicas distribuyéndolas hacia los tejidos vecinos.

El hueso se remodela según la tensión (fuerza/superficie) que recibe; por lo tanto es fundamental conocer la manera en que los implantes distribuyen estas tensiones para valorar la estabilidad de la unión hueso-implante.

El implante recibe fuerzas que se describen según su intensidad, dirección, duración y modo de carga (constante, cíclica y intermitente), y que deben ser soportadas gracias al material, diseño, posición y situación del propio implante y de la prótesis que soporta.

Branemark<sup>153</sup> opina que el aspecto más importante de la transferencia de cargas del implante al hueso es la ausencia de movilidad relativa entre el implante y el hueso, o sea consiguiendo la perfecta osteointegración del implante. Para que cicatrice el hueso en crecimiento, ajustándose perfectamente a la superficie del implante, es imprescindible la ausencia de carga, evitándose las tensiones entre ambos materiales. Así, un implante en forma de tornillo o con rugosidades y irregularidades en su topografía superficial no necesita de una verdadera unión con el hueso para transmitir correctamente las cargas axiales al hueso colindante. Los efectos positivos de las irregularidades de superficie requieren de una integración estrecha del hueso a las asperezas del implante; si se forma una capa fibrosa en la interfase, la carga puede provocar un movimiento relativo y la degradación del hueso periimplantario.

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

En el presente estudio se pretende elaborar una capa bioactiva de fosfato de calcio sobre un sustrato de titanio utilizando un método químico, por inmersión en una disolución que simula el fluido fisiológico.

Esta capa debe unirse químicamente al sustrato, obteniendo una mejora en sus propiedades mecánicas que evite su degradación clínica, y que permita su posterior utilización en la fabricación de implantes dentales de titanio recubiertos de fosfato de calcio

### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

1. Elaborar una superficie bioactiva de fosfato de calcio sobre un sustrato de titanio por vía química, mediante un método de inmersión en una disolución acuosa.
2. Observar si el fosfato de calcio obtenido por vía química es de tipo cristalino, con ausencia de fases amorfas propias de las capas de apatita formadas por el sistema de proyección de plasma
3. Validar la microscopía electrónica ambiental (ESEM) como un método para valorar el crecimiento de la superficie bioactiva del fosfato de calcio sobre el titanio.
4. Estudiar las características de grosor de la capa de fosfato de calcio obtenida por vía química.
5. Valorar como varía la rugosidad de la capa de fosfato de calcio producida por la inmersión en una disolución acuosa.
6. Comparar la fuerza de unión de la capa de fosfato de calcio sobre el sustrato de titanio obtenida por vía química con una obtenida por el sistema de proyección de plasma.

## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

## **4. MATERIAL Y METODO**

### **4.1 MATERIAL**

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de 23 muestras de titanio de sección cuadrangular de 10 x 10 x 0,7 mm; que sirvieron como sustrato sobre la que se debería formar la capa bioactiva de fosfato de calcio. Las muestras se obtuvieron a partir de una barra de igual sección (Technalloy España) por medio de una cortadora de disco de diamante

El titanio comercialmente puro presenta cuatro grados dependiendo de su composición en impurezas (según las normas ASTM<sup>165</sup>). Uno de los primeros aspectos consistió en la determinación del grado de titanio a utilizar, y si éste resulta adecuado para su utilización en implantología dental.

Además de la determinación del grado del titanio, se determinó la microestructura cristalina que a temperatura ambiente debería estar formada por granos equiaxiales de fase  $\alpha$ , en contraposición a la obtenida por el calentamiento a temperaturas superiores a 882 °C (región de fase  $\beta$ ), con posterior enfriamiento rápido, para dar estructuras martensíticas  $\alpha'$ .

La caracterización de estas muestras de titanio se realizó por medio de microscopía óptica y electrónica de barrido.

### **4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL MICROSCOPIO ÓPTICO Y MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO**

Se realizó una cuidadosa preparación metalográfica del titanio a estudiar ya que en el desbaste y en el pulido podemos ejercer tensiones mecánicas que alteren la estructura del material. Para evitar estos errores, las operaciones de corte, desbaste, pulido y ataque se hicieron con el máximo de cuidado y rigor.

#### 4.2.1 Encastación de las muestras.

Inicialmente para evitar el calentamiento, las 23 muestras se encastaron con una resina de polimerización transparente, que polimeriza a temperatura ambiente mediante un catalizador. Sin embargo, en vista de la imposibilidad de poder efectuar la observación de la microestructura por la mala calidad de las muestras así encastadas, el encaste se tuvo que realizar mediante baquelita en polvo.

La baquelita fluidifica a temperaturas alrededor de los 120°C, dando como resultado, una vez fría, un material oscuro, compacto y resistente.

Las muestras se encastaron utilizando una encastadora SPEED-PRESS de la marca Buehler, LTD (Figura 5). Dicho aparato permite la encastación de las muestras con baquelita. El calentamiento hasta los 120°C y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente no produce cambios en la microestructura que se desea observar, evitándose el incremento y descenso de la temperatura de un modo brusco.

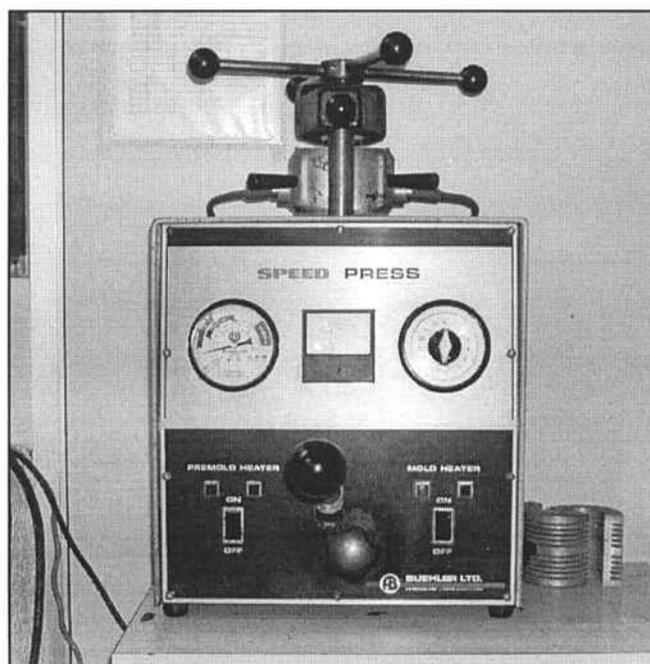


Figura 5. Encastadora Speed-Press

#### **4.2.2 Pulido y ataque de las muestras.**

Para la observación de la microestructura de las muestras en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de barrido (SEM), fue necesario pulirlas hasta obtener una superficie completamente lisa y sin rugosidades. Posteriormente se realizó un ataque químico de la probeta, para así revelar su estructura metalográfica.

Debido al buen acabado superficial de las muestras y a su pequeño espesor, las muestras fueron desbastadas mediante papel de esmeril de SiC de una granulometría de 1200. El pulido se realizó con paños mediante una solución acuosa de óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de diferentes tamaños de partícula ( 1 y  $0.05\mu\text{m}$  ).

Casi todos los reactivos que se emplean en el ataque químico de los discos contienen HF y un agente oxidante, tal como el  $\text{HNO}_3$ . En este caso se empleó una solución de HF del 48% y una solución  $\text{HNO}_3$  del 60%. Los dos agentes se mezclaron en una proporción de 1:1. El tiempo de ataque fue de entre diez y quince segundos.

En 5 muestras se realizó un pasivado químico por inmersión en HF y  $\text{HNO}_3$  a una concentración 0,6 M, con el fin de averiguar si el aumento de espesor de la capa de óxido de titanio que recubre el metal, podría afectar en algún modo a la formación de la capa bioactiva.

#### **4.2.3 Microscopía óptica**

Se observó la microestructura de todas las muestras en un microscopio óptico REICHERT MEF 4A/M, de la marca Leica, equipado con objetivos de 5,10,20 y 50 aumentos. (Figura 6)

#### 4.2.4 Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de energía dispersa de rayos X

Se observó la estructura metalográfica de todas las muestras en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 6400. Se trabajó con un voltaje acelerador de electrones de 15KV, con un aumento de imagen entre 200 y 2300 veces. Se tomaron imágenes mediante formato electrónico de alta resolución.

Al microscopio electrónico de barrido se le pueden acoplar diferentes tipos de detectores. Uno de ellos es el espectrómetro de energía dispersiva de rayos X (EDS) (Figura 7). Se determinó la composición química de todas las muestras empleando este dispositivo.

Si se detecta la energía de los rayos X producidos al incidir un haz de electrones sobre la muestra se tiene un espectro de energía dispersiva.

Cuando el haz de electrones incide sobre los átomos de la muestra el 99% de la energía de haz se pierde en calor, otros electrones debido a la interaccionan con los átomos de la muestra son desacelerados, produciendo radiaciones electromagnéticas en el orden de los rayos X ( radiación de frenado o bremsstrahlung ). Por otro lado, existe la posibilidad de que algunos electrones incidentes arranque electrones de capas internas ( efecto Compton ), dejando " espacios vacíos ", por tener ellos mayor energía, tendrán que emitir el exceso de energía en forma de radiación electromagnética cuya longitud de onda está en el rango de los rayos X..

Estos rayos X son característicos de cada elemento químico, por lo que su detección proporciona una técnica analítica de gran importancia, y su intensidad depende de la cantidad de elemento en la muestra. Si se utiliza un espectrómetro apropiado, y un semiconductor, de alta resolución, se puede conocer tanto los elementos que componen su muestra como su concentración.

El análisis químico por EDS está limitado para elementos de Masa Atómica (Z) mayor a 10 (si no se retira la ventana de berilio que llevan los detectores), es decir, del sodio en adelante. Además, la concentración mínima que puede ser detectada es de 0.2%.

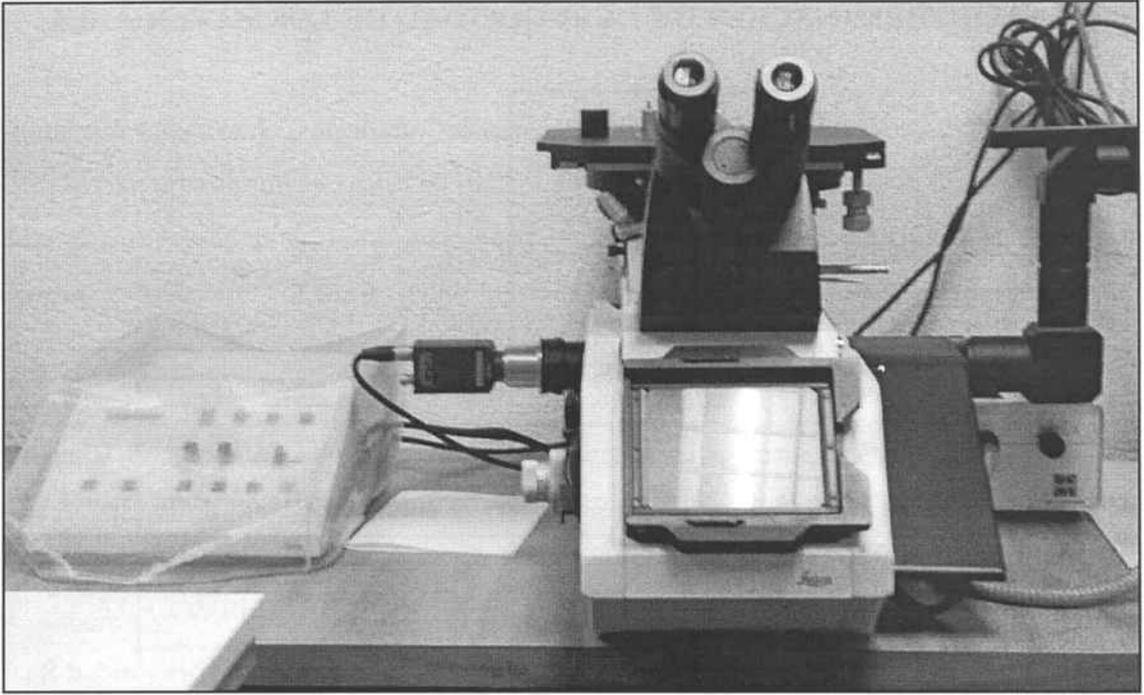


Figura 6. Microscopio Óptico

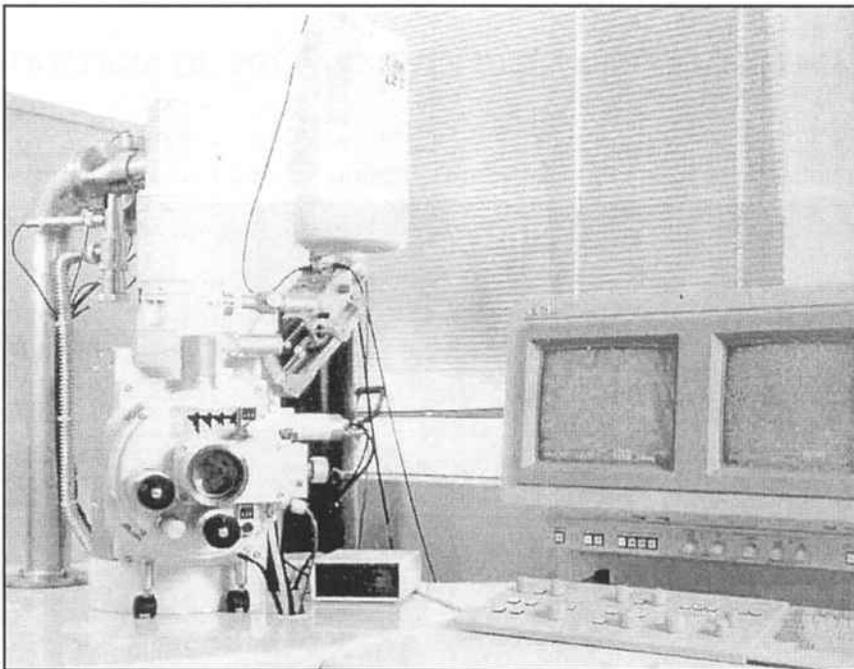


Figura 7. Microscopio Electrónico de Barrido

### 4.3 DETERMINACION DE LA RUGOSIDAD DE LOS MATERIALES

La rugosidad superficial de los materiales estudiados, tanto de las muestras iniciales de titanio como de la capa resultante de fosfato de calcio, es importante para el crecimiento de la capa bioactiva ya que jugará un papel muy importante respecto a la química de superficies. Los materiales deben tener un buen acabado superficial y presentar una limpieza absoluta con el fin de mejorar su comportamiento.

Antes de iniciarse el tratamiento químico de las muestras de titanio c.p., se determinó su rugosidad inicial para compararla con la rugosidad de la capa de fosfato de calcio obtenida.

Para los materiales estudiados se determinaron los valores de rugosidad Ra. El valor de rugosidad Ra se refiere a la media aritmética de las desviaciones del perfil. Se calculó a partir de la media de cinco mediciones en distintas zonas de las muestras. Los valores se determinaron mediante un rugosímetro MITUTOYO SURFTEST SV-500 controlado mediante software SURFPACK v3.00 (Figura 8). Los parámetros que controlan la determinación de los valores fueron para los alambres estudiados los que se muestran en la Tabla 5.



Figura 8. Rugosímetro Mitutoyo SurfTest SV-500

		Ti
LONGITUD MUESTRA (mm)	DE	0.45
NÚMERO LECTURAS	DE	34
LONGITUD ENSAYO (mm)	DE	3.2
FILTRO COMPENSACIÓN	DE	Inclinación total
PERFIL		R
FILTRO		Gaussiano Con longitud de corte $\lambda_c = 0,21$ mm

Tabla 5. Condiciones de medición de la rugosidad.

#### 4.4 METODOLOGIA DE PREPARACION DE LA CAPA BIOACTIVA

La primera fase del método utilizado en este estudio para la obtención de la capa de fosfato de calcio, consiste en la bioactivación de la superficie del titanio, gracias a la formación de un gel denso y amorfo de titanato de sodio, inducida por tratamiento químico y térmico. En este momento, si el titanio se implanta *in vivo*, ya es capaz de formar enlace químico directo con el hueso ordenado. Si se deposita una capa de apatita *in vitro* antes de la implantación, el tejido humano no ha de realizar las primeras etapas de enlace con el implante.

##### 4.4.1 Bioactivación de la superficie del titanio por tratamiento químico y térmico

Los estudios de la química de corrosión del titanio han demostrado que los tratamientos con soluciones alcalinas calientes forman una capa de titanato hidratado en la

superficie del titanio<sup>35, 112, 113</sup>. En esta ocasión las 23 placas de titanio fueron tratadas por inmersión en una solución de NaOH (0,5 M) a una temperatura de 60° C durante 24 horas para formar este gel de titanato. Seguidamente se limpiaron en agua destilada y se secaron a 40° C durante 24 horas.

A continuación siguió un tratamiento térmico para que el gel pasase a ser más denso y así mejorar la adhesión entre éste y el titanio. Las muestras de titanio se calentaron progresivamente a un ritmo de 5°C/min en un horno eléctrico hasta llegar a los 600°C, permaneciendo durante 1 hora a esta temperatura. Para acabar, las placas de titanio se dejaron enfriar dentro del mismo horno.

El horno utilizado en este tratamiento térmico fue un Hobersal ST-18 con atmósfera controlada de Argón para evitar la contaminación de las muestras. (Figura 9)



Figura 9. Horno Hobersal ST-18

La adhesión de la capa aumenta con la temperatura, pero para temperaturas superiores a 600°C el gel cristaliza en un alto porcentaje, lo que retarda el posterior proceso de deposición de apatita sobre la superficie. El posterior mecanismo de formación de apatita dependerá de la migración de los iones de sodio, procedentes del hidrogel de titanato de sodio formado en la superficie del Ti c.p. después de su tratamiento con NaOH.

#### 4.4.2 Deposición in vitro de la capa de fosfato de calcio

Para conseguir el depósito de apatita in vitro sobre el titanio ya tratado química y térmicamente, es decir, con el titanato en superficie, se sumergieron las muestras dentro de una solución con una concentración iónica muy cercana a la del plasma sanguíneo humano (Tabla 6), que debido a esta similitud se le denomina *Simulated Body Fluid* (SBF). La única diferencia entre este fluido y el del cuerpo es que el SBF tiene una supersaturación en cloruro y una concentración de  $\text{HCO}_3^-$  inferior. El SBF que se utilizó en este trabajo estaba tamponado a pH 7,4 con 50 mM de trishidroximetil aminometano y 40 mM de ácido clorhídrico a 36,5 °C, siguiendo el protocolo de Kokubo, mediante un pHmetro dirigido por ordenador que permita el control riguroso de esta variable (Figura 10). A continuación, se describe con más detalle el método y su justificación química.

1. Se lavaron todas las botellas y utensilios con disolución 1M-HCl, detergente neutro con agua destilada, y agua desionizada; y después se secaron.

Para preparar un litro de 1M-HCl a partir de HCl al 37% se llenó un matraz de dicha capacidad hasta la mitad con agua destilada. A continuación se añadió 83 ml de HCl al 37%, para finalizar enrasando con más agua destilada hasta completar la disolución deseada.

2. Se pusieron 500 ml de agua desionizada en una botella de litro de polietileno, y se cubrió la botella con un vidrio de reloj.

3. Se agitó el agua en la botella mediante un agitador magnético, y se añadió al agua los reactivos que se muestran en la Tabla 7, uno por uno, y en el orden dado en la misma, esperando para añadir uno a que se disolviera completamente el anterior.

4. Se ajustó la temperatura de la disolución en la botella a 36.5 °C con un baño térmico de agua, y el pH de la disolución a 7.4 agitando la disolución con un agitador mecánico y añadiendo 1M-HCl, gota a gota, en la disolución. (Al sacar el electrodo del pHímetro de la disolución, se añadió el agua utilizada para limpiarlo en la disolución, así como el agua utilizada para lavar el termómetro y el agitador mecánico).

5. Se transfirió la disolución del bote de polietileno a un matraz de 1000 ml., añadiéndose el agua utilizada para lavar el bote de polietileno al matraz con la disolución.

6. Se ajustó el volumen total de la disolución hasta un litro añadiendo agua desionizada, agitando el matraz a 20 °C.

7. Se transfirió la disolución del matraz a una botella de polietileno o de poliestireno, y se almacenaron las botellas en un refrigerador a 5-10 °C. Se comprobó que ninguna sustancia se precipitó en la disolución durante el almacenamiento, en cuyo caso habría que desecharla y reiniciar todo el proceso de elaboración del SBF.

Ion	SBF	Plasma humano
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Cl <sup>-</sup>	147.8	103.0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.2	27.0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5

Tabla 6. Concentración iónica (mM) del SBF y del plasma sanguíneo humano.

Orden	Reactivo	Cantidad
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.228 g
5	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.305 g
6	1M-HCl	37.5 ml
7	CaCl <sub>2</sub>	0.278 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.074 g
9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6.057 g

Tabla 7. Reactivos para preparar SBF.

Las muestras de titanio activadas química y térmicamente fueron inmersas en 40 mm de SBF, de la manera que se observa en el esquema de la figura 11 y depositadas en una estufa (Figura 12) a 37°C, simulando las condiciones in vivo, durante 2 semanas. El SBF se renovaba cada dos días.



Figura 10. pH-ímetro



Figura 12. Estufa con las muestras en el interior

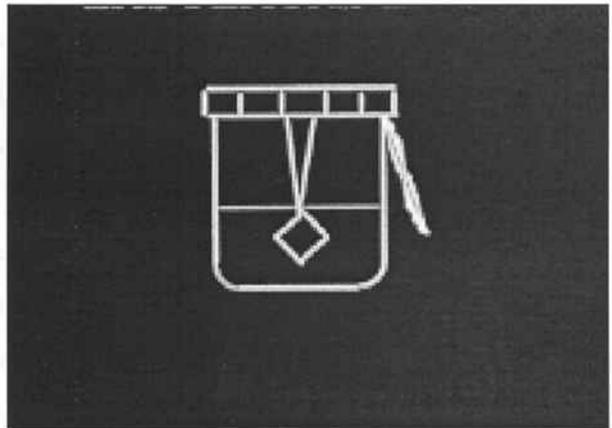


Figura 11. Esquema del sistema para colgar las placas en el SBF

Todos las preparaciones del Simulated Body Fluid y la deposición de la capa se realizaron bajo una campana de flujo laminar Telstar 2000 de flujo horizontal bajo lámpara de rayos ultravioletas (Figura 13). Se garantizaba durante todo el proceso la ausencia de bacterias o microorganismos que podrían afectar a la integridad de la capa de fosfato. Todos los instrumentos fueron esterilizados en una esterilizador Selecta a vapor de agua de 120°C durante 3 horas.

Asimismo, el agua que se utilizó en todo el proceso fue destilada dos veces bajo intercambiadores de iones con un equipo Milipore 3000 (Figura 14). El agua era por tanto bidestilada lo que garantizó la calidad de la misma como reactivo.

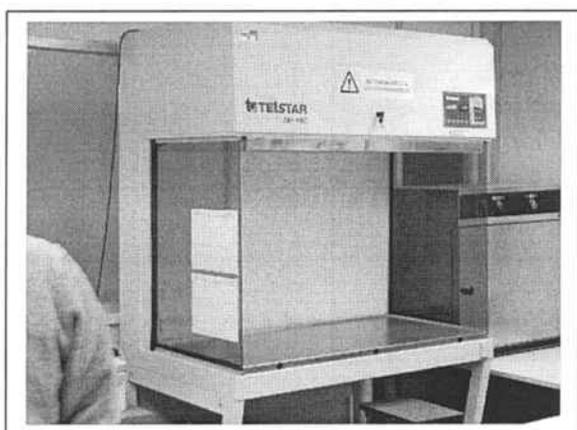


Fig. 13. Campana de flujo laminar

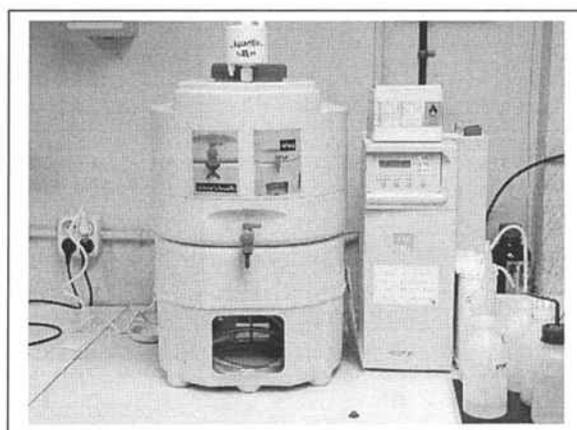


Fig. 14. Intercambiador de iones

#### 4.5 MICROSCOPIA ELECTRONICA AMBIENTAL

Para la observación y determinación del crecimiento de la capa bioactiva de fosfato de calcio se utilizó un microscopio electrónico ambiental (ESEM) Electroscan 2020 (Figura 15), que permite observar muestras no conductoras sin preparación de recubrimiento de oro como en el caso del microscopio electrónico de barrido. Esto nos ofrece la posibilidad de estudiar las muestras de titanio recubiertas del gel de titanato y de la capa de fosfato de calcio creciendo en la superficie del material.

El portamuestras de este microscopio electrónico (Figura 16) posee un sistema de enfriamiento y calentamiento, con lo que las muestras las pudimos observar a 37°C e

incluso en un cierto medio fisiológico. Es decir, pudimos observar las muestras hidratadas tal y como serían en su aplicación final.

Para la mejor observación de las muestras, en ocasiones se obtuvieron las imágenes de electrones secundarios con la ayuda de vapor de agua a una presión de unos 50 Torr y a una temperatura entre 5 y 7 °C, con la finalidad de mantener las muestras bien hidratadas.



Fig. 12 Microscopio electrónico ambiental

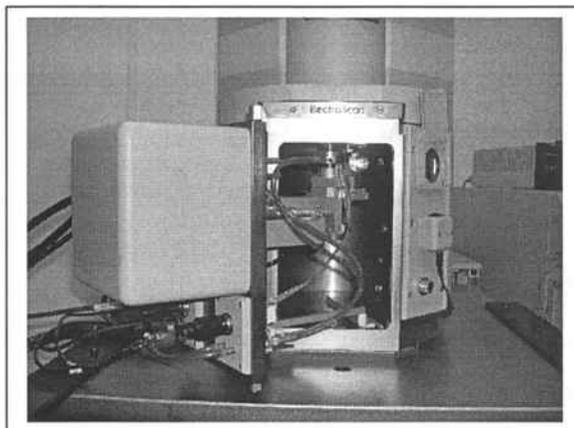


Fig. 13 Portamuestras

La caracterización de la capa de fosfato de calcio formada en la superficie del titanio se realizó con un equipo de microanálisis de rayos X rasantes. Esta técnica presenta el mismo fundamento que la convencional pero los haces inciden en un ángulo muy pequeño respecto a la superficie a estudiar, lo que permite un análisis mucho más sensible de la capa. Si estudiáramos la superficie resultante con microanálisis convencional, la incidencia del haz de electrones abarcaría, además de todo el grosor de la capa de fosfato de calcio, mucho volumen del sustrato de titanio lo que distorsionaría los resultados.

#### 4.6 DETERMINACIÓN DE LA RUGOSIDAD DE LA CAPA DE FOSFATO DE CALCIO

Después de los 15 días de tratamiento por inmersión de las muestras de titanio en SBF se determinó la rugosidad de la capa de fosfato de calcio obtenida, utilizando el mismo rugosímetro y los mismos parámetros que se usaron para las muestras de titanio originales.

#### 4.7 DETERMINACION DE MICRODUREZAS

El siguiente procedimiento fue estudiar la microdureza de la capa de fosfato de calcio obtenida en este estudio. Par ello, se empleó un microdurómetro MATSUZAWA (Figura 17), empleando cargas de 10g de fuerza durante 15 segundos sobre la capa de fosfato de calcio obtenida en este trabajo para determinar su microdureza. El indentador utilizado tenía forma de pirámide de base cuadrangular de diamante. (Figura 18).

Estos valores permiten medir de manera clara los parámetros geométricos de la indentación y por lo tanto encontrar el valor correspondiente Vickers (HV), .

En el test Vickers la carga se aplica suavemente, sin impacto, de 10 a 15 segundos. Las propiedades físicas del indentador y la exactitud de la carga aplicada deben ser controladas para conseguir resultados correctos. Una vez aplicada la carga (L), se miden las dos diagonales de la indentación con un micrómetro, y se realiza la media (d). La dureza Vickers se calcula de la siguiente manera:  $HV=1854,4L/d^2$  (L son gramos-fuerza, y d son  $\mu\text{m}$ )

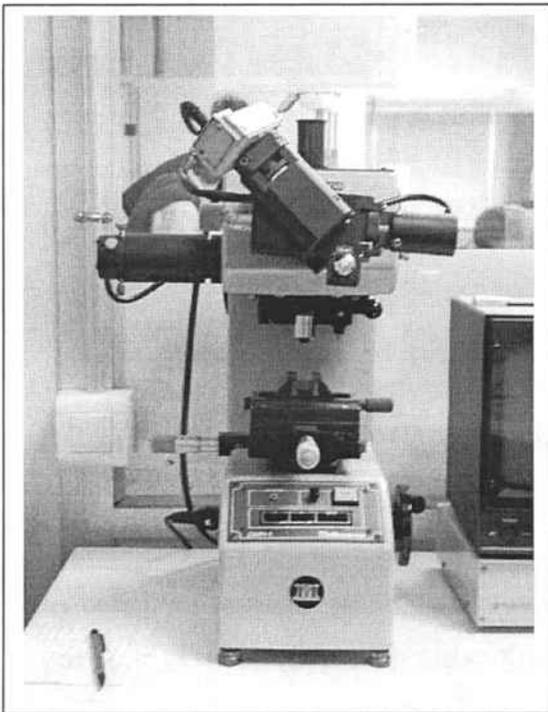


Fig. 17



Fig. 15 Indentador piramidal

(18)

#### 4.8 METODO DE ARRANCAMIENTO

Para determinar la fuerza de adhesión de la capa de fosfato de calcio obtenida en este trabajo se utilizó un equipo de arrancamiento (scratch test), el cual consiste en un sistema de penetración que araña dicha capa en su interfase con el sustrato, determinando la fuerza que realiza el indentador para producir el despegue de la capa. (Figura 19).

Este test se aplicó sobre cinco muestras de titanio recubiertas por fosfato de calcio obtenidas por vía química en este estudio, sobre cinco implantes de titanio recubiertos de apatita elaborado por el método de proyección de plasma (plasma-spray).

El indentador es un diamante de forma esférica con 50 micrómetros de radio que aplica una fuerza de arrancamiento de 2 N. La adquisición de datos informáticamente fue de 50 puntos por segundo y la velocidad de arañado de 20 micrómetros por segundo. La velocidad de aplicación de carga escogida fue de 10mN/s. Se realizaron por cada una de las muestras cinco recorridos de 2,4 mm. Se obtuvieron datos de un total de 2.500.000 de puntos para cada una de las cinco muestras estudiadas (Figura 20).

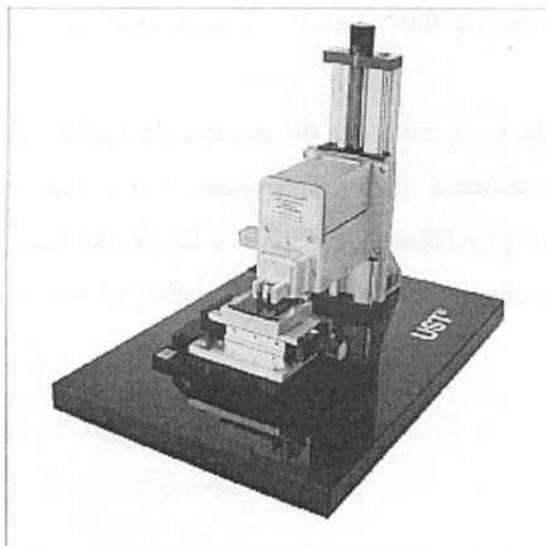


Fig. 16. Equipo de arrancamiento

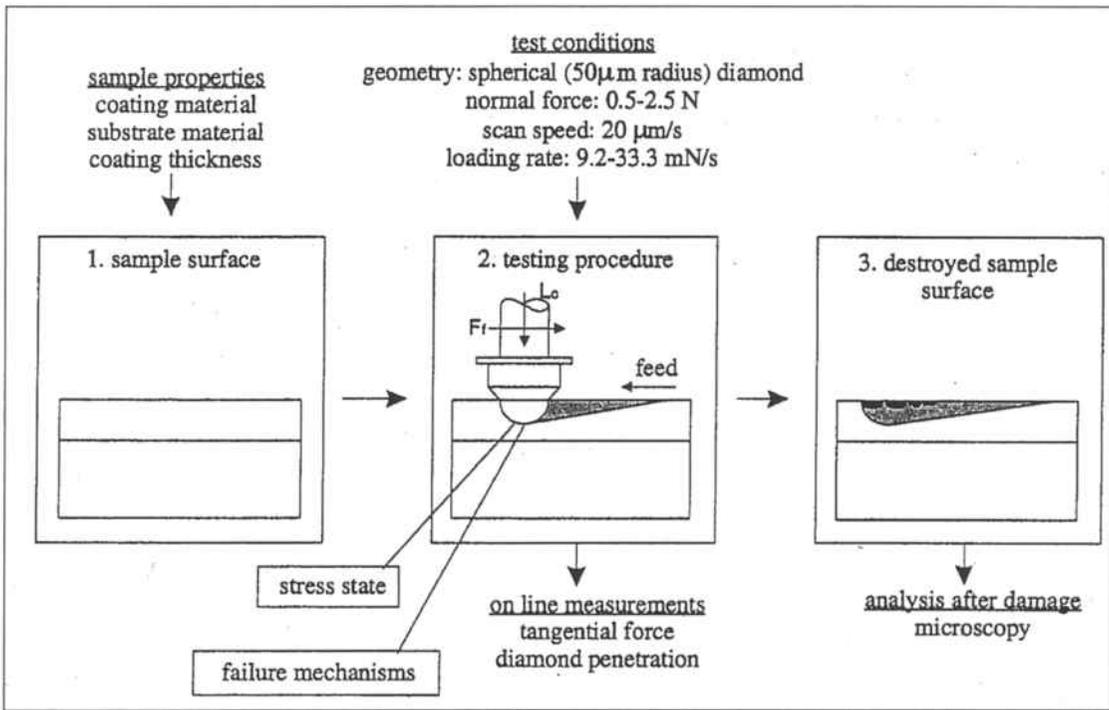


Fig. 17 Esquema del funcionamiento del Scratch Test

#### 4.9 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos acerca de la rugosidad ( $R_a$ ) de la superficie de las muestras antes y después de ser tratadas químicamente se compararon con el test de Wilcoxon.

En los ensayos de arrancamiento de la capa de fosfato de calcio, los resultados fueron tratados estadísticamente para determinar si los valores de adhesión de las superficies producidas por proyección de plasma y las producidas en este estudio por vía química eran valores significativos. Para ello se realizó el test t-Student para muestras independientes.

## **5. RESULTADOS**

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 CARACTERIZACION METALÚRGICA DEL TITANIO**

La primera fase de este estudio consistió en determinar el grado y la microestructura de las muestras de titanio c.p. usado en este estudio, y valorar si serían adecuados para la implantología dental.

El espectrómetro de energía dispersa de rayos X nos permitió determinar la composición química de las muestras, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 8, que se ajustan perfectamente al titanio de grado 3.

Elemento	% peso
Nitrógeno.	0.009
Carbono.	0.08
Hidrógeno.	0.003
Hierro.	0.20
Oxígeno.	0.28
Titanio.	Balance

Tabla 8. Composición química del Ti

Además de la determinación del grado del titanio más adecuado para su aplicación biomédica, se debe determinar qué microestructura presentan las muestras de titanio, y si ésta es idónea para su utilización implantológica. Esto se realizó con la ayuda de la microscopía óptica y electrónica de barrido.

En la Figura 21 observamos una fotografía obtenida mediante el microscopio óptico de la microestructura del titanio utilizado, que se corresponde con una organización cristalográfica de granos equiaxiales de fase  $\alpha$  maclados.

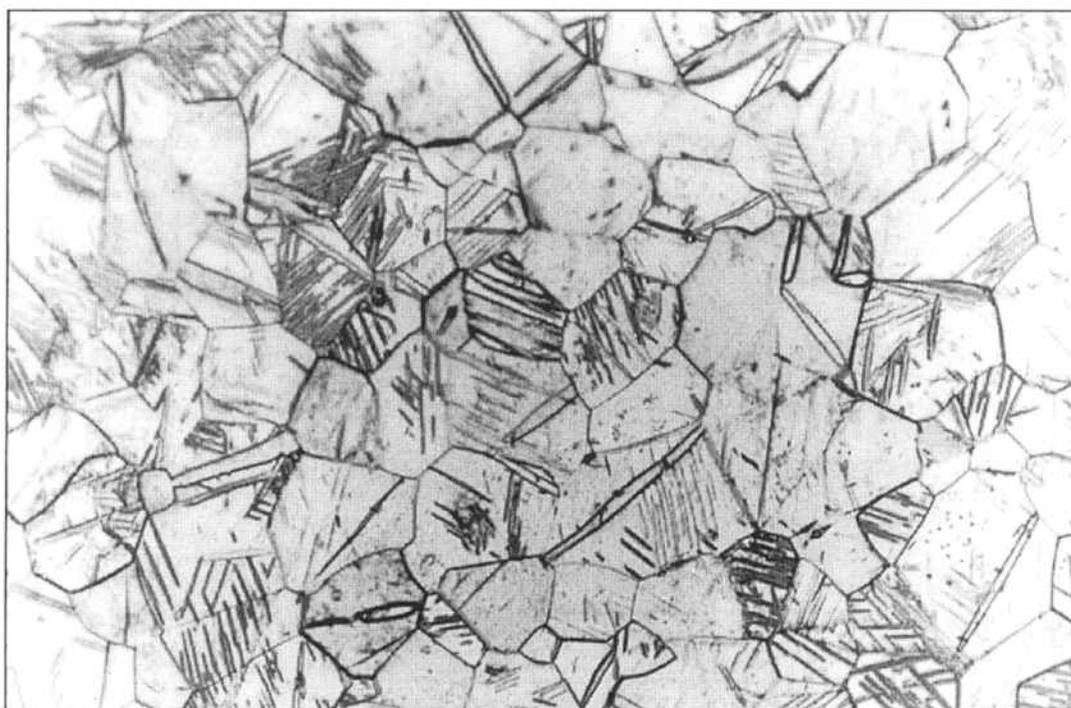


Fig. 21. Estructura de granos  $\alpha$  del titanio c.p.

A la luz de los resultados mecánicos y de corrosión obtenidos, se estableció como óptimo el titanio de grado 3 con microestructura de granos equiaxiales de fase  $\alpha$  maclados. De esta forma tendremos un titanio con buenas propiedades mecánicas que mediante el proceso de pasivado, hará mejorar significativamente la resistencia a la corrosión del material, alcanzando incluso niveles superiores del titanio de grado 1.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CAPAS BIOACTIVAS

La caracterización de las capas formadas sobre las muestras de titanio después del tratamiento químico y térmico, y de la inmersión en el Simulated Body Fluid se realizó mediante la observación en un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM). La caracterización analítica de los productos se realizó mediante estudios de Difracción de Rayos X rasantes. Estos estudios se realizaron a diferentes tiempos para ir observando la

cinética de reacción. Se determinó también la rugosidad antes y a diferentes tiempos del tratamiento para ver su influencia y su posible variación con la deposición de las capas.

### 5.2.1 Caracterización de la capa bioactiva después del tratamiento químico y térmico

Las observaciones iniciales en el ESEM mostraron que, después de los tratamientos químicos y térmicos, se creó una estructura esquelética, porosa, en la superficie de las placas tratadas con NaOH (Figura 22). Esta estructura será el sustrato para el posterior crecimiento de la capa apatítica. En la Figura 23 se muestra el diagrama de difracción de Rayos X rasantes de esta capa formada en las placas de titanio lisas antes de ser sumergidas en SBF. Este difractograma confirma que la estructura esquelética observada corresponde a titanato de sodio, tal y como demuestra su comparación con el publicado por Kokubo et al.<sup>166</sup>

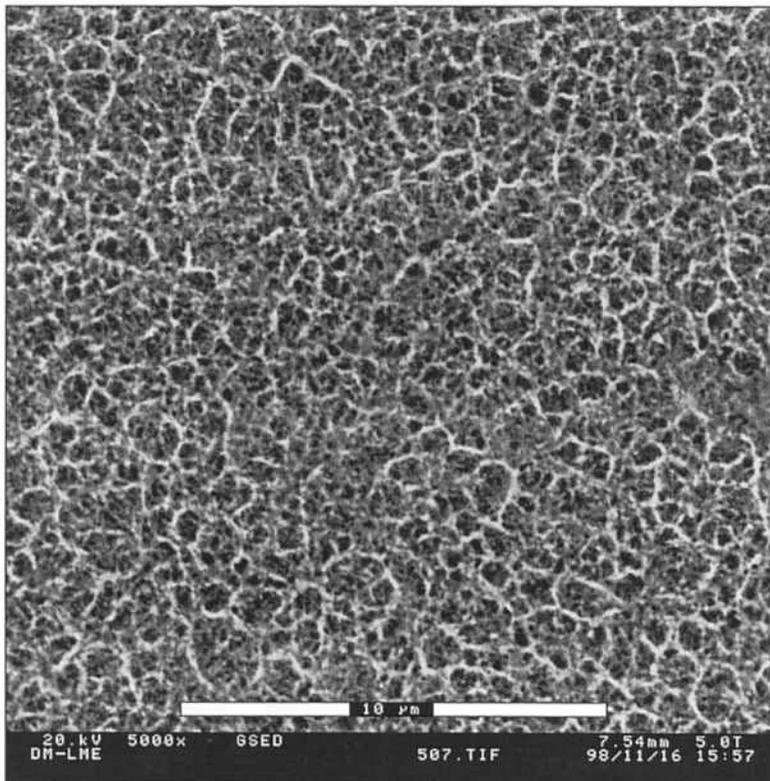


Figura 22. Estructura esquelética de titanato de sodio sobre una placa lisa.

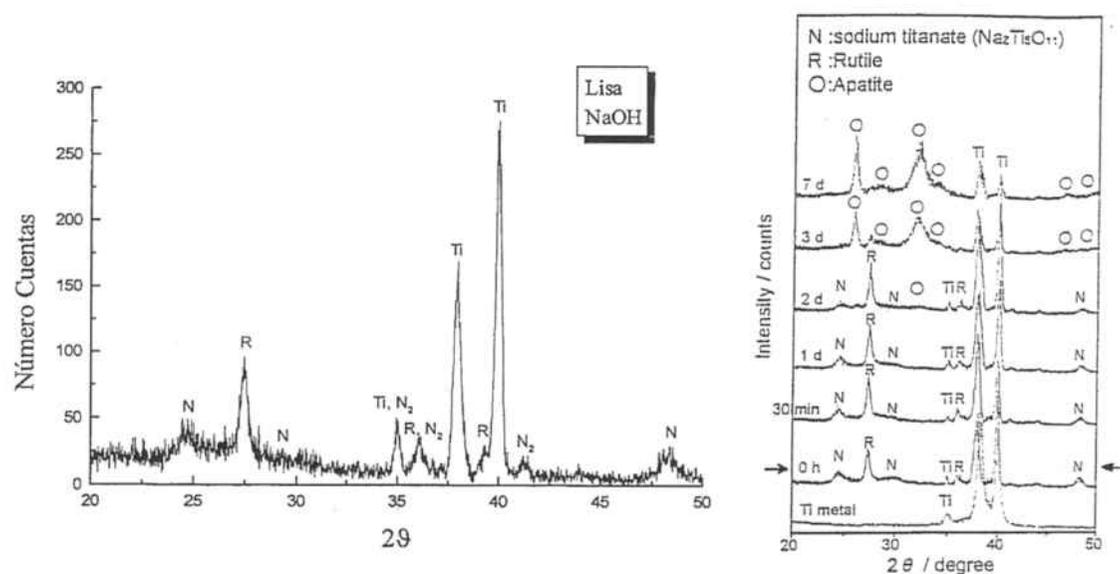


Figura 23. Difractograma de rayos X de la placa lisa después del tratamiento con NaOH comparado con el obtenido por Kokubo (T.Kokubo, F.Miyaji, H.M.Kim y T.Nakamura. "Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. *J.Am.Ceram.Soc.* 79 (4)(1996) 1127-29)<sup>166</sup>. Ti:Titano, N: Titanato de sodio ( $\text{Na}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$ ), R: Rutilo ( $\text{TiO}_2$ ),  $\text{N}_2$ : titanato de sodio ( $\text{NaTiO}_2$ ).

### 5.2.2 Caracterización de la biocapa tras la inmersión en SBF

Durante los dos primeros días de inmersión en el SBF no se observaron deposiciones de ningún tipo sobre la superficie de ninguna de las placas tratadas, aparte de la estructura esquelética ya mencionada. Sin embargo, mediante el ESEM, al tercer día se pudieron observar, en ciertos puntos de las placas, pequeñas agrupaciones de cristales muy finos (del orden del nanómetro) y se localizaron tanto en las placas pasivadas como en las placas sin el tratamiento de pasivación. (Figura 24 A y B).

Al cuarto día de inmersión en SBF, las placas, pasivadas o no, y atacadas con NaOH estaban recubiertas por una capa homogénea de apatita (como se comprobó con la difracción) (Figura 25).



Figura 24 A. Agrupaciones de cristales en la placa, después de 3 días en SBF.

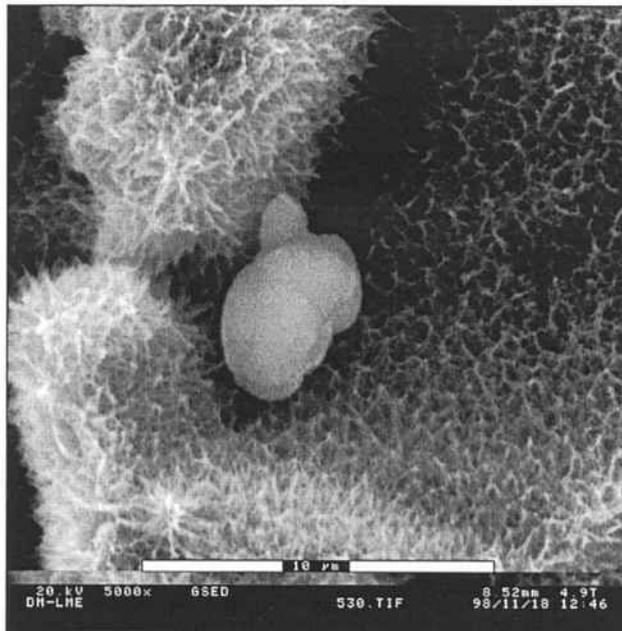


Figura 24 B Ampliación de la agrupación de cristales

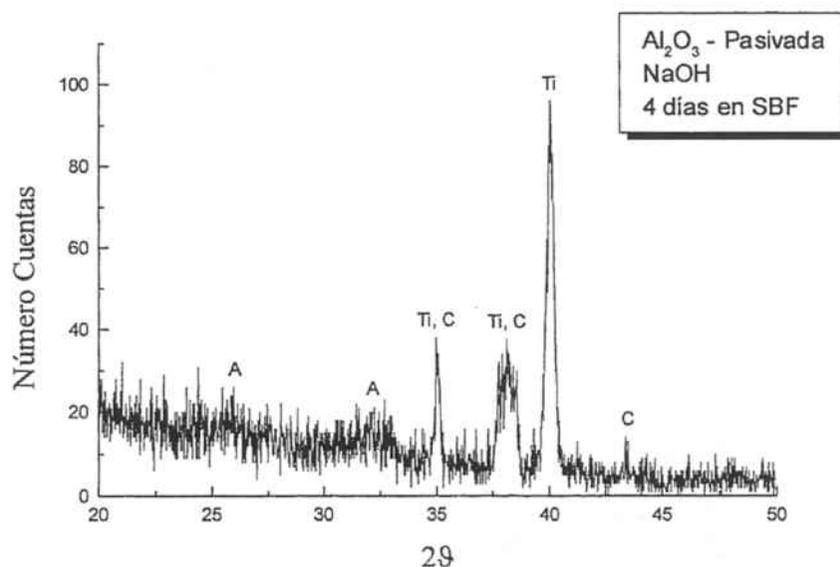


Figura 25. Difractograma de Rayos X de la placa pasivada, después de 4 días en SBF.

Los difractogramas de rayos X rasante de la placa, realizados al cabo de cuatro días de inmersión en el SBF, muestran máximos a: 35°; 38°; 40°, los cuales corresponden al titanio; y un halo asociado a la apatita (A) entre 30,5-33°. Asimismo, se puede apreciar, aunque ligeramente, otro halo entorno a los 26°. La presencia de estos máximos asociados a la apatita nos indica que las pequeñas bolas iniciales formadas en la superficie del Ti c.p. eran núcleos de apatita así como la capa homogénea obtenida a los cuatro días en SBF, ya que, los núcleos y la capa homogénea tienen la misma morfología superficial y la misma tonalidad. Si la capa homogénea es apatita, como demuestra el difractograma, los núcleos también lo son.

Después de cinco días de tratamiento en SBF había capas homogéneas de apatita recubriendo toda la superficie de las placas lisas.

Seguidamente se observó que sobre esta capa homogénea de apatita se originaron nuevos grupos de pequeñas agrupaciones cristalinas, como si fuese una segunda nuclearización sobre la capa de apatita ya existente (Figura 26).

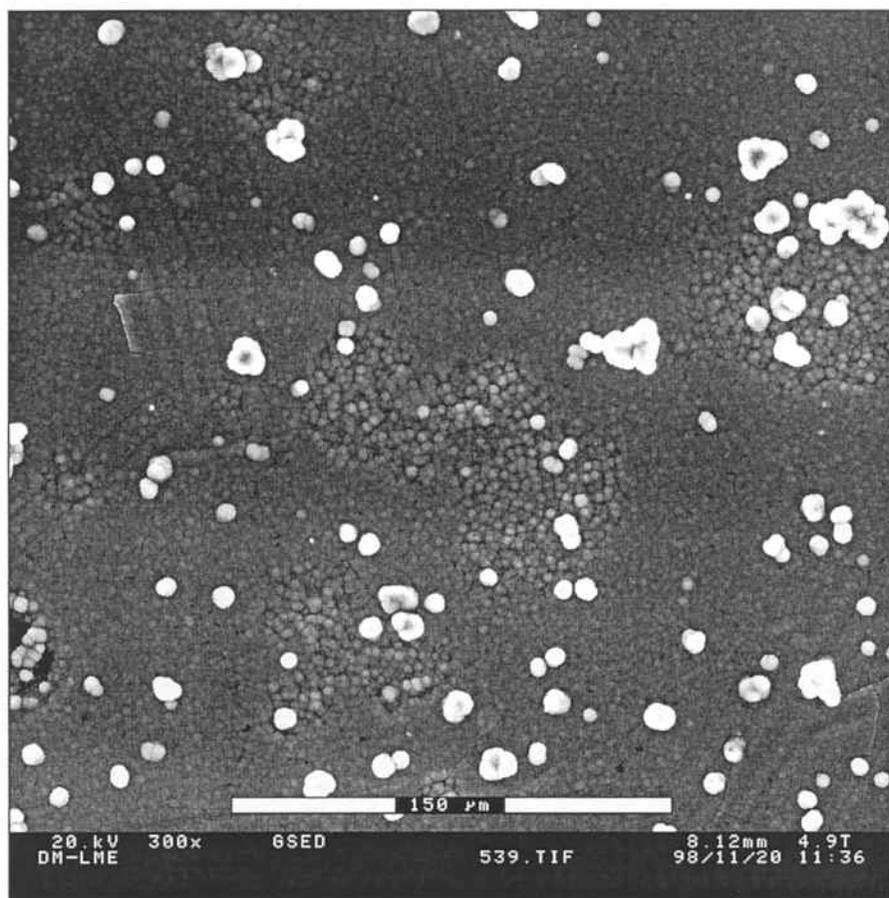


Figura 26. Capa homogénea de apatita en la placa lisa después de 5 días en SBF, con nuevos núcleos de fosfatos de calcio sobre ella.

Al final del proceso de deposición de apatita, es decir después de 15 días de inmersión en el SBF no se observaron cambios en el aspecto de la capa homogénea de apatita depositada para las muestras. La capa tiene la misma morfología de agrupaciones pequeñas, que se observó después del cuarto y/o quinto día del tratamiento con SBF. Los difractogramas de rayos X rasantes al final del tratamiento confirmaron que la apatita crece con el tiempo del tratamiento con SBF. Como se puede ver en la Figura 27, los máximos de apatita aumentan el número de cuentas entre los cuatro y los once días. Esto significa principalmente que la capa homogénea aumenta, habiendo más cristales de apatita en profundidad desde la superficie, haciéndose más significativa la presencia de esta fase en el difractograma de Rayos X rasantes.

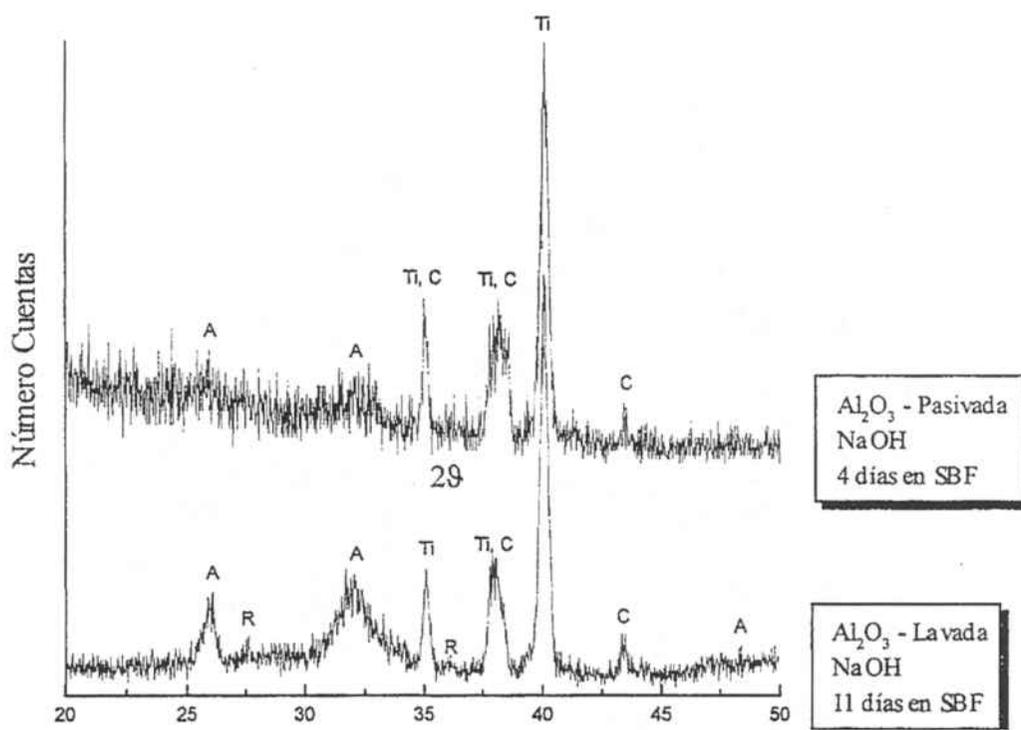


Figura 27. Difractograma de la placa con impurezas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  comparando el estado inicial de la formación de apatita, después de 4 días en SBF, con el estado después de 11 días en SBF. Ti - titanio, C- corindón ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), A - apatita, R- rutilo ( $\text{TiO}_2$ )

Es muy importante que la formación y el crecimiento de la capa bioactiva se realice en condiciones lo más limpias y estériles posibles ya que las bacterias pueden aparecer en la superficie del implante dental y metabolizar el calcio de la capa desintegrándola. En la Figura 28 se pueden observar cocos actuando sobre la superficie bioactiva, obtenida con el microscopio electrónico de barrido en una de las muestras inmersa en el Simulated Body Fluid durante la realización de esta tesis doctoral.

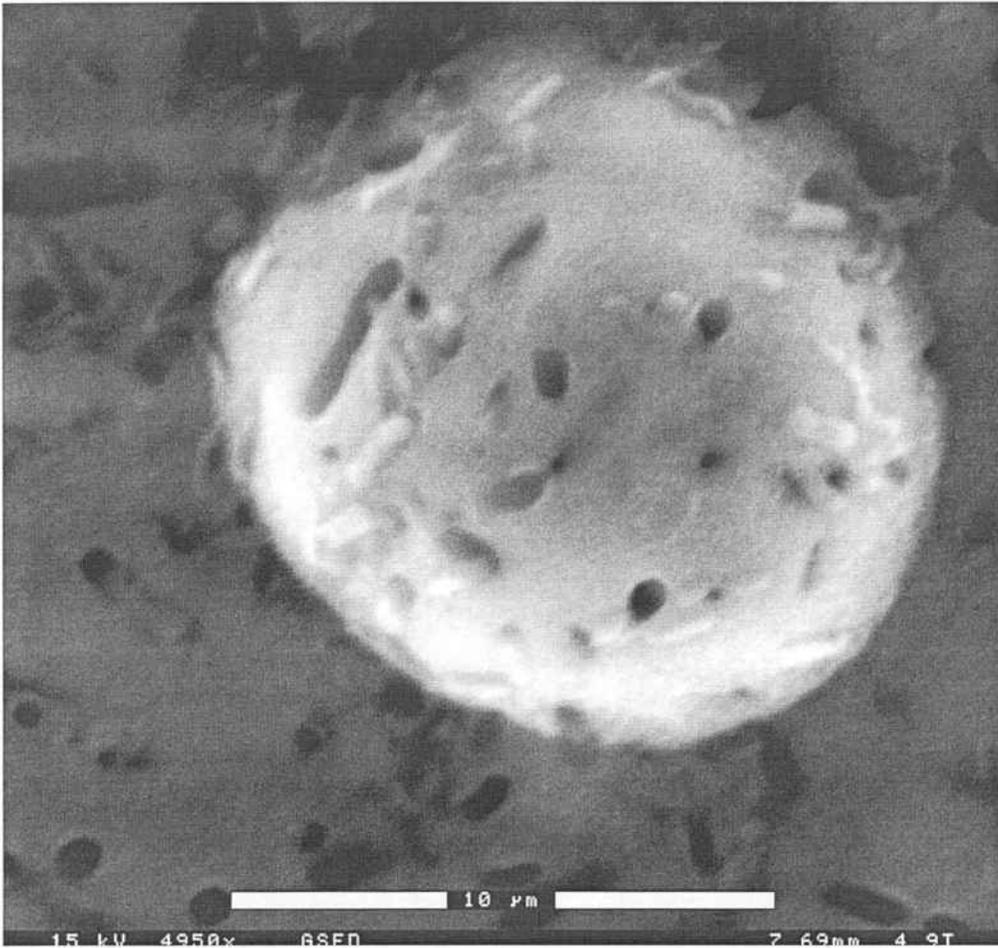


Fig. 28. Presencia bacteriana sobre la capa de fosfato cálcico

### 5.3 RUGOSIDAD DE LAS MUESTRAS

Para evaluar como la deposición de la apatita afecta la rugosidad se hizo la determinación del valor de  $R_a$ , cuyos resultados se muestran en la Tabla 10.

Placas	Antes tratamiento		Después de inmersión en SBF	
	$R_a$ medio	Desv. est.	$R_a$ medio	Desv. est.
Lisa	0,07	0,02	0,38	0,16

\* Desv. est. = Desviación estándar

Tabla 10. Valores de Rugosidad ( $R_a$  en  $\mu\text{m}$ ) para las muestras estudiadas

Uno de los resultados más importantes de este análisis es que la apatita crece con la misma cinética sobre toda la placa. Es decir, la capa no va a alcanzar un aspecto liso con el tiempo, sino que la rugosidad va a mantenerse durante la deposición. En la figura 29 se observa el aspecto de rugosidad de la capa de fosfato de calcio y su homogeneidad.

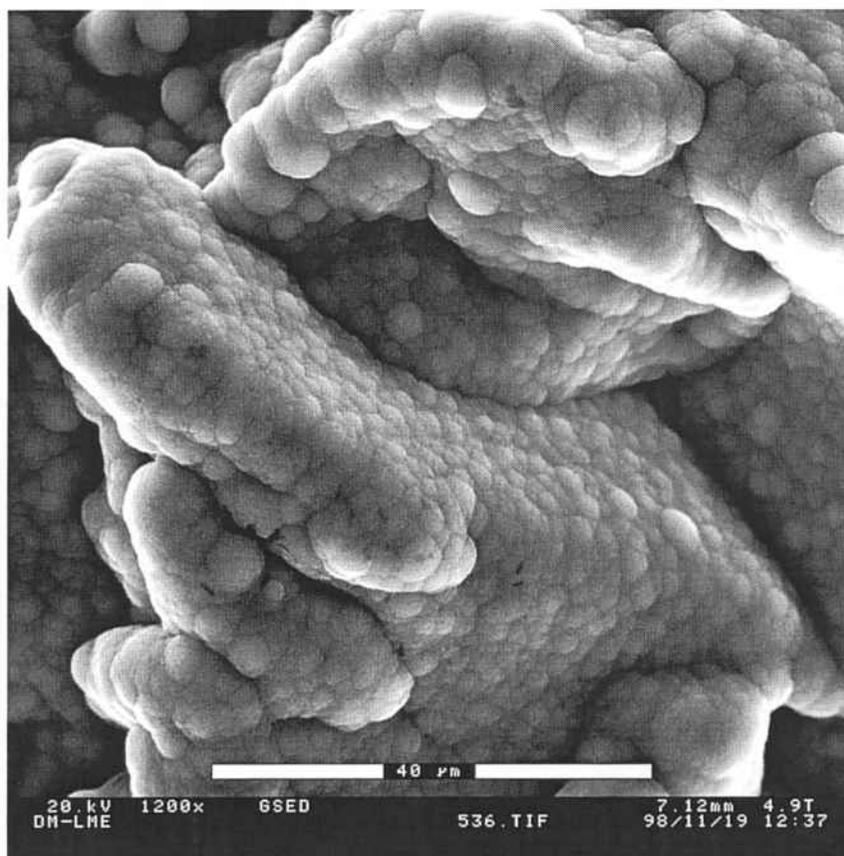


Figura 29. Capa homogénea de apatita sobre la placa rugosa

Para ver si el aumento de la rugosidad observado en el caso de las placas lisas es estadísticamente significativo se realizó el test de Wicoxon. El p-valor que se obtuvo,  $p=0,0002$ , mostró que las diferencias de medida son variaciones estadísticamente significativas, lo que indica que son debidas al cambio de tratamiento. Es decir, con más de un 99,9% de seguridad, podemos decir que la formación de la capa homogénea de apatita aumenta la rugosidad superficial de las placas lisas.

#### 5.4 MICRODUREZAS DE LA CAPA DEPOSITADA

Las microdurezas de la capa depositada es de difícil determinación ya que la capa es muy delgada y el indentador que se aplica puede traspasar la capa e incidir en el sustrato de titanio. Por ello se hicieron los ensayos con la menor carga posible que permitía el equipo (10g) durante 15 segundos.

La media de los resultados obtenidos fue de 459 unidades Vickers con una desviación estándar de 39 unidades Vickers.

#### 5.5 MÉTODO DE ARRANCAMIENTO (Scratch Test)

La fuerza de fricción del recubrimiento de un implante dental de plasma spray resultó ser de 160 mN. El espesor de dicho recubrimiento fue de 20 micrómetros. La desviación estándar fue de 15mN.

Para la capa bioactiva de recubrimiento obtenida en esta tesis doctoral fue de 450 mN. El espesor de este recubrimiento fue de 15 micrómetros. La desviación estándar fue de 23 mN.

En los ensayos de scratch o arrancamiento, los resultados fueron tratados estadísticamente para determinar si los valores de adhesión de las capas de fosfato producidas por plasma spray y las producidas en esta Tesis Doctoral eran valores estadísticamente significativos. Se pudo apreciar al realizar el test de t-Student con un valor de  $p < 0.005$  que los resultados eran estadísticamente significativos con un valor mayor del 99.5% de probabilidad

## **6. DISCUSIÓN**

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 CARACTERIZACIÓN METALÚRGICA DEL TITANIO

La caracterización del material utilizado en este estudio dio como resultado un titanio de grado 3 con microestructura de granos equiaxiales de fase  $\alpha$  maclados. De esta forma tendremos un titanio con buenas propiedades mecánicas que mediante el proceso de pasivado, hará mejorar significativamente la resistencia a la corrosión del material, alcanzando incluso niveles superiores al titanio de grado 1.

Las características mecánicas y químicas del titanio de grado 3 han sido expuestas por numerosos estudios y son idóneas para su utilización como material implantológico dental<sup>9,14,15,16,17,19</sup>.

### 6.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CAPAS BIOACTIVAS

Durante la aposición de la capa de fosfato de calcio sobre las muestras de titanio se producen una serie de reacciones químicas y cambios cristalográficos, comentados a continuación, que permiten la unión química de dicha capa al sustrato de titanio (Figura 30).

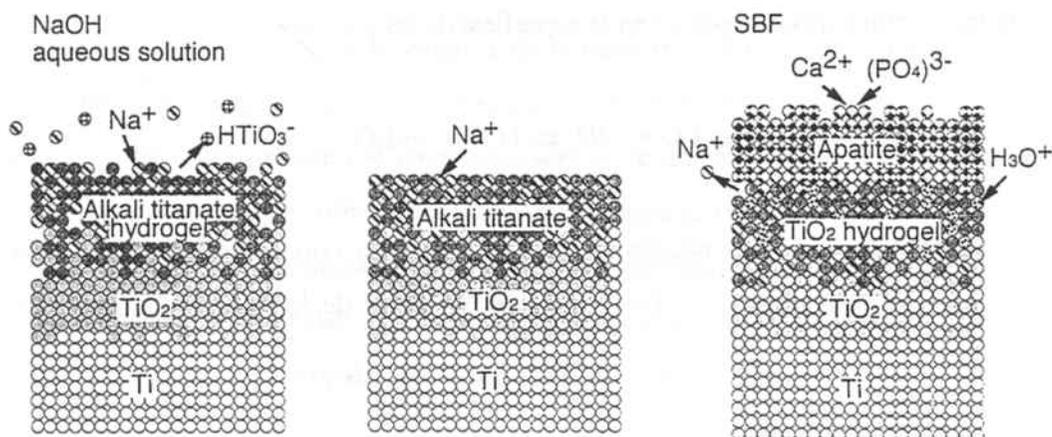
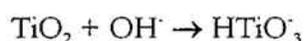


Figura 30. Mecanismo de formación de apatita con el método de Kokubo et al.<sup>40</sup>

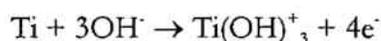
### 6.2.1 Formación de la capa de titanato

Los estudios de la química de corrosión del titanio han demostrado que los tratamientos con soluciones alcalinas calientes forman una capa de titanato hidratado en la superficie del titanio<sup>39,40</sup>. En el método utilizado en esta tesis doctoral, las placas de titanio son tratadas con una solución de NaOH (0,5M) a una temperatura de 60° C durante 24 horas para formar este titanato con consistencia de gel.

Durante el tratamiento con hidróxido de sodio, el óxido de titanio que protege la superficie se disuelve parcialmente para formar una solución alcalina debido al ataque corrosivo de los grupos hidroxilos del NaOH.



Al mismo tiempo que se desarrolla esta reacción, el titanio se hidrata según las reacciones siguientes



Si el ataque de los grupos hidroxilos continúa sobre el  $\text{TiO}_2$  ya hidratado, se producen hidratos con cargas negativas en la superficie de las muestras



Estas moléculas cargadas negativamente se combinan con iones de sodio en la solución acuosa lo que resulta en la formación de una capa de hidrogel de titanato de sodio.

El  $\text{TiO}_2$  de la superficie del titanio es susceptible a reaccionar con la solución de hidróxido de sodio en un rango de 25 a 300 °C<sup>129</sup>. La estabilidad del titanato sódico

resultante será mayor bajo estas condiciones térmicas que a temperatura ambiente, favoreciéndose su formación en las condiciones en que se ha realizado este estudio.

Seguidamente al tratamiento alcalino, las muestras se limpian en agua destilada y se secan a 40° C durante 24 horas. Después sigue un tratamiento térmico para que el gel pase a ser más denso y así mejorar la adhesión entre éste y el titanio. La adhesión de la capa aumenta con la temperatura, pero para temperaturas superiores a 600° C el gel cristaliza en un alto porcentaje, lo que retarda el posterior proceso de deposición de apatita sobre la superficie. El mecanismo de formación del fosfato de calcio dependerá de la migración de los iones de sodio, procedentes del hidrogel de titanato de sodio formado en la superficie del Ti c.p. después de su tratamiento con NaOH

Durante el tratamiento térmico, este hidrogel se deshidrata y se densifica para formar una capa de titanato de sodio estable y amorfo. Cuando se sumerge en SBF se hidrata otra vez y se transforma en un hidrogel de óxido de titanio hidratado, con exceso de cargas negativas, por una liberación de iones de sodio de la capa de titanato de sodio a la solución de SBF. Si el hidrogel se ha cristalizado, la liberación de estos iones va a tardar más tiempo, lo que retarda todo el proceso de nuclearización de la apatita.

La bioactividad del titanato depende de la propia estructura del hidrogel, ya que actúa como un andamio para la posterior deposición del fosfato de calcio. Si su estructura permite una rápida liberación de los iones  $\text{Na}^+$  y presenta mucha superficie específica, el proceso de bioactivación será mejor.<sup>114</sup>

Es posible aumentar la cinética de la nuclearización de apatita si no se realiza el tratamiento térmico. El hidrogel de titanato no se deshidrata, sino que queda blando y la liberación de iones de sodio se hace más fácilmente. Pero se pierde el enlace fuerte con la superficie de titanio y, entonces, la apatita no se fijará tan fuertemente y puede perderse la capa del implante. Para encontrar las condiciones óptimas entre la rapidez de formación de apatita y la fuerza del enlace se utiliza una temperatura de 600° C, que es la temperatura máxima antes que el hidrogel comience a cristalizar en un alto porcentaje.

Cuando sometemos este tratamiento térmico, la superficie de la capa en forma de hidrogel de titanato sódico se transforma en titanato sódico amorfo a una temperatura de

entre 400 a 500°C. A los 600°C obtiene la densidad idónea, y a los 700°C se adquiere una estructura cristalina<sup>131</sup>. La liberación de iones Na<sup>+</sup> de la superficie del titanato disminuye con el cambio estructural de fase amorfa a fases más cristalinas.

### **6.2.2 Formación de la capa de fosfato de calcio**

Al sumergir las muestras recubiertas de titanato en una disolución de SBF ocurren las siguientes reacciones químicas.

El paso de liberación de sodio está acompañado por un cambio de iones con H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> del SBF que resulta en un aumento del pH de la solución. El aumento del pH produce un aumento del producto de actividad iónica de la apatita, lo que resulta en la rápida deposición de la misma sobre la superficie de titanio según la reacción de equilibrio siguiente:



Con esta reacción el ratio de supersaturación con respecto a la apatita en el SBF, que ya antes de sumergir los substratos es fuertemente supersaturado, aumenta aún más. Éste es un proceso que hace que la titania hidratada induzca la nuclearización de apatita sobre la superficie del titanio. Gracias a la supersaturación, muchos núcleos de apatita se forman como bolas pequeñas por toda la superficie del Ti c.p. Una vez la nuclearización ha empezado, los núcleos crecen espontáneamente, consumiendo los iones de calcio y de fosfato que contiene el SBF.

El mecanismo inicial de formación del titanato cálcico debe ser atribuido a la interacción electrostática de los grupos Ti-OH cargados negativamente, con los cationes calcio. Como indica Takadama<sup>167</sup>, una vez sumergidas las muestras bioactivadas de titanio en el SBF se produce la pronta formación de grupos Ti-OH por el cambio de los iones Na<sup>+</sup> superficiales con los iones H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> del fluido. Estos grupos Ti-OH del metal combinan inmediatamente con los iones calcio del SBF para formar titanato cálcico. Después de un tiempo, el titanato cálcico del metal se une a los iones fosfato tanto como a los iones calcio

existentes en el fluido para formar los núcleos de apatita que crecen espontáneamente consumiendo los iones fosfato y calcio del SBF.

El depósito de los iones calcio sobre la superficie del titanio bioactivado por el tratamiento alcalino y térmico, es un prerequisite para la deposición de los iones fosfato. Debido a la interacción electrostática, los  $\text{Ca}^{2+}$  son absorbidos sustituyendo los iones alcalinos ( $\text{Na}^+$ ), cargando positivamente la superficie de las muestras, que a continuación, pueden enlazarse con los iones fosfato, cargados negativamente<sup>128</sup>.

Las condiciones termodinámicas permiten la formación del fosfato de calcio sobre el titanio a temperatura ambiente y condiciones de esterilidad.<sup>129</sup> El titanato cálcico presenta un mayor rango de actividad respecto al pH en comparación al titanato sódico. Esto favorece la formación del titanato de calcio con la ventaja de sustituir un catión univalente ( $\text{Na}^+$ ) por uno divalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de manera que este  $\text{Ca}^{2+}$  puede enlazarse también con un anión fosfato del SBF. Seguidamente más cationes calcio podrán unirse al entramado, seguidos por más enlaces con fosfatos, y con este procedimiento formar la capa de recubrimiento de fosfato de calcio. Esta aposición continua de microcapas nos permite controlar el grosor final del recubrimiento.

La proporción molar Ca/P de la capa de apatita resultante está afectada por el pH del SBF<sup>132</sup>. Un aumento indeseado del mismo provocará el precipitado de un fosfato cálcico con una proporción Ca/P baja que, junto con la ausencia de incorporación de iones  $\text{OH}^-$ , es una indicación de la formación de una apatita deficiente en calcio, y de la presencia adicional de fases amorfas de la apatita. Por lo tanto, es necesario un control minucioso del pH del SBF para obtener un fosfato de calcio con una proporción Ca/P cercana al valor estequiométrico (1,67).

Seguramente, el pH del SBF será, en el futuro, una de las variables más difíciles de controlar para industrializar este método de recubrimiento de implantes dentales, no sólo por el control de la composición en iones calcio y fosfato de la capa, sino también por evitar una indeseable precipitación de los compuestos de la solución, que conllevaría el fracaso inmediato de este proceso.

El pH y la temperatura de síntesis son los parámetros preponderantes para el control de la composición exacta de la capa de fosfato de calcio resultante. Pequeñas variaciones en la proporción Ca/P provocará la aparición de cambios en sus características químicas y mecánicas que podrían repercutir en su utilización clínica.<sup>168</sup>

Todo este proceso químico coincide con las observaciones realizadas durante el crecimiento de la capa de fosfato de calcio. Así, se puede suponer que primero se crean núcleos de cristales, que crecen rápidamente, y forman una capa homogénea. Luego, para aumentar el espesor del depósito, este proceso se repite una vez tras otra, capa sobre capa

Los estudios mediante difractogramas de rayos X sobre la capa de fosfato de calcio obtenida nos demuestra que ésta es de tipo cristalino con ausencia de fases amorfas, a las que numerosos estudios indican como responsables de los fracasos de los implantes dentales recubiertos de hidroxiapatita elaborados por el método de proyección de plasma<sup>105, 107, 108</sup>. De esta manera, el método químico de formación de implantes con capa de fosfato de calcio podría mejorar su pronóstico clínico a largo plazo.

La formación de esta capa de fosfato de calcio por aposición de diferentes microcapas permitiría determinar su grosor final controlando simplemente el tiempo de inmersión en la solución de SBF, con el fin de obtener el grosor ideal para su correcta osteointegración. Este método nos permiten obtener capas de muy pequeño grosor que, como indican diversos autores<sup>117</sup>, aumentan su adhesión al sustrato.

Clínicamente, también parecería conveniente que la capa de fosfato de calcio bioactiva que recubra implantes de titanio fuera de poco grosor (del orden de los micrómetros a nanómetros), ya que permitiría el crecimiento óseo más rápido, y el proceso de osteointegración y fijación mecánica implante-hueso sería optimizado. Esta capa podría ser útil para emplearla en aquellos casos con implantes de carga inmediata.

La capa de apatita formada en la superficie de las placas de titanio muestra gradientes en la composición desde el extremo exterior, con la titania hidratada, a través del óxido de titanio, hasta el titanio puro. Este fenómeno de gradientes conlleva a que no sólo haya un fuerte enlace químico entre la apatita y el titanio sino que exista también un uniforme gradiente de tensiones desde el hueso hasta el implante *in vivo*. Es de esperar, como sugieren otros estudios publicados<sup>169</sup> que este gradiente estructural confiera al

recubrimiento una mayor fuerza de unión al sustrato metálico, mejorándose las características mecánicas de la interfase, con la finalidad de conseguir una correcta osteointegración de los implantes con el hueso a través de la capa de apatita.

Las observaciones microscópicas también demostraron que no existía diferencia alguna entre la cinética de crecimiento de las placas con tratamiento previo de pasivado con las que no lo habían sufrido.

La utilización del microscopio de barrido ambiental (ESEM) permitió el seguimiento del crecimiento de la biocapa de fosfato de calcio desde el momento en que se activa la superficie del titanio con el tratamiento químico y térmico, hasta la inmersión en el SBF.

Este método permite la observación de las muestras en un medio húmedo, a la temperatura adecuada y sin preparación previa, de manera que después de la observación se pueden volver a sumergir en el SBF, sin interrumpirse la formación del fosfato de calcio y sin alterarse las condiciones del estudio.

La confirmación del ESEM como un sistema fiable para el seguimiento de la formación de capas de fosfato de calcio sobre sustratos de titanio, elaboradas siguiendo un método por inmersión en soluciones acuosas, permitirá su utilización en posteriores trabajos en que se desee comprobar crecimientos de superficies o celulares sobre diferentes materiales.

Otro factor importante a considerar es la conocida apetencia de las bacterias por la hidroxiapatita, que ha provocado el fracaso de numerosos implantes recubiertos con fosfato de calcio, y la facilidad de contaminación de las muestras tratadas químicamente con el Simulated Body Fluid. Este factor representa una dificultad importante tanto en la elaboración experimental de estos métodos como en la aplicación industrial de los mismos.

### 6.3 RUGOSIDAD DE LAS MUESTRAS

Desde el punto de vista clínico, es importante determinar que la capa de fosfato de calcio crezca con la misma cinética sobre toda la muestra, manteniéndose la rugosidad y evitando que se obtenga una superficie lisa al rellenarse las microporosidades propias del titanio.

Los resultados indican que el método químico utilizado en este estudio no disminuye la rugosidad superficial de las muestras.

El mantenimiento de la rugosidad en los implantes recubiertos de fosfato de calcio formados químicamente no alterará la osteointegración de los mismos. Incluso, algunos autores han indicado que una superficie de contacto del implante con el hueso más rugosa, tal y como sucede en el resultado obtenido en este estudio, favorecería la osteointegración clínica del mismo <sup>27, 28, 31</sup>.

Por otra parte, un aumento de la rugosidad del sustrato a escala micrométrica, permitiría la mejoría de la adhesión mecánica de la capa de fosfato de calcio<sup>117</sup>. Por lo tanto el método químico de recubrimiento utilizado en este trabajo nos permitirá mejorar las características mecánicas de la interfase aumentando la rugosidad original del sustrato de titanio, sin comprometer la osteointegración mecánica ya que se mantendrá la rugosidad original, y el implante recubierto no presentará una superficie excesivamente lisa.

Otro factor interesante, al aumentar la rugosidad original del sustrato de titanio en sus capas más superficiales, resulta en la formación de un gradiente de unión entre el mismo titanio, la apatita y el hueso que mejoraría las características mecánicas del implante<sup>35</sup>.

Los métodos de obtención de esta rugosidad serían los convencionales (grabado ácido, avellanado, láser...), de manera que no se requiere de una tecnología especial, favoreciendo su viabilidad económica.

El sistema para colgar las placas en el SBF utilizado, también favorece su recubrimiento uniforme y completo. Este método también puede utilizarse para recubrir

cualquier otro tipo de objeto, incluyendo los implantes dentales, de una manera sencilla y económica.

Desde el punto de vista de la industrialización de este sistema, la inmersión de los implantes de titanio en SBF representan una ventaja al permitir la formación continua y simultánea de numerosas unidades sin grandes gastos. Sin embargo, la elaboración y manipulación del SBF si que representa un inconveniente por su predisposición a precipitar sus componentes al alterar alguna de las condiciones necesarias para su utilización.

#### 6.4 MICRODUREZA

Los resultados de esta prueba no son muy significativos, pero se podría indicar que existe un aumento de dureza superficial del implante dental con capa bioactiva respecto al implante dental de titanio, debido a la mayor cristalinidad de la capa del fosfato de calcio en comparación a la superficie de óxido de titanio y titanio del implante dental sin tratamiento. Este aumento de dureza no es suficiente para que exista un desprendimiento de la capa de apatita, como se podrá comprobar seguidamente en los resultados de adhesión por el ensayo de arrancamiento. Además, si la capa fuese muy dura respecto al sustrato podría fragilizarse al ser sometida a una carga, ya que la de mayor rigidez (capa de fosfato de calcio) se fracturaría al absorber la mayoría de carga.

Clínicamente, esta diferencia de dureza entre el hueso y el titanio comercialmente puro da una gradación en las propiedades mecánicas muy beneficiosa para el comportamiento mecánico del implante.

#### 6.5 MÉTODO DE ARRANCAMIENTO (Scratch Test)

Los resultados obtenidos en la prueba de arrancamiento de la capa de fosfato nos indican que la obtenida por vía química presenta una fuerza de adhesión mayor que la obtenida por proyección de plasma.

Esta capa bioactiva de origen químico debería mejorar la fijación a largo plazo gracias al enlace químico que surge entre el Ti c.p. y la apatita, sobre todo si se compara con los implantes con depósito de apatita por medio de plasma spray, en donde el enlace entre la capa y el substrato es únicamente de tipo mecánico.

Pero la apatita mejora, sobre todo, la fijación a corto plazo. La experiencia muestra que el hueso reconoce esta capa homogénea como una sustancia propia y no se producen las reacciones inflamatorias, obteniéndose porcentajes de implante en contacto directo con hueso vivo y ordenado a tiempos muy cortos. Debido a este hecho, el proceso de remodelación del hueso empieza antes, y los tiempos de convalecencia de los pacientes disminuyen con los beneficios sociales y económicos consiguientes. Otro aspecto ventajoso que presenta la capa homogénea de apatita es que aísla las partículas de impureza que hayan podido quedar incrustadas en la superficie. De esta manera, se supone que se pueden evitar en gran medida los posibles efectos contaminantes de las partículas y que la liberación de iones disminuirá y/o desaparecerá por completo.

**7. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y ESTUDIOS  
ANEXOS**

## **7. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y ESTUDIOS ANEXOS**

Este estudio pretende ser un primer paso hacia la utilización clínica de implantes dentales recubiertos por una capa de fosfato de calcio obtenida por vía química. Naturalmente, el siguiente objetivo será determinar como se comporta la capa en diferentes cultivos celulares para posteriormente realizar estudios de implantación en animales.

Algunos estudios<sup>112</sup> indican que los implantes de titanio recubiertos con apatitas de alta cristalinidad, obtenidas por tratamiento químico y térmico, ofrecen condiciones más favorables en la diferenciación osteoblástica.

En estos momentos, se están llevando a cabo cultivos osteoblásticos en las superficies de los discos con y sin capa de apatita para ver cual es el índice de adhesión celular y las concentraciones de osteocalcina. Cuando estos ensayos estén realizados está previsto proceder a la implantación en animales durante diferentes tiempos y realizar ensayos de par de torsión para determinar el nivel de osteointegración y compararlo con otros implantes que tengan diferentes acabados superficiales (electropulidos, recubiertos de hidroxiapatita y de titanio por plasma spray...). Además, se llevarán a cabo estudios histológicos de los tejidos circundantes para determinar el comportamiento tisular y observar las características del hueso neoformado.

Igualmente, está previsto estudiar, cómo el espesor de la capa homogénea de apatita influye en sus propiedades mecánicas, la liberación de iones y la resistencia a la corrosión debido a los fluidos corporales. En principio, desde un punto de vista clínico e industrial, lo óptimo sería tener una capa fina, que pudiera obtenerse en un tiempo reducido, lo que abarataría la producción.

Otros variables de tratamiento que se pueden optimizar para una futura implantación industrial son:

- características químicas y de rugosidad del sustrato<sup>35</sup>
- tiempo en la estufa y en el horno, durante los procesos de deshidratación y de densificación del hidrogel de titanato de sodio.
- la temperatura del tratamiento térmico

- efecto del vapor de agua en el tratamiento térmico de las muestras de titanio<sup>170</sup>
- el control del pH de la disolución de SBF con el fin de mejorar la composición de la capa de fosfato de calcio
- la relación superficie de la placa / volumen del SBF, para poder tratar muchas placas a la vez ( en un recipiente grande ) de titanio.
- utilización de otras soluciones sobresaturadas en calcio y fosfato en lugar del SBF<sup>171</sup>

Hay que mencionar que resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio, indican la posibilidad de crecimiento de capas apatíticas en la superficie de la aleación Ti-6Al-4V. Además están en proceso de estudio las condiciones para el crecimiento en otras aleaciones de titanio utilizadas en Medicina, como son Ti-0.2Pd, Ti-6Al-7Nb, Ni-Ti entre las más importantes, de la misma manera que otros autores han realizado sobre aleaciones de Ti-15Mo-5Zr-3Al<sup>168</sup>

Como se ha mencionado anteriormente, la aleación Ti-6Al-4V es la que generalmente se utiliza junto con los aceros inoxidable austeníticos y las aleaciones de Cromo-Cobalto, para aplicaciones ortopédicas. La composición del Ti-6Al-4V debe ser de calidad ELI (Extra Low Interstitial) ya que los elementos intersticiales producen un inadecuado endurecimiento del material y un aumento muy importante de la fragilidad.

En principio, esta aleación se utiliza en estado de forja dentro de la región  $\alpha$ - $\beta$ , es decir se trabaja a 950°C y se somete a un recocido posterior a 700°C durante dos horas. La microestructura obtenida es la conocida como “mill annealed” (Figura 31), que es la que se recomienda también en otras aplicaciones estructurales como las aeronáuticas y astronáuticas, dado que es la que ofrece un mayor límite elástico y una mayor ductilidad. Esta microestructura está formada por granos equiaxiales de fase  $\alpha$  y placas  $\alpha$  de Widmanstätten rodeadas de fase  $\beta$ .

Sin embargo, si el material se trata térmicamente o se forja por encima de los 1050°C, la microestructura resultante es de granos gruesos formados por placas de Widmanstätten de fase  $\alpha$  empaquetadas, en una matriz de fase  $\beta$  y se conoce como la estructura de tipo cesto (Figura 32). En este caso no aparecen los granos equiaxiales de fase  $\alpha$  ya que la transformación a fase  $\beta$  es total en el calentamiento. Esta estructura proporciona

menores características de resistencia y menor ductilidad, aunque una mayor tenacidad a la fractura, una menor velocidad de propagación de grietas por fatiga, así como una mayor resistencia a la corrosión bajo tensiones. Así pues, se ha constatado la importante influencia que ejerce la microestructura del material sobre sus propiedades

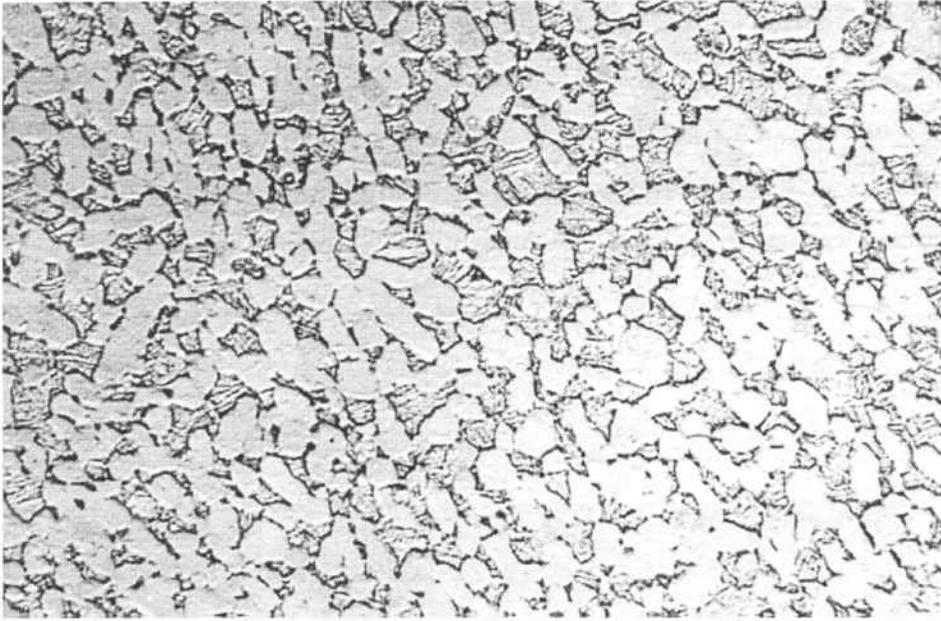


Fig. 31. Estructura mill annealed

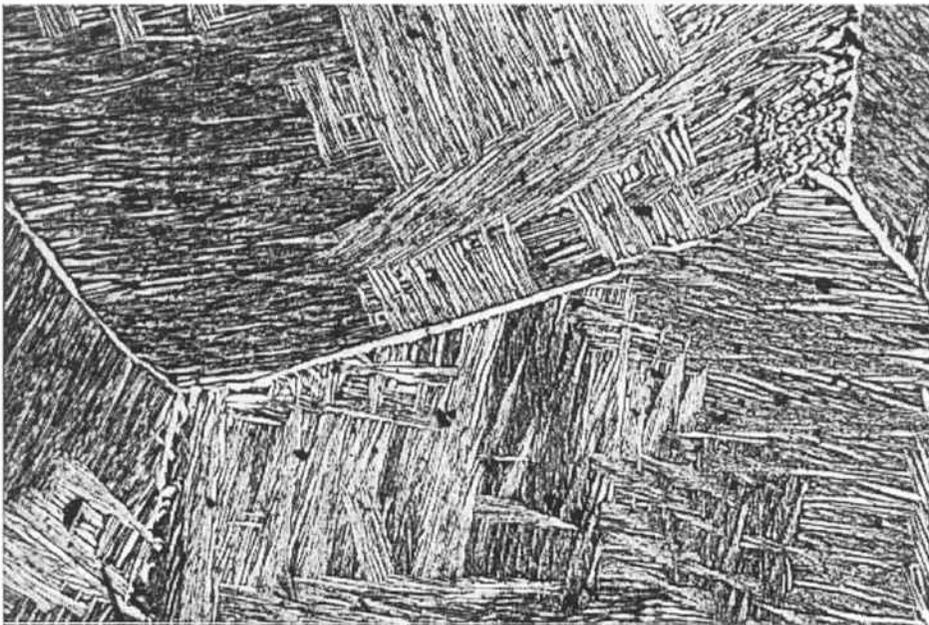


Fig. 32. Estructura Widmanstätten

En esta Tesis Doctoral se repitió el proceso de formación de la capa bioactiva en la aleación Ti6Al4V por si se podía realizar ya que en este momento en el mercado han empezado a fabricarse implante dentales de titanio grado 5 que no es más que la aleación Ti6Al4V. (Figura 33)

Al no ser titanio puro la reacción para la formación del titanato se debe hacer a una concentración superior que en el caso del titanio comercialmente puro y se debe trabajar en concentraciones de NaOH entre 1 y 8 M y durante un mayor tiempo de inmersión. Este tiempo varía según si la microestructura del material es la de recepción (mill annelaed) o bien la aleación tratada térmicamente denominada de Widmanstatten.

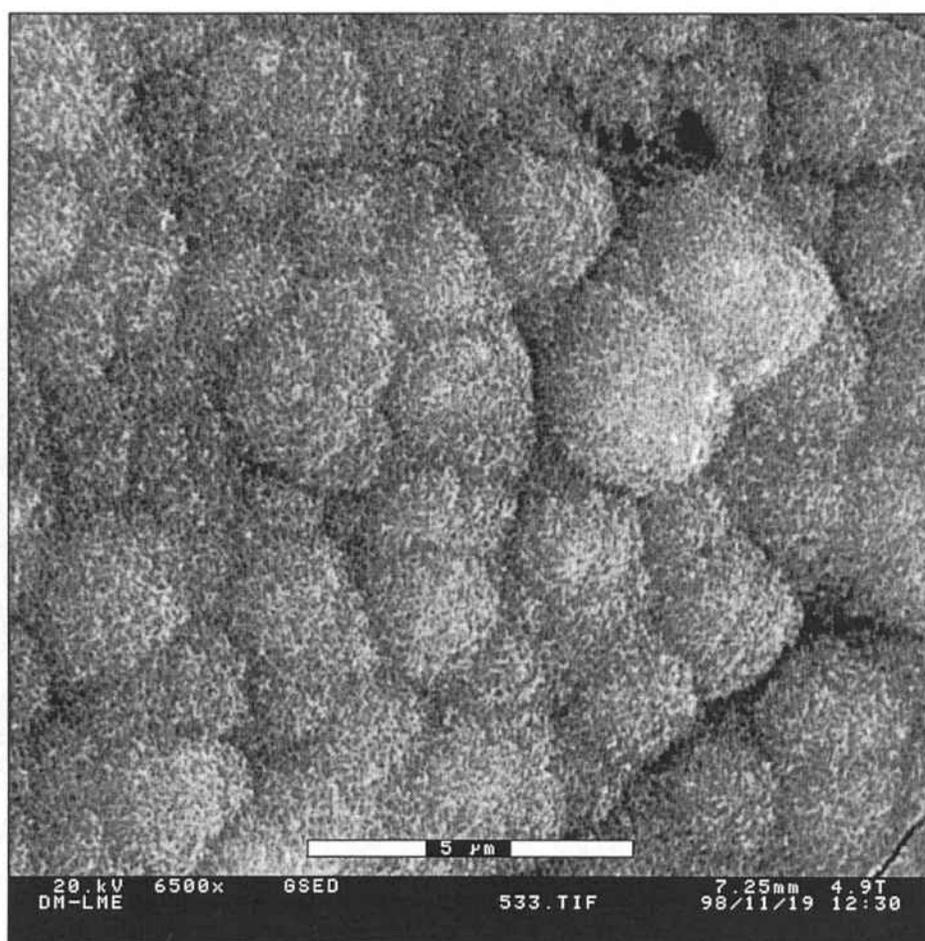


Fig. 33 Aleación de Ti6Al4V recubierta por capa de fosfato de calcio obtenida por método químico

Otros estudios proponen la utilización de este método químico para la elaboración de capas apatíticas sobre metales diferentes al titanio, como es el tantalio, ajustando las condiciones de tiempo y temperatura a las idóneas para cada caso.<sup>172</sup>

## **8. CONCLUSIONES**

## 8. CONCLUSIONES

1. El método químico utilizado en este estudio permite elaborar una capa de fosfato de calcio sobre un sustrato de titanio inmerso en una disolución acuosa.
2. El fosfato de calcio obtenido químicamente presenta una estructura cristalina con ausencia de fases amorfas o parcialmente cristalinas, y se une químicamente al sustrato de titanio, caracterizándose por una mayor estabilidad y probablemente por una menor disolución cuando se utilice como material implantológico.
3. El Microscopio de Barrido Ambiental (ESEM) nos permite caracterizar la aposición de las distintas capas de fosfato de calcio sin la necesidad de interrumpir el proceso ni alterar las condiciones del estudio.
4. El sistema de formación de la capa de fosfato de calcio por vía química permite controlar el aumento del grosor de dicha capa en función del tiempo de inmersión en la disolución acuosa.
5. El sistema de formación de la capa de fosfato de calcio por vía química no disminuye la rugosidad media de la superficie, manteniéndose la morfología superficial necesaria para su osteointegración clínica.
6. La capa de fosfato de calcio elaborada por vía química presenta una mayor adhesión al sustrato de titanio en comparación con las capas de fosfato de calcio formadas con el método de proyección de plasma.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Lavelle CL. Mucosa seal around endosseous dental implants. *J Oral Implantol*. 1981; 9: 357-71.
2. Jansen JA, van der Waerden JP, de Groot K. Epithelial reaction to percutaneous implant materials: in vitro and in vivo experiments. *J Invest Surg*. 1989; 2: 29-49.
3. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofacial Surg*. 1981; 9: 15-25.
4. Ikeda H, Yamaza T, Yoshimari M, Ohsaki Y, Ayukawa Y. Ultrastructural and immunoelectron microscopic studies of the peri-implant (Ti-6Al-4V) interface of rat maxilla. *J Periodontology*. 2000; 71: 961-73.
5. Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo. *J Biomed Mat Res*. 1990; 9: 1203-19.
6. Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM. Effect of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomed Mat Res*. 1989; 9: 1067-85.
7. McKinney RV. *Implantes dentales endoóseos*. Madrid, Mosby Publicaciones, 1993.
8. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52: 155-70.
9. Park JB, Lakes RS. *Biomaterials. An introduction*. London, Plenum Press, 1992. Cap. 1 a 7, y 14.
10. Proubasta I, Gil Mur J, Planell JA. *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Madrid, Ediciones Argón, 1997.
11. *Medical Devices. ASTM Standards. 13. 01*. Philadelphia, American Society for testing and materials, 1987.
12. Hanawa T, Asami H, Asaoka K. Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated biofluid. *J Biomed Mater Res*. 1998; 40: 530-538.
13. Helsen JA, Breme HJ. *Metals as biomaterials*. Chester, Ed Wiley, ..., Cap 1 y 2.
14. Bränemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson Å. Intraosseous anchorage of dental protheses I. Experimental Studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969; 3: 81-100.
15. Gottlander M, Albrektsson T. Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated cp titanium threaded implants in bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991; 6: 399-404.
16. Okazaki Y, Rao S, Ito Y, Tateishi T. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. *Biomaterials*. 1998; 19: 1197-215.
17. Steinemann SG. Metal implants and surface reactions. *Injury*. 1996; 27 Suppl 3: 16-22.
18. Shettlemore MG, Brundy KJ. Toxicity measurement of orthopedic implant alloy degradation products using bioluminescent bacterial assay. *J Biomed Mat Res*. 1999; 4: 395-403.
19. Assad M, Lemieux N, Rivard CH, Yahia LH. Comparative in vitro biocompatibility of nickel-titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation. *Bio Med Mat Engin*. 1999; 1: 1-12.
20. Healy KE, Ducheyne P. Hydration and preferential molecular absorption on titanium in vitro. *Biomaterials*. 1992; 8: 553-61.
21. Healy KE, Ducheyne P. The mechanisms of passive dissolution of titanium in a model physiological environment. *J Biomed Mat Res*. 1992; 3: 319-39.
22. Hanawa T, Ota M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. *Biomaterials*. 1991; 12: 767-74.

23. Ong JL, Prince CW, Lucas LC. Cellular response to well-characterized calcium phosphate coatings and titanium surfaces in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29: 165-72.
24. Klauber C, Lenz LJ, Henry PJ. Oxide thickness and surface contamination of six endosseous dental implants determined by electron spectroscopy for chemical analysis: a preliminary report. *Int J Oral Maxil Implants.* 1990; 3: 264-71.
25. Vargas E, Baier RE, Meyer AE. Reduced corrosion of CP Ti and Ti-6Al-4V alloy endosseous dental implants after glow-discharge treatment: a preliminary report. *Int J Oral Maxil Implants.* 1992; 3: 338-44.
26. Browne M, Gregson PJ. Engineering modification of titanium alloy implants. *Biomaterials.* 1994; 11: 894-8.
27. Larsson C, Emanuelsson L, Thomsen P, Ericson E, Aronsson BO, Kasemo B, Lausmaa J. Bone response to surface modified titanium implants- studies on the tissue response after 1 year to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *J Mater Sci Mater Med.* 1997; 8: 721-9.
28. Hazan R, Brener R, Oron U. Bone growth to metal implants is regulated by their surface chemical properties. *Biomaterials.* 1993; 8: 570-4.
29. Larsson C, Thomsen P, Aronson BO, Rodhal M, Lausmaa J, Kasemo B, Ericson LE. Bone response to surface-modified titanium implants: studie on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thickness. *Biomaterials.* 1996; 6: 605-16.
30. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991; 7: 889-902.
31. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Imp.* 1992; 7: 302-10.
32. Ong JL, Prince CW, Raikan GN, Lucas LC. Effect of surface topography on surface chemistry and cellular response. *Implant Dentistry.* 1996; 2: 83-8.
33. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* 1995; 29: 389-401.
34. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcified Tiss Int.* 1999; 6: 499-507.
35. Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res.* 2000; 52: 553-7.
36. Peltola T, Jolinen M, Rahiala H, Patsi M, Heikkila J, Kangasniemi I, Yli-Urpo A. Effect of ageing time of sol structure and in vitro calcium phosphate formation of sol-gel derived titania films. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51: 200-8.
37. Wennerberg A, Albrektsson B, Andersson B. An animal study of c.p. titanium screws with different surface topographies. *J Mater Sci Mater Med.* 1995; 6: 302-9.
38. Swart KM, Keller JC, Wightman JP, Draughn RA, Stanford CM, Michaels CM. Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. *J Oral Implant.* 1992; 2: 130-7.
39. Yan WQ, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. Bonding of chemically treated titanium implants to bone. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37: 267-75.
40. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32: 409-17.

41. Kononem M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mat Res.* 1992; 10: 1325-41.
42. Keller JC, Stanford CM, Wifhtman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces III. *J Biomed Mat Res.* 1994; 8: 939-46.
43. Kim DG, Shin MJ, Kim KH, Hanawa T. Surface treatments of titanium in aqueous solutions containing calcium and phosphate ions. *Biomed Mater Engn.* 1999; 9: 89-96.
44. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 6: 387-416.
45. Smith WF. *Fundamentos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales.* Madrid, Editorial McGraw-Hill, 1993.
46. Klein CP, de Bleeck-Hogervorst JM, Wolke JG, de Groot K. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. *Biomaterials.* 1990; 7: 509-12.
47. Golec TS, Krauser JT. Long term retrospective studies on hydroxyapatite coated endosteal and subperiosteal implants. *Dent Clin North Am.* 1992; 36: 39-65.
48. Jansen JA, van der Waerden JP, Wolke JG. Histological investigation of the biological behavior of different hydroxyapatite plasma-sprayed coatings in rabbits. *J Biomed Mat Res.* 1993; 5: 603-10.
49. Ricci JL, Blumenthal NC, Spivak JM, Alexander H. Evaluation of a low-temperature calcium phosphate particulate implant material: physical-chemical properties and in vivo response. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 9: 969-78.
50. Jarcho M, Kay JF, Gumare KI, Doremus RH, Drobeck HP. Tissue, cellular and subcellular events at a bone ceramic hydroxyapatite interface. *J Bioengineering.* 1977; 2: 79-92.
51. Kay JF. Calcium phosphate coatings: understanding the chemistry and biology and their effective use. *Compendium 1993 (Supl 15):* 520-25.
52. Iamoni F, Resperini G, Trisi P, Simion M. Histomorphometric analysis of a half hydroxyapatite-coated implant in humans: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 5: 729-35.
53. Kay JF. Calcium phosphate coatings: Current status and future potencia. *Dent Clin North Am.* 1992; 36: 19-26.
54. Yukna RA. Optimizing clinical success with implants: maintenance and care. *Compendium 1993 (Supl. 15):* 554-61.
55. Cook SD, Kay JF, Thomas KA, Jarcho M. Interface mechanics and histology of titanium and hydroxyapatite-coated titanium for dental implants applications. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1987; 2: 15-22.
56. Block MS, Kent JN, Kay JF. Evaluation of hydroxyapatite-coated titanium dental implants in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 1987; 45: 601-7.
57. Gottlander M, Albertsson T, Carlsson LV. A histomorphometric study of unthreated hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *Int J Maxillofac Implants.* 1992; 7: 485-90.
58. Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V, Beumer J, Moy PK, Lewis S. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; 7: 491-6.
59. Jarcho M. Retrospective análisis of hydroxyapatite development for oral implant applications. *Dent Clin North Am.* 1992; 36: 19-26.
60. Cooley DR, Van Dellen AF, Burgess JO, Wineler AS. The advantages of coated titanium implants prepared by radiofrequency sputtering from hydroxyapatite. *J Prosthet Dent.* 1992; 1: 93-100.
61. Meffer RM. Maxilla vs mandible: why use HA?. *Compendium 1993 (Supl. 15):* 565-6.
62. Meffert RM. Ceramic-coated implant systems. *Adv Dent Research.* 1999; 13: 170-2.

63. Cook SD, Bafes GC, Palafox AJ, Wolfe MW, Burgess A. Torsional stability of HA-coated and grit-blasted titanium dental implants. *J Oral Implantol.* 1992; 18: 354-8.
64. Maxian SH, Zawadsky JP, Dunn MG. Mechanical and histological evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mat Res.* 1993; 6: 717-28.
65. Dhert WJ, Klein CP, Jansen JA, van der Velde EA, Vriesde RC, Rozing PM, de Groot K. A histological and histo morphometrical investigation of fluorapatite magnesiumwhitlockite and hydroxyapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J Biomed Mat Res.* 1993; 1: 127-38.
66. Yang CY, Lin RM, Wang BC, Lee TM, Chang E, Hang YS, Chen PQ. In vitro and in vivo mechanical evaluations of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on titanium implants: the effect of coating characteristics. *J Biomed Mater Res.* 1997; 3: 335-45.
67. Gross KA, Brendt CC, Goldschlag DD, Iacono VJ. In vitro changes of the hydroxyapatite coatings. *Int J Oral Maxillofac Imp.* 1997; 5: 589-97. PROC 7-16.
68. Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Ramussen H, Hjortdal VE, Juhl GI, Pedersen CM, Hvid I, Bunger C. Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. *Clin Orthop Rel Res.* 1991; 272: 300-7.
69. Cook SD, Thomas KA, Kay JF. Experimental coating defects in hydroxyapatite-coated implants. *Clin Orthop Rel Res.* 1991; 265: 280-90.
70. Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxyapatite-coated titanium for orthopedic implant applications. *Clin North Orthop Rel Res.* 1988; 232: 225-43.
71. Thomas KA, Kay JF, Cook SD, Jarcho M. The effect of surface macrotecture and hydroxyapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials. *J Biomed Mater Res.* 1987; 21: 1395-414.
72. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings. development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on titanium substrates. *Clin Orthop.* 1987; 223: 147-70.
73. Cook SD, Thomas KA, Kay JF Jarcho M. Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic bioogic attachment system. *Clin Ortop Rel Res.* 1988; 20: 303-12.
74. Kurioka K, Umeda M, Teranabu O, Komori T. Effect of various propertie of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability. *Kobe J Med Scien.* 1999; 45: 149-63.
75. Klein CP, Patka P, van der Lubbe HB, Wolke JG, de Groot K Plasma-sprayed coatings of tetracalciumphosphate, hydroxyl-apatite and alpha-TCP on titanium alloy: an interface study. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25: 53-65.
76. Gottlander M, Albertksson T. Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991; 6: 399-404.
77. Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Pharoah M, Chipman M, Valiquette N, Carter S, de Groot K. The effect of partial coating with hydroxyapatite on bone remodeling in relation to porous-coated titanium-alloy dental implants in the dog. *J Dent Res.* 1991; 70: 1338-45. PROC T1-78.
78. Bert M. Complicaciones y fracasos en implantes osteointegrados: causas, tratamiento, prevención. Barcelona. Ed Masson, 1995.
79. Jansen JA, Wolke JG, Swann S, Van der Waerden JP, de Groot K. Application of magneton spitting for producing ceramic coatings on implant materials. *Clin Oral Impl Res.* 1993; 4: 28-34.
80. Hero H, Wie H, Jorgensen RB, Ruyter IE. Hydroxyapatite coantings in Ti produced by hot isostatic pressing. *J Biomed Mater Res.* 1994; 3: 343-8.
81. Ducheyne P, Van Raemdonck W, Heughebaert JC, Heughebaer. *J Biomed Mater Rest M.* Structural analysis of hydroxyapatite coatings on titanium. *Biomaterials.* 1986; 7: 97-103.

82. Ducheyne P, Radin S, Heughbaert M, Heughbaert JC. Calcium phosphate ceramic coatings on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum system and in vitro dissolution. *Biomaterials*. 1990; 11: 244-54.
83. Ban S, Mauro S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited phosphates in a modified simulated body fluid. *Biomaterials*. 1998; 19: 1245-53.
84. Zeng H, Lacefield WR. XPS, EDX and FTIR analysis of pulsed laser deposition calcium phosphate bioceramic coatings: the effects of various process parameters. *Biomaterials*. 2000; 21: 23-30.
85. Ball MD, Downes S, Scotchford CA, Antonov EN, Bagratashvili VN, Popov VK, Lo WJ, Grant DM, Howdle SM. Osteoblast growth on titanium foils coated with hydroxyapatite by pulsed laser ablation. *Biomaterials*. 2001; 4: 337-47.
86. de Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res*. 1987; 21: 1375-81.
87. Jansen JA, van der Waerden JP, Wolke JG. Histologic investigation of the biological behaviour of different hydroxyapatite plasma-sprayed coatings in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 1993; 27: 603-10.
88. Klein CP, Wolke JG, de Bleeck-Hogervorst JM, de Groot K. Calcium phosphate plasma-sprayed coatings and their stability: an in vivo study. *J Biomed Mater Res*. 1994; 28: 909-17.
89. Wang BC, Chang E, Lee TM, Yang CY. Changes in phases and crystallinity of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings under heat treatment: a quantitative study. *J Biomed Mater Res*. 1995; 29: 1483-92.
90. Ding SJ, Su YM, Ju Cp, Lin JH. Structure and immersion behaviour of plasma-sprayed apatite-matrix coatings. *Biomaterials*. 2001; 22: 833-45.
91. Gross KA, Berndt CC, Herman H. Amorphous phase formation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *J Biomed Mater Res*. 1998; 39: 407-14.
92. Gross KA, Berndt CC. Thermal processing of hydroxyapatite for coating production. *J Biomed Mater Res*. 1998; 39: 580-7.
93. Yang Ycm Chang E, Hwang BH, Lee SY. Biaxial residual stress states of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on titanium alloy substrate. *Biomaterials*. 2000; 21: 1327-37.
94. Albrektsson T, Sennerby L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont*. 1990; 3: 30-41.
95. Spivak JM, Ricci JL, Blumenthal NC, Alexander H. A new canine model to evaluate the biological response of intramedullary bone to implant material and surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24: 1121-49.
96. Johnson BW. HA-coated dental implants: Long-term consequences. *J Calif Dent Assoc*. 1992; 20: 33-41.
97. Filiaggi MJ, Coombs NA, Pilliar RM. Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/ Ti-6Al-4V implant system. *J Biomed Mater Res*. 1991; 25: 1211-29.
98. Lemons JE, Meffert RM, Hahn JA, Krauser JT, James RA. Hydroxyapatite coated root-form implants. Is there cause for concern?. *Dental Implantology Update*. 1993; 4: 37-42.
99. Lewandowsky JA, Johnson CM. Structural failure of osseointegrated implants at the time of restoration. A clinical report. *J Prosth Dent*. 1989; 62: 127-9.
100. Hayashi K, Inadome T, Mashima T, Sugioka Y. Comparison of bone-implant interface shear strength of solid hydroxyapatite and hydroxyapatite coated titanium implants. *J Biomed Mater Res*. 1993; 27: 557-63.
101. Denissen HW, Kalk W, de Nieuport HM, Mangano C, Maltha JC. Preparation-induced stability of bioactive apatite coatings. *Int J Prosthodont*. 1991; 4: 432-9.
102. Tufekci E, Brantley WA, Mitchell JC, Foreman DW, Georgette FS. Crystallographic characteristics of plasma-sprayed calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V. *Int J Oral Max Impl*. 1999; 14: 661-72.

103. Ashroff S, Napper SA, Hale PN, Siriwardane U, Muherjee DP. Cyclic fatigue of hydroxyapatite-coated titanium alloy implant material—effect of crystallinity. *J Long-term effects Med Implants*. 1996; 6: 143-55.
104. Mann KA, Edidin AA, Kinoshita RK, Manley MT. Mixed mode fracture characterization of hydroxylapatite–titanium alloy interface. *J Applied Biomater*. 1994; 5: 285-91.
105. Wen J, Leng Y, Chen J, Zhang C. Chemical gradient in plasma-sprayed HA coatings. *Biomaterials*. 2000; 21: 1339-43.
106. Ravaglioli A, Krajevski A, Biasini V, Martinetti R, Mangano C, Verini G. Interface between hydroxyapatite and mandibular human bone tissue. *Biomaterials*. 1992; 13: 162-7.
107. McDonald DE, Betts F, Stranick M, Doty S, Boskey AL. Physicochemical study of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implants in humans. *J Biomed Mater Res*. 2001; 54: 480-90.
108. Baltag I, Watanabe K, Kusaraki H, Taguchi N, Miyakawa O, Kobayashi M, Ito N. Long-term changes of hydroxyapatite-coated dental implants. *J Biomed Mater Res*. 2000; 53: 76-85.
109. Zheng X, Huang, Ding C. Bond strength of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti composite. *Biomaterials*. 2000; 21: 841-9.
110. Ozeki K, Yuhta T, Aoki H, Nishimura I, Fukui Y. Crystal chemistry of hydroxyapatite deposited on titanium by sputtering technique. *BioMed Mater Engin*. 2000; 10: 221-7.
111. Ding SJ, Ju CP, Lin JH. Characterization of hydroxyapatite and titanium coatings sputtered on Ti-6Al-4V substrate. *J Biomed Mater Res*. 1999; 44: 266-79.
112. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24: 721-34.
113. Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52: 652-61.
114. Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H<sub>2</sub>O(2)-, and NaOH-treated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2001; 54: 172-8.
115. Yan WQ, Nakamura T, Kawanabe K, Nishiguchi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials*. 1997; 18: 1185-90.
116. Rodríguez Clemente R, Murtra J, Garelik S, Combescure C, Berjoan C, Armas B, Uribarri A, Gay C. Características del recubrimiento con hidroxiapatita mediante la técnica de precipitación a partir de solución, del implante osteointegrado universal. *Archivos de odontoestomatología*. 1997; 13: 210-15.
117. Piveteau LD, Gasser B, Schlapbach L. Evaluating mechanical adhesion of sol-gel titanium dioxide coatings containing calcium phosphate for metal implant application. *Biomaterials*. 2000; 21: 2193-201.
118. Kim HM, Miyagi F, Kokubo T, Nakamura T. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate. *J Biomed Mater Res*. 1997; 38: 121-7.
119. Serro AP, Fernandes AC, Saramago P, Lima J, Barbosa MA. Apatite deposition on titanium surfaces- the role of albumin adsorption. *Biomaterials*. 1997; 18: 963-8.
120. Hanawa T, Kon M, Ukai H, Murakami K, Miyamoto Y. Surface modifications of titanium in calcium-ion-containing solutions. *J Biomed Mater Res*. 1997; 43: 273-8.
121. Li P, Ye X, Kangasniemi I, de Blicq-Hogervorst JM, Klein CP, de Groot K. In vivo calcium phosphate formation studied by sol-gel prepared silica. *J Biomed Mater Res*. 1995; 29: 325-8.
122. Wen HB, De Wijn JR, Cui FZ, de Groot. Preparation of calcium phosphate coatings on titanium implant materials by simple chemistry. *J Biomed Mater Res*. 1998; 41: 227-36.
123. Ohtsuki C, Iida H, Hayakasa S, Osaka A. Bioactivity of titanium treated with hydrogen peroxide solutions containing metal chlorides. *J Biomed Mater Res*. 1997; 35: 39-47.

124. Grassmann O, Heimann RB. Compositional and microstructural changes of engineered plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrates during incubation in protein-free simulated body fluid. *J Biomed Mater Res.* 2000; 53: 685-93.
125. Wen HB, De Wijn JR, Liu Q, de Groot. A simple method to prepare calcium phosphate coatings on Ti6Al4V. *J Mater Sci Mater Med.* 1997; 8: 765-70.
126. Barrere F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Goot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of actacalcium phosphate and inhibition by  $Mg^{2+}$  and  $HCO_3^-$ . *Bone.* 1999; 25: 2.
127. Li P, Ducheyne P. Quasi-biological apatite film induced by titanium in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41: 341-8.
128. Yang BC, Weng J, Li XD, Zhang XD. The order of calcium and phosphate ion deposition on chemical treated titanium surfaces soaked in aqueous solution. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47: 213-9.
129. Andrade MC, Figueras MR, Ogasawara T. Nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium pretreated in NaOH solution: experiments and thermodynamic explanation. *J Biomed Mater Res.* 1999; 46: 441-6.
130. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, Nakamura T. Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment. *J Biomed Mater Res.* 1999; 45: 100-7.
131. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 1997; 8: 341-7.
132. Li J, Liao H, Sjöström M. Characterization of calcium phosphates precipitated from simulated body fluid of different buffering capacities. *Biomaterials.* 1997; 18: 743-7.
133. Leitao E, Barbosa MA, de Groot K. Influence of substrate material and surface finishing on the morphology of the calcium-phosphate coatings. *J Biomed Mater Res.* 1997; 38: 85-90.
134. Kim HM, Kim Y, Park SJ, Rey C, Lee HM, Glimcher MJ, Ko JS. The film of low-crystalline phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials.* 2000; 21: 11-29-34.
135. Hidalgo VM, Berardinelli EM, Blesa MA, Apella MC. Adsorción y adhesión de streptococcus mutans sobre hidroxiapatita in vitro. *Dentum.* 1999; 2: 9-13.
136. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealy PF. Effect of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Biomaterials.* 1999; 20: 573-88.
137. Rams TE, Roberts TW, Feik D, Molzan AK, Slots J. Clinical and microbiological findings on newly inserted hydroxyapatite-coated and pure titanium human dental implants. *Clin Oral Impl Research.* 1991; 2: 121-7.
138. Palmisano DA, Mayo JA, Block MS, Lancaster DM. Subgingival bacteria associated with hydroxyapatite-coated dental implant morphotypes and trypsin-like enzyme activity. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991; 6: 313-8.
139. Ong JL, Chan DC. Hydroxyapatite and their use as coating in dental implants: a review. *Critical Reviews Biomed Engineering.* 2000; 28: 667-707.
140. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials.* 1991; 12: 155-63.
141. Neo M, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, Kasai R, Kokubo T, Yamamuro T. Ultrastructural study of the A-W GC-bone interface after long-term implantation in rat and human bone. *J Biomed Mater Research.* 1994; 28: 365-72.
142. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi Y, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Research.* 1990; 24: 721-34.
143. Filgueiras MR, Torre GR, Hench LL. Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions. *J Biomed Mater Research.* 1993; 27: 1485-93.
144. Ohtsuki C, Kushitani H, Kokubo T, Kotani S, Yamamuro T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. *J Biomed Mater Research.* 1991; 25: 1363-70.

145. Kokubo T, Ito S, Huang Z, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic surfaces A-W. *J Biomed Mater Research*. 1990; 24: 331-43.
146. Yoshida K, Kamada K, Sato K, Farada R, Baba K, Astuta M. The sol-gel derived silica coatings on dental pure titanium. *J Biomed Mater Research*. 1999; 48: 778-85.
147. Gómez-Vega JM, Saiz E, Tomsia AP, Marshall GW, Marshall SJ. Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass particles on Ti-based implants. 1. Processing. *Biomaterials*.
148. Schrooten J, Van Oosterwyck H, Vander Sloten J, Helsen JA. Adhesion of new bioactive glass coatings. *J Biomed Mater Research*. 1999; 44: 243-52.
149. Schrooten J, Helsen JA. Adhesion of bioactive glass coatings to Ti6Al4V oral implant. *Biomaterials*. 2000; 21: 1461-9.
150. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Process of calcification on artificial material. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 2000; 90 Suppl 3: 86-91.
151. Takatsuka K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Bone-bonding behavior of titanium alloy evaluated mechanically with detaching failure load. *J Biomed Mater Research*. 1995; 29: 157-63.
152. Weinlaender M. Bone growth around dental implants. *Dent Clin North Am*. 1991; 35: 585-601.
153. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Prótesis tejido integradas. La oseointegración en la odontología clínica. Berlín. Quintessence Books, 1997.
154. Branemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindstrom BO, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental protheses I. Experimental Studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3: 81-100.
155. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Branemark PL. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop Scand*. 1986; 57: 285-9.
156. Bert M. Implantes osteointegrados. Barcelona. Ed Masson. 1994.
157. Martínez Vázquez de Parga JA, Cañada Medinazcoitia L, del Río Hisghsmith J. Sistema de comprobación de la osteointegración mediante la radiografía. *Revista Europea de Odontostomatología*. 2000; 12; 297-304.
158. Glossary of terms. *J Oral Implantsol*. 1986; 12: 284-95.
159. Weiss CM. Tissue integration of dental endosseous implants: Description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration systems. *J Oral Implant*. 1986; 12: 169-214.
160. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop*. 1981; 157: 259-78.
161. Piatelli A, Trisi P, Emanuelli M. Bone reactions to hydroxyapatite-coated dental implants in humans: Histologic study using SEM, Light Microscopy, and Laser scanning microscopy. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993; 8: 69-74
162. De Lange GL, De Putter C, De Wijs FL. Histologic and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. *J Biomed Mater Research*. 1990; 24: 829-45.
163. Gammage DD, Bowman AE, Meffert RM, Cassingham RJ, Davenport EA. A histologic and scanning electron micrographic comparison of the osseous interface in loaded IMZ and Integral implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990; 10: 125-36.
164. Salonen MA, Oikarinen K, Virtanen K, Pernu H. Failures in the osseointegration of endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Imp*. 1993; 8: 92-7.
165. American Standard for Testing of Materials. vol. 13.01 "Medical devices : Emergency Medical Services". F67. pp. 8-9 Standard Specification for unalloyed titanium for surgical implant applications
166. Kokubo T, Miyaji F, KimHM, Nakamura T. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. *J. Am. Ceram. Soc*. 1996; 79: 1127-29.