

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN DEL CONTENIDO EN TEOS EN UNA RED VITREA DE ALCOXISILANOS.

OBTENCIÓN DE RECUBRIMIENTOS BIOACTIVOS

PROYECTO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y APLICACIONES DE LOS MATERIALES CERÁMICOS

UNIVERSIDAD JAUME I

Autor: Romero Gavilán, F. Javier

Tutores: Mestre Beltrán, Sergio – Izquierdo Escrig, Raúl

Curso 2013/2014



ÍNDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN TEÓRICA Y OBJETIVOS

1.1 BIOMATERIALES	6
1.2 IMPLANTES DENTALES	7
1.2.1 LA ESTRUCTURA OSEA	7
1.2.2 IMPLANTES DE TITANIO	8
1.2.3 LA OSTEOINTEGRACIÓN	11
1.3 TRATAMIENTOS SUPERFICIALES EN IMPLANTES DE Ti	12
1.3.1 MODIFICACIÓN MORFOLÓGICA	12
1.3.2 MODIFICACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	14
1.3.3 MODIFICACIÓN BIOQUÍMICA	15
1.4 RECUBRIMIENTOS SOL-GEL DE BASE SILICIO	17
1.4.1 INTRODUCCIÓN	17
1.4.2 ETAPAS PROCESO SOL-GEL	17
1.4.3 RECUBRIMIENTO SOL-GEL SOBRE METAL	22
1.4.4 RECUBRIMIENTO SOL-GEL HÍBRIDO PARA APLICACIONES MÉDICAS	23
1.5 OBJETIVOS	25

CAPITULO 2: MATERIALES, METODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.1 INTRODUCCIÓN	28
2.2 SERIE DE MATERIALES	28
2.3 SINTESIS DEL SOL-GEL	29
2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	30
2.5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES	32

CAPITULO 3: DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

3. 1 SINTESIS DE LA SERIE DE RECUBRIMIENTOS SOL-GEL DE BASE SILICIO CON DISTINTO CARÁCTER INORGÁNICO	44
---	-----------

3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	45
3.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL ATOMO DE SILICIO (Si-RMN)	45
3.2.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	48
3.3 CARACTERIZACIÓN TERMICA	52
3.3.1 TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)	52
3.3.2 CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)	53
3.4 PROPIEDADES SUPERFICIALES: ÁNGULO DE CONTACTO	56
3.5 ENSAYOS DE ESTABILIDAD	58
3.5.1 DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA	58
3.5.2 ENSAYOS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA	60
3.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	72
3.6.1 PERFILOMETRÍA MECÁNICA	72
3.6.2 MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)	74
CAPITULO 4: CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	86

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN TEÓRICA Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN TEÓRICA Y OBJETIVOS

1.1 BIOMATERIALES

Los biomateriales se definen desde un punto de vista amplio, como materiales diseñados para intervenir en un sistema biológico con el objetivo de evaluar, tratar o reemplazar algún tejido o función del cuerpo. De esta forma, estos materiales pueden ser destinados a la fabricación de elementos para su aplicación en seres vivos; por lo que una de sus principales características es que deben ser biocompatibles. Además, se pueden dividir en bioinertes (cuando su influencia en el sistema biológico es nula o muy pequeña) y en bioactivos (aquellos que interactúan con el organismo). Estos últimos a su vez, pueden ser de origen natural o de origen sintético. Por otra parte en función de la naturaleza del biomaterial, estos pueden ser clasificados como cerámicos, metálicos, poliméricos o como combinaciones de estos tres. Finalmente, dentro de esta amplia familia, el desarrollo de biomateriales que produzcan una respuesta biológica específica en el cuerpo es un área de trabajo importante de investigación científica, que permite dividir los biomateriales según la función, órgano o tejido biológico sobre el que van a actuar (hígado, cartílago o como en el caso hacia el que va encaminado este trabajo, hueso). Además actualmente hay un gran interés en la cicatrización y regeneración de tejidos como por ejemplo el óseo.

En las últimas décadas se ha logrado un gran avance en el campo de la medicina y, de modo más específico, en el campo de los biomateriales. Así, actualmente los avances tecnológicos han permitido alcanzar un alto nivel de calidad en la elaboración y selección de los biomateriales más adecuados para cada aplicación. Esto ha coincidido con un incremento en la demanda de estos materiales debido al envejecimiento de la población, que supone un aumento de la necesidad de reemplazar tejidos o funciones del cuerpo que no se encuentran en buen estado como consecuencia de la edad, y a los avances en términos de biocompatibilidad que están directamente relacionados con un bajo riesgo de rechazo [1].

Cuando los implantes van destinados a personas jóvenes, el tiempo de vida del implante es también una cuestión importante. Así, en ocasiones la corrosión y la degradación son vistos como fenómenos perjudiciales, sobre todo cuando estos procesos conllevan la liberación de sustancias que intervengan negativamente en los procesos biológicos o que, directamente, sean tóxicas [2]. Sin embargo, hay otros casos en los que se busca que el biomaterial se degrade de forma controlada. Por ejemplo, con el objetivo de que durante la degradación se liberen de modo regulado especies iónicas o moleculares específicas, estimulando la regeneración de tejidos o, también que el tejido que se está regenerando desarrolle su funcionalidad biológica normal, evitando atrofias debidas a que parte de esa funcionalidad se ha derivado al implante permanente circundante, algo habitual en el caso de tejidos óseos; incluso se puede buscar que el implante se reabsorba para que así no sea necesaria una segunda intervención para que éste sea extraído [2-3].

Uno de los usos habituales de los biomateriales es servir como un andamio a través del cual se produce la regeneración, el desarrollo de la estructura celular. Por tanto, para lograr obtener materiales con propiedades cada vez mejores, se requiere un conocimiento profundo de todo lo que envuelve a las células que van a entrar en juego, tanto en los propios procesos de desarrollo celular como en las interacciones entre las células y los biomateriales.

1.2 IMPLANTES DENTALES

1.2.1 LA ESTRUCTURA DENTAL

Dentro del grupo de biomateriales que están destinados a actuar en el tejido óseo, uno de los campos son los implantes dentales.

Un diente tiene que soportar multitud de procesos físicos y químicos; por ejemplo, están sometidos a fuerzas de compresión, esfuerzos de abrasión, al ataque químico de los alimentos o de productos del metabolismo.

Los dientes están compuestos de diferentes partes como se puede ver en la figura 1.

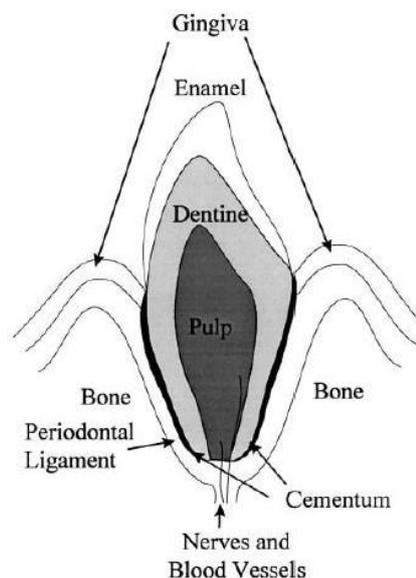


Figura 1. Estructura interna de un diente [2].

En primer lugar, se encuentra una capa externa, el esmalte, que protege el interior del diente. Esta capa está compuesta en un 96% por una material cerámico: una estructura cristalina inorgánica formada por carbonato de hidroxapatita de calcio ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), un 3% de agua y un 1% de materia orgánica [4]. La capa subyacente al esmalte es la dentina, que actúa como soporte y da flexibilidad al esmalte. Presenta una estructura más porosa que el esmalte y su composición difiere de la capa anterior,

ya que contiene concentraciones considerablemente más altas de material orgánico, así como iones F^- y Mg^{2+} . En general la composición de la dentina se asemeja a la del hueso, ya que está formada aproximadamente por un 21% de fase orgánica (principalmente colágeno) y por hidroxiapatita carbonatada como fase inorgánica.

La región más interna del diente se conoce como la pulpa. La región exterior de la pulpa contiene los cuerpos celulares odontoblásticos. Debajo de esta, hay una zona relativamente libre de células, que contiene terminaciones nerviosas sensoriales y capilares.

El diente está anclado al hueso en su raíz por medio del ligamento periodontal. La composición del hueso es de alrededor de 50% de minerales y 50% de materia orgánica y agua. La pared exterior del hueso se denomina hueso compacto, mientras que el centro contiene el tejido blando de la médula ósea, a esta parte se le denomina hueso trabecular.

A diferencia del esmalte y la dentina, los tejidos óseos (el hueso propiamente dicho, así como la pulpa) están en continuo crecimiento y remodelación durante toda la vida. Hay dos tipos de células implicadas en este proceso: los osteoblastos son responsables de la formación de hueso, mientras que los osteoclastos están implicados en el proceso de reabsorción ósea.

Sea como sea, a la vista de lo anterior, se puede afirmar que un porcentaje significativo de la estructura del diente, así como del hueso circundante al que va anclado, corresponde a los componentes de tipo inorgánico, compuestos de fosfato de calcio, principalmente en forma de hidroxiapatita pertenecientes a la familia de materiales cerámicos [5].

1.2.2 IMPLANTES DE TITANIO

Los implantes se utilizan comúnmente en la cirugía dental para la restauración de dientes. Estos se pueden asimilar a raíces artificiales cuyo objetivo es sustituir piezas dentales perdidas y que pueden integrarse con el resto de tejidos de boca.

Respecto a la naturaleza de estos implantes, el titanio y sus aleaciones se han utilizado ampliamente debido a sus excelentes propiedades mecánicas, bajo peso específico, alta resistencia a la corrosión y elevada biocompatibilidad [6-9].

El titanio es un material que se pasiva al estar expuesto al oxígeno, de modo que se forma en su superficie una capa de óxido (TiO_2) de modo espontáneo; esta capa protectora proporciona al implante resistencia a la corrosión y protege al metal subyacente. Sin embargo, el TiO_2 es bastante liso y no puede unirse directamente al hueso y por lo tanto la osteointegración a través de la capa de óxido se convierte en un proceso excesivamente largo [10-11].

Además, aunque esta capa de óxido protectora es bastante inerte, se han realizado estudios para investigar la superficie de implantes de titanio comerciales fallidos; detectando que la superficie no había osteointegrado y que la capa de óxido de titanio

sobre el implante era muy delgada o inexistente. Se ha postulado que este fenómeno fue consecuencia de un conjunto de reacciones de oxidación-reducción que provocaron la disolución de la capa protectora de TiO_2 , lo que supuso la difusión de iones en los tejidos circundantes al implante, con un consecuente fallo del implante [12].

La configuración que más se emplea y conoce, en la fabricación de implantes dentales se basa en el implante que, en 1952, desarrolló Brånemark y que se implantó por primera vez en un paciente en 1965. Este tipo de implantes, de titanio, tiene una geometría cilíndrica con una rosca de tornillo en el exterior y una segunda en el interior. Una vez que el implante se ha atornillado quirúrgicamente en el hueso mediante la rosca externa, una cubierta se atornilla en la rosca interna, protegiendo el implante durante la cicatrización. Este proceso suele tardar en completarse entre 3 y 6 meses. Transcurrido este tiempo, se retira la cubierta roscada y se incorpora un soporte, también de titanio. Este soporte servirá a continuación para la fijación definitiva de la corona dental [2]. En la figura 2 es posible visualizar el esquema de un implante atornillado en el hueso.

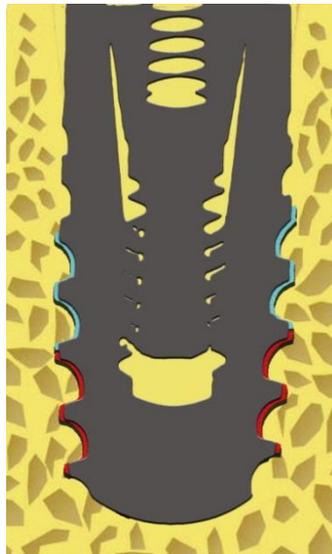


Figura 2. Esquema de un tornillo de titanio implantado en el hueso [13].

En una publicación del 2007 constatan que en las últimas décadas, el número de intervenciones con implantes dentales ha aumentado de manera constante en todo el mundo, alcanzando cerca de un millón de implantes dentales por año [14].

El éxito clínico de estos implantes está relacionado con su osteointegración temprana, por esta razón es tan importante la investigación en técnicas que permitan acelerar dicho proceso. La geometría y rugosidad de su superficie son claves para lograr el éxito en estas intervenciones. Del mismo modo, este éxito se relaciona directamente con las técnicas quirúrgicas, de forma que el buen desarrollo de éstas es fundamental para conseguir que el implante no falle [7].

Pero, más aún, los implantes deben ser diseñados no sólo para evitar (o, al menos, minimizar), cualquier tipo de fallo, sino también para promover el proceso de corrosión y, si es posible, reducir el tiempo requerido para ello.

Así, uno de los retos en la implantología es alcanzar y mantener la osteointegración. Además es importante conseguir unión epitelial del tejido gingival con el implante, ya que la unión íntima del tejido gingival con el cuello de los implantes dentales puede prevenir las colonizaciones de bacterias que conducen a la periimplantitis, mientras que la vinculación directa de hueso puede garantizar un anclaje biomecánico de la raíz dental artificial [15].

Al analizar qué ocurre al implantar una prótesis dental y qué interacciones se desarrollan entre el implante y el organismo, hasta que integrado, se pueden diferenciar una serie de etapas o procesos distintos.

Así, hay dos tipos de respuesta después de la implantación. El primer tipo implica la formación de un tejido fibroso blando alrededor del implante que no asegura la fijación biomecánica adecuada y conduce al fracaso clínico del implante dental. El segundo tipo de respuesta del hueso está relacionado con el contacto directo hueso-implante, sin la presencia del tejido fibroso antes mencionado en dicha interfase. Esto es lo que se conoce como osteointegración [14].

Durante la cirugía se realiza un daño en el tejido óseo, que va a ocasionar una zona necrótica entorno al trauma producido. La viabilidad del implante en esta etapa está relacionada directamente con la capacidad del hueso para recuperarse y que su respuesta no sea la formación de tejido fibroso.

Una vez realizada la operación, la interacción entre el implante y la sangre conduce a la adsorción de proteínas, como la fibronectina y la vitronectina, en la superficie del material. Este proceso depende de las propiedades superficiales del implante y se produce a través de una compleja serie de etapas de adsorción y de desplazamiento conocidas como el efecto Vroman [17]. En este sentido, diferentes estudios demuestran que una superficie hidrófila y rugosa favorece este efecto, consiguiendo una mayor osteointegración [5, 15, 17, 18]. Al evaluar la regeneración ósea obtenida con implantes estándar e implantes tratados superficialmente para mejorar su rugosidad, se observa un mayor contacto implante-hueso y una mayor deposición de hueso en las primeras etapas en aquellas superficies tratadas para ser más rugosas [18].

Tras la absorción de proteínas, que es clave para la adhesión celular en la superficie del implante, se observa un proceso de adhesión de plaquetas y de formación de coágulos en los vasos sanguíneos dañados.

Tras esta etapa, varias células comienzan a interactuar con la superficie cicatrizando y curando los tejidos dañados. Esta reparación supone un proceso de sustitución progresivo al ocurrir de modo simultáneo la reabsorción del tejido óseo en el que se ha producido necrosis y la formación de hueso nuevo generado por la presencia de osteoblastos [2].

Aquí juegan un papel muy importante las MSCs (células mesenquimales no diferenciadas), células madre derivadas de tejido somático que pueden diferenciarse en hueso, cartílago, grasa y piel. Estas células se caracterizan por no estar especializadas, por ser capaces de renovarse a través de división celular y por tener la capacidad de convertirse en células de tejido o de órganos específicos. Así, bajo unas

condiciones y unos indicadores adecuados estas células no diferenciadas tienen la capacidad de convertirse en osteoblastos capaces, a su vez, de regenerar el tejido óseo. Además las MSCs están presentes en muchos tejidos y en la sangre en bajas concentraciones [5, 15, 18].

Finalizada esta etapa y habiéndose producido la recuperación de esa zona, se observa un contacto íntimo entre el implante y el hueso; esto, como ya se ha expuesto anteriormente, resulta clave para el proceso de osteointegración ulterior.

Así, el paso siguiente a la recuperación de la zona, del trauma sufrido como consecuencia de la intervención quirúrgica, es el inicio del proceso de osteointegración que supone la integración del implante en el sistema óseo. El éxito de ese proceso se va a basar en lograr la atracción de células MSCs a la zona afectada que reciban las señales adecuadas para su diferenciación en células capaces de regenerar el tejido óseo, es decir, para su transformación en osteoblastos y que estas puedan adherirse, diferenciarse y mineralizar.

1.2.3 LA OSTEINTEGRACIÓN

Como ya se ha explicado, el éxito clínico a largo plazo de los implantes dentales está relacionado con su osteointegración temprana, considerando como osteointegración la definición acuñada en 1951 por el Profesor Per-Ingvar Brånemark en sus estudios: *la conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado y la superficie del implante sometido a carga funcional*.

La primera etapa en la osteointegración de los implantes dentales se denomina estabilidad primaria y está relacionada con el anclaje mecánico, el diseño de los implantes y la estructura ósea [14, 19]. Esta sujeción inicial disminuye con el tiempo en el beneficio del anclaje secundario, que se caracteriza por una unión biológica en la interfaz entre los tejidos óseos y la superficie del implante.

En el paso de una de estas etapas a la siguiente se observa una disminución de la estabilidad del implante; para superarla es importante acelerar el proceso y lograr una osteointegración temprana. Por esta razón resulta interesante el estudio de la mejora de implantes con objeto de lograr la aceleración de este proceso.

Muchos estudios han tratado de mejorar la osteointegración de los implantes realizando modificaciones de su superficie. El objetivo es obtener implantes metálicos con una superficie adecuada para la adsorción de proteínas, la adherencia y la diferenciación de las células y la integración del tejido. Esta adecuada respuesta biológica está relacionada con la composición química, la hidrofilia y la rugosidad de las superficies de los implantes [2, 5, 15, 18].

Con el fin de mejorar este último parámetro se han desarrollado varios métodos que tratan de definir una adecuada superficie rugosa y, así, mejorar la osteointegración de los implantes dentales de titanio. Las técnicas empleadas van desde la pulverización de plasma de titanio, el granallado con partículas cerámicas, el grabado ácido y la anodización [6, 14], así como la realización de distintos tipos de recubrimientos. Estas técnicas serán explicadas en el siguiente apartado.

1.3 TRATAMIENTOS SUPERFICIALES EN IMPLANTES DE Ti

Los implantes dentales de titanio pueden fallar como consecuencia de varios factores como son la insuficiente osteointegración temprana, la infección bacteriana, el trauma quirúrgico, una sobrecarga prematura, micro-movimientos causados por el diseño inadecuado de la prótesis, una colocación quirúrgica inadecuada y que el hueso que rodea al implante sea insuficiente o esté dañado y/o no sea lo suficientemente fuerte [6, 15, 20]. Durante la última década, se han desarrollado distintas técnicas para la mejora de las propiedades superficiales del titanio en la fabricación de implantes de forma que se favorezca la osteointegración, se consiga una cicatrización en un menor tiempo, permitiendo que el paciente pueda regresar más rápidamente a su vida normal, se logre un mayor contacto hueso-implante y se incremente la longevidad de los implantes de titanio. En definitiva, los esfuerzos van encaminados a incrementar las prestaciones de los implantes y a reducir el tiempo de los procesos biológicos en que los implantes tienen una presencia activa.

La modificación superficial de estos implantes se puede realizar de modo morfológico, físico-químico o bioquímico:

1.3.1 MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS

Mediante la modificación morfológica de la superficie del implante se logra mejorar la adhesión de los osteoblastos, la diferenciación, la proliferación y la mineralización [6].

Para ello se recurre a métodos mecánicos como la pulverización de plasma, la proyección de partículas, el micromecanizado, el lijado y el pulido. Por otro lado, se puede recurrir a métodos químicos como son el ataque ácido y la anodización.

Pulverización de plasma de titanio (TPS):

La pulverización de plasma de titanio (TPS) consiste en la proyección de partículas de hidruro de titanio con ayuda de un arco de plasma de un gas noble a alta temperatura, de modo que el metal precursor se descompone en el chorro y es lanzado contra la superficie del implante, quedando soldado a ésta. Se forma una capa de 30 μm de espesor con una rugosidad de 7 μm [14].

Con esta técnica se logra aumentar la rugosidad de la superficie, lo que favorece la regeneración del tejido óseo. Sin embargo, hay estudios que demuestran que pequeñas partículas de titanio pueden separarse del implante por la fuerza de fricción entre el recubrimiento y el hueso, de modo que estas partículas pasan al organismo y pueden, incluso, liberar iones nocivos [8, 21].

Proyección de partículas cerámicas:

Otra técnica para aumentar la rugosidad superficial del implante es la proyección de partículas cerámicas duras sobre éste. Estas partículas se proyectan a través de una boquilla a alta velocidad con la ayuda de aire comprimido. Se pueden conseguir diferentes grados de rugosidad en la superficie del implante jugando con el tamaño del polvo cerámico. Puesto que algunas de las partículas pueden adherirse al metal y permanecer en él incluso después de su limpieza por ultrasonidos, ataque ácido y su esterilización [14, 22], este material debe ser químicamente estable, biocompatible y no debe suponer un obstáculo en el proceso de osteointegración. Entre las partículas cerámicas utilizadas se encuentran la alúmina, el óxido de titanio y el fosfato cálcico.

Cuando, la presencia de estas partículas supone una heterogeneidad química, se observa una disminución de la resistencia a la corrosión del titanio; como en el caso de la alúmina, que además resiste la limpieza con ácido [22].

Por otro lado, el uso de óxido de titanio en el granallado de implantes dentales mediante esta técnica muestra una mejora significativa en el contacto entre el hueso y el implante [14]. Además, hay estudios que revelan que con esta técnica se obtienen altas tasas de éxito clínico de los implantes, incluso a largo plazo [23].

Otra opción es el uso de fosfatos de calcio, ya sea en forma de hidroxiapatita o fosfatos tricálcicos, puesto que son materiales biocompatibles, osteoinductores que aumentan la rugosidad del titanio y pueden ser reabsorbidos por el organismo.

Grabado con ácido:

También es posible mejorar la textura superficial de la prótesis con métodos químicos como es el grabado con ácido. Para ello se utilizan ácidos fuertes como son el HCl, H₂SO₄, HNO₃ y el HF, el método consiste en la inmersión de los implantes durante varios minutos en el ácido a temperaturas por encima de 100°C [14]. De esta forma se forma una superficie microporosa homogénea [24] que da lugar a una mejora del proceso de osteointegración [25]. Esta mejora se debe a un aumento de la humectabilidad de la superficie, una mejor adhesión de las células y un mayor contacto hueso-implante. Además se ha demostrado que con esta técnica se logra la formación de hueso directamente sobre el implante [26].

En el caso concreto del uso del ácido fluorhídrico (HF), los microporos se generan por la reacción del ácido con el titanio formando como producto la especie soluble TiF₄. Se ha comprobado que los iones fluoruro pueden quedar en el implante activando la superficie y favoreciendo el proceso de osteointegración [27]. Sin embargo, esta heterogeneidad química empobrece las propiedades del titanio y debilita el implante.

Anodización:

Otra técnica basada en métodos químicos para lograr mejorar la rugosidad de los implantes dentales de titanio es la anodización potencioestática o galvanostática del metal con densidades de corriente de 200 A/m² y potenciales de 100V utilizando como electrolito disoluciones de ácidos fuertes como el H₂SO₄, el HNO₃, el H₃PO₄ y el HF. Con esto se logra la disolución del óxido por donde pasa la corriente por la presencia del ácido, que se deposita en las zonas contrarias, aumentando el espesor de la capa

en estos puntos, de modo que va aumentando la rugosidad en la superficie [14]. Mediante esta técnica se pueden llegar a obtener óxidos a escala nanométrica jugando con las condiciones de trabajo, es decir, con el voltaje, el tiempo y el tipo de electrolito [15].

Tras realizar el tratamiento a los implante se observa una mejor respuesta del hueso que conlleva un aumento del éxito clínico [15].

1.3.2 MODIFICACIONES FÍSICO-QUÍMICAS

Las propiedades físico-químicas de los tornillos dentales pueden modificarse para así controlar características que influyen en que el implante tenga éxito.

Una de las formas de lograr esto es la realización de recubrimientos con fosfato de calcio, principalmente en forma de hidroxiapatita. Este material tiene una excelente biocompatibilidad y se ha comprobado que sus recubrimientos favorecen la integración del implante, promueven la formación de hueso y proporcionan una buena unión química y mecánica entre el hueso y el metal [28-29]. Estos buenos resultados se basan en que este compuesto, presente en la interfase, se disuelve y libera iones Ca^{2+} y HPO_4^{2-} , de modo que los fluidos corporales en contacto con el implante se saturan, precipitando sobre la superficie nanocristales de apatita biológica que sirve de sustrato para las células osteoblásticas que producen el tejido óseo.

Este material se puede depositar en la superficie del implante mediante distintas técnicas como son la pulverización catódica, la proyección de plasma, la realización de recubrimientos sol-gel, la deposición electroforética y la precipitación biomimética que intenta simular el proceso natural y consiste en la precipitación de cristales de apatita biológica sobre el metal, a partir de fluidos biológicos simulados (FBS) [15]. Esta última técnica implica la nucleación heterogénea y el crecimiento de cristales similares al hueso en la superficie del implante. Para garantizar que el revestimiento tenga estabilidad mecánica se requiere que la superficie de titanio sea rugosa, además se pueden realizar diversos pretratamientos para acelerar los procesos de nucleación y crecimiento cristalino.

Estos recubrimientos de fosfato cálcico biomimético han sido investigados, revelando dichos estudios que con esta técnica se logra un mayor contacto hueso-implante que el obtenido con el titanio sin recubrir [30]. Esto indicaría una mejora de la osteointegración, aunque el recubrimiento todavía no se ha comparado con otros tratamientos superficiales.

Sin embargo, se han relacionado fracasos clínicos con la técnica de proyección de plasma por la delaminación del recubrimiento y con el resto de técnicas no se han realizado suficientes estudios [14].

1.3.3 MODIFICACIONES BIOQUÍMICAS

El objetivo de este tipo de modificación es imitar biológicamente la arquitectura ósea natural para así mejorar el proceso de osteointegración.

La superficie del titanio puede ser modificada bioquímicamente mediante diferentes métodos:

Osteoinductores biomoleculares:

Es posible activar la superficie del implante introduciendo señales biomoleculares osteoinductoras mediante proteínas y péptidos adsorbidos o unidos covalentemente a su superficie.

Se han realizado estudios absorbiendo en la superficie del implante moléculas como la fibronectina y la vitronectina, que son las principales proteínas de adhesión celular que se encuentran en la matriz extracelular (ECM) de diversos tejidos y en la sangre circulante, y se han realizado ensayos in vitro que muestran un aumento de la adhesión celular, una mejora de la proliferación y de la diferenciación de osteoblastos, es decir, una mejora de la osteointegración del implante respecto al titanio sin recubrir [31].

Sin embargo, la unión de estas moléculas osteoinductoras es débil y pueden desprenderse con facilidad, por este motivo se recurre a enlaces covalentes logrando la unión de las proteínas al sustrato a través de moléculas puente. Así con la realización de técnicas como la silanización para obtener esta unión covalente se observa la mejora del proceso de regeneración ósea [32].

Recubrimientos de fosfatos de calcio:

Otra opción es realizar recubrimientos con materiales que favorecen la osteointegración como los fosfatos de calcio, realizando así una modificación físico-química, y a continuación introduciendo señales moleculares bioactivas, factores de crecimiento osteoinductores o fármacos antibacterianos, modificando bioquímicamente el sistema.

Esta técnica se basa en el hecho de que el setenta por ciento del hueso humano se compone de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$, recubriendo el metal de un material con una composición similar a este compuesto se modifica su superficie, mejorando el proceso de integración del implante en el sistema biológico.

Para la realización del recubrimiento se puede revestir previamente la superficie del titanio con óxido de aluminio (Al_2O_3) con la finalidad de aumentar la adherencia [33].

Se han obtenido recubrimientos, aplicando este tipo de modificación, mediante técnicas como la pulverización de plasma, la deposición electroquímica, por sol-gel o incluso por deposición con láser pulsado (PLD). Estudios in vitro revelan la biocompatibilidad de estos materiales y que estos tratamientos mejoran la adhesión de osteoblastos, la proliferación y la diferenciación [34], por otro lado estudios in vivo demuestran que favorecen la formación de hueso [35].

Además, como ya se ha comentado, estos recubrimientos pueden ser funcionalizados adicionalmente con biomoléculas osteoinductoras [6].

Recubrimientos con hidrogeles:

También es posible la realización de recubrimientos con hidrogeles biodegradables a los que se les incorporan biomoléculas y factores de crecimiento osteoinductores con el objetivo de potenciar la regeneración ósea, pudiendo introducir también diferentes fármacos para ayudar a la curación del implante como pueden ser agentes antibacterianos que prevengan la periimplantitis.

Un hidrogel es una red tridimensional de cadenas poliméricas flexibles que se hinchan en solución acuosa. Están constituidos por cadenas poliméricas largas unidas por enlaces cruzados. La reticulación de las moléculas de polímero se puede lograr mediante distintas técnicas como son la fotopolimerización, por acción de la temperatura, auto-ensamblaje, radiación o por la acción de enzimas.

Estos materiales se caracterizan por ser hidrófilos, insolubles en agua, blandos, elásticos y por hincharse en presencia de agua, manteniendo su forma, hasta alcanzar un equilibrio físico-químico; mientras que en estado deshidratado (xerogel) son cristalinos.

Las propiedades clave de hidrogeles para aplicaciones biomédicas son su alta biocompatibilidad, su biodegradabilidad y su capacidad de incorporar señales biomoleculares debido a la alta permeabilidad que presentan [6].

Como se ha podido observar, en el campo de la implantología dental se están desarrollando una gran cantidad de estudios con el objetivo de reducir el rechazo en este tipo de cirugías. Se han expuesto distintas técnicas que podrían servir para cumplir este objetivo. Sin embargo, no son las únicas y queda mucho que investigar en este sentido.

En este trabajo se va a intentar satisfacer las necesidades expuestas, utilizando como método, para modificar la superficie del implante de titanio y así mejorar su biocompatibilidad y favorecer el proceso de ostointegración, la realización de recubrimientos en base silicio realizados mediante la técnica sol-gel.

1.4 RECUBRIMIENTOS SOL-GEL DE BASE SILICIO

1.4.1 INTRODUCCIÓN

En la Ciencia de Materiales, el proceso sol-gel es una técnica empleada para formar materiales sólidos a partir de moléculas de pequeño tamaño que se ha utilizado ampliamente en la fabricación de óxidos metálicos, especialmente en la fabricación de óxidos de silicio y titanio.

El proceso sol-gel se basa en la conversión de precursores en solución coloidal (sol) a una estructura integrada por una estructura reticulada que encierra la fase líquida (gel). Siendo los precursores típicos alcóxidos metálicos o de silicio.

Este proceso surge hace más de 150 años, siendo la primera publicación sobre el tema la sintetización en 1846 del primer alcóxido de silicio a partir de tetracloruro de silicio (SiCl_4) y alcohol a temperatura ambiente. Sin embargo, no se le prestó realmente atención a este descubrimiento hasta que en 1971 se comprobó que la hidrólisis del ortosilicato de tetraetilo (TEOS) en condiciones ácidas permitía la formación de SiO_2 . Las investigaciones sobre sol-gel llegaron a ser tan importantes que en la década de 1990 más de 35.000 artículos fueron publicados en todo el mundo sobre este campo [40].

Este interés se basa en que el sol-gel es una técnica barata y que se lleva a cabo a baja temperatura. Además permite controlar la composición química y la estructura del producto. Permite obtener materiales de elevada pureza y homogeneidad, en distintas formas. Incluso permite la introducción de dopantes que se dispersan uniformemente en el producto final [36].

1.4.2 ETAPAS DEL PROCESO SOL-GEL

La síntesis de los materiales por el procedimiento sol-gel incluye la preparación de un sol, que es una suspensión coloidal de partículas en una fase líquida, de forma que las partículas tienen un tamaño lo suficientemente pequeño como para permitir que se mantengan en suspensión por fuerzas Brownianas; que acabarán formando un gel constituido por una red (fase sólida) y un líquido que queda inmovilizado por ésta.

La eliminación de la fase líquida requiere un proceso de secado, que normalmente se acompaña de un proceso de contracción y de densificación, y da lugar al xerogel [36]. El esquema del proceso se puede visualizar en la figura 3.

El proceso sol-gel se basa principalmente en reacciones de hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos, que están compuestos por un ion metálico o de silicio y un grupo alquilo [9, 36, 37, 38]. En base a la temática en la que se centra el presente trabajo, se va a enfocar la revisión bibliográfica a la información referente a alcoxilanos.

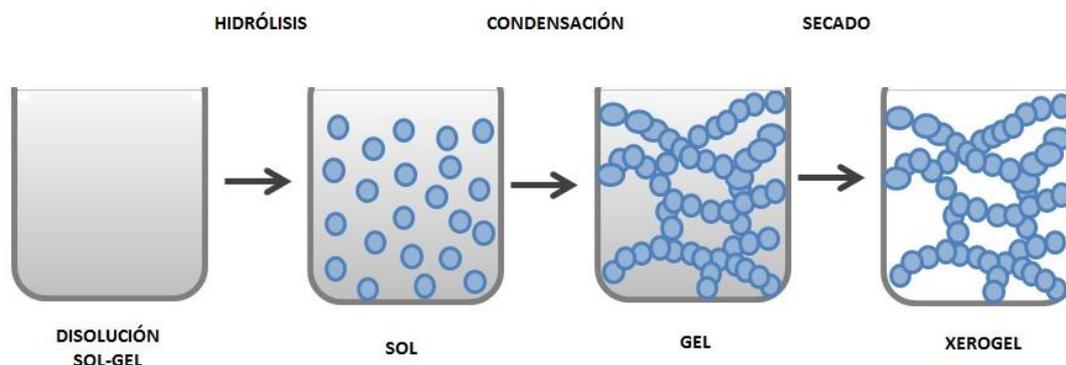


Figura 3. Etapas formación del sol-gel.

La reacción de hidrólisis consiste en la transformación del alcóxido de silicio en grupos hidroxilo al entrar en contacto con agua, de modo que un ion OH^- se une al átomo de silicio formando un grupo silanol Si-OH .

Las reacciones de condensación se desarrollan cuando entran en contacto dos grupos silanoles o un grupo silanol con un alcoxi ($-\text{OR}$) que no ha hidrolizado, formando enlaces siloxano (Si-O-Si) y como subproductos de reacción agua y alcohol [36]. En la mayoría de los casos las reacciones de condensación comienzan a desarrollarse antes de la finalización de la hidrólisis, de modo que ambas reacciones se producen de modo simultáneo [38].

A continuación se muestran las reacciones descritas en el párrafo anterior:



Reacciones hidrólisis-condensación del proceso sol-gel.

El número de enlaces que puede formar un precursor se denomina funcionalidad. La reacción a partir del alcóxido de silicio, por ejemplo, puede conducir a la compleja ramificación del gel, ya que un precursor completamente hidrolizado $\text{Si}(\text{OH})_4$ es tetrafuncional (se puede ramificar o funcionalizar en 4 direcciones diferentes). Por otra parte, bajo ciertas condiciones, por ejemplo, baja concentración de agua, no se logran condensar los cuatro grupos OH , obteniendo una baja ramificación.

Una vez se han formado suficientes enlaces Si-OH, estos se comportaran como pequeñas partículas coloidales en la suspensión; de forma que se habrá logrado la obtención del sol.

El siguiente paso es el proceso de gelificación que se produce al generarse enlaces siloxano entre las partículas de sol dispersas coloidalmente; formándose así, una estructura tridimensional que encierra a la fase líquida, aumentando, como consecuencia de ello la viscosidad del sistema [37].

Si se deja que el gel permanezca en reposo, por RMN se comprueba que se desarrollan reacciones de condensación entre los grupos silanoles y alcoxi que permanecen en la red [37]. Esta etapa se denomina envejecimiento y conlleva una mejora de las propiedades del sol-gel. Sin embargo, es un proceso lento, aunque puede acelerarse jugando con las condiciones de síntesis del material, tales como temperatura y pH [37-38].

A continuación, se procede a la realización de un secado para eliminar los componentes volátiles del sistema, como agua o alcohol; obteniendo así una estructura porosa. En función de la temperatura a la que se realice el secado, esta etapa supondrá una mayor o menor contracción del material, pudiendo obtener así diferentes grados de densificación de la red. Así, si el tratamiento térmico se realiza a temperaturas bajas ($T < 200^{\circ}\text{C}$), se eliminan los componentes volátiles del sistema pero la contracción experimentada no es notable. Si este tratamiento se realiza a temperaturas altas ($T > 200^{\circ}\text{C}$), se producirá una condensación adicional de los grupos condensables sin reaccionar y una importante contracción de la estructura que supondrá la densificación del material [37].

Las propiedades estructurales de los materiales sol-gel dependen en gran medida de las condiciones del proceso, tales como reactivos utilizados, relación molar $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$, pH, temperatura y de las condiciones del secado [36, 38]. Consecuentemente, jugando con estos parámetros es posible controlar las propiedades y la microestructura del material obtenido [38]. De este modo, se va a proceder a la descripción de estos factores para comprender mejor como intervienen en el proceso de formación del material sol-gel.

Relación molar r ($\text{H}_2\text{O}:\text{Si}$):

El agua desempeña un papel fundamental en la cinética de reacción y, en consecuencia, sobre la morfología del material final. El aumento de la proporción de agua en la reacción conduce a una aceleración de la reacción de hidrólisis y por lo tanto a una disminución del tiempo necesario para la gelificación del sistema. Cuando se añade una cantidad de agua excesiva el sistema gelifica en tiempos muy cortos y se vuelve muy viscoso. Cuando esta relación molar es menor a la estequiométrica, la hidrólisis será limitada y no gelificará adecuadamente [37-38].

La cantidad de agua para mantener una relación estequiométrica 1:1 dependerá del grado de sustitución del alcóxido, así para precursores del tipo $\text{Si}(\text{OR})_4$ como el TEOS (tetraetil-ortosilicato) la relación será de 4, sin embargo, otros precursores silícicos como el MTMOS (metil-trimetoxisilano) y el GPTMS (glicidoxipropil-trimetoxisilano) necesitaran una relación de 3.

Naturaleza del disolvente:

Generalmente, se añaden disolventes para evitar la separación de fases durante las primeras etapas de hidrólisis. Esto se debe a que los alcoxisilanos no son miscibles en agua como consecuencia de los sustituyentes de estos precursores. Por tanto, se requiere el uso de disolventes para mejorar la miscibilidad de los componentes y la homogeneidad de la mezcla. Uno de los disolventes más utilizados en estos casos son los alcoholes. Sin embargo, en algunos casos los geles también pueden prepararse a partir del alcoxisilano y agua sin la adición de un disolvente, ya que el alcohol creado durante la hidrólisis puede homogeneizar el sistema [38].

El solvente también sirve para controlar las concentraciones de agua y silicio y así regular la cinética de gelificación [37].

La elección del disolvente va a influir en el secado del material, que es una etapa clave en la definición de su microestructura. En este sentido, se han estudiado los efectos del solvente en términos de aditivos para controlar el secado sin crear grietas en el material producido [39]. Utilizando solventes como los alcoholes se puede acelerar el secado y evitar la degradación del material por la temperatura [37].

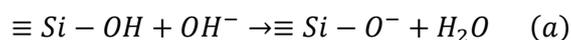
Efecto estérico:

Los sustituyentes de los precursores utilizados en la elaboración de este tipo de materiales presentan un efecto estérico debido a su tamaño; es decir, su volumen dificulta la movilidad de las moléculas de agua y, en consecuencia, ralentiza el proceso de hidrólisis [40].

Influencia del pH:

La velocidad de formación del sol-gel puede acelerarse mediante el pH. Así, el efecto de la catálisis en la química sol-gel ha sido ampliamente estudiado en la literatura [37-39]. El proceso de polimerización del sol-gel puede dividirse en tres dominios del pH: $\text{pH} > 2$, $\text{pH} 2-7$ y $\text{pH} > 7$ [37].

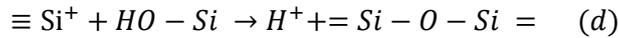
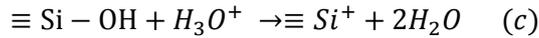
El rango comprendido entre $\text{pH} 2$ y $\text{pH} 7$ no es adecuado para la elaboración del material. La presencia del punto isoeléctrico (IEP) y el punto de carga cero (PZC) hace que no haya repulsión electrostática y que se produzca una agregación de especies excesivamente rápida. En este rango de pH se desarrollan las siguientes reacciones, siendo la cinética de la segunda de ellas (b) demasiado lenta [37]:



Reacciones desarrolladas a pH 2-7.

A pH ácido, comprendido entre 1-2, la reacción de condensación se ve favorecida frente a la de hidrólisis, ya que las especies de sílice no tiene mucha tendencia a ionizarse. Esto favorece el crecimiento de la red y conduce a una solución de la red de óxido de silicio. Al gel obtenido por catálisis ácida se le denomina gel polimérico. Esto se debe a que cuando, por ejemplo, se utiliza un precursor tetrafuncional se

forma una especie OHSi(OR)_3 , ésta tendrá más tendencia a condensar que a seguir hidrolizándose como se puede ver en las reacciones (c) y (d):



Reacciones desarrolladas a $\text{pH} < 2$.

El grado de reticulación de la red es proporcional a la concentración de H^+ , puesto que dicho protón tiene un papel catalítico, siendo la clave de esta catálisis un ataque nucleofílico al átomo de oxígeno, como se muestra en la figura 4. En la etapa de condensación se forman cadenas que se enredan y reticulan formando la red [37].

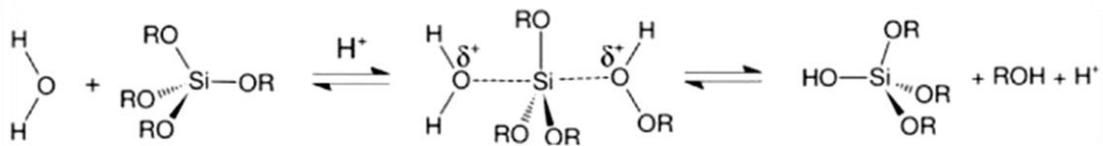


Figura 4. Mecanismo de reacción de la catálisis ácida [37].

A pH básico se observa que los precursores se hidrolizan rápidamente, obteniendo especies totalmente hidrolizadas; como el Si(OH)_4 en el caso de precursores tetrafuncionales. Al incrementar el pH el mecanismo de reacción cambia. La reacción de hidrólisis se ve favorecida por el ataque nucleófilo del anión OH^- sobre el Si , como se puede observar en la figura 5, derivando este anión de la ionización del agua como consecuencia de la presencia de una base. Esta rápida hidrólisis hace que las especies formadas condensen en agregados muy ramificados que no se enredan entre sí. Por esta razón al gel obtenido mediante catálisis básica se le denomina gel coloidal [38].

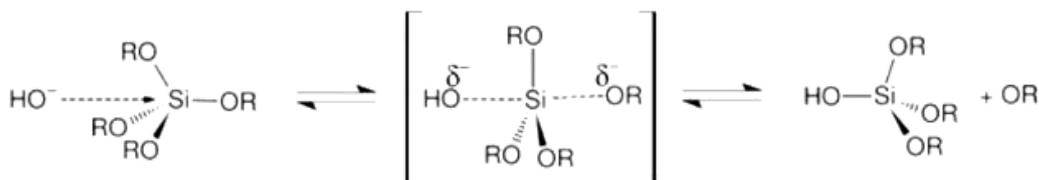


Figura 5. Mecanismo de reacción de la catálisis básica [37].

De esta forma, como se observa en la figura 6, mediante catálisis ácida se obtendrá una estructura más compacta que por catálisis básica, en la que la estructura será más porosa.

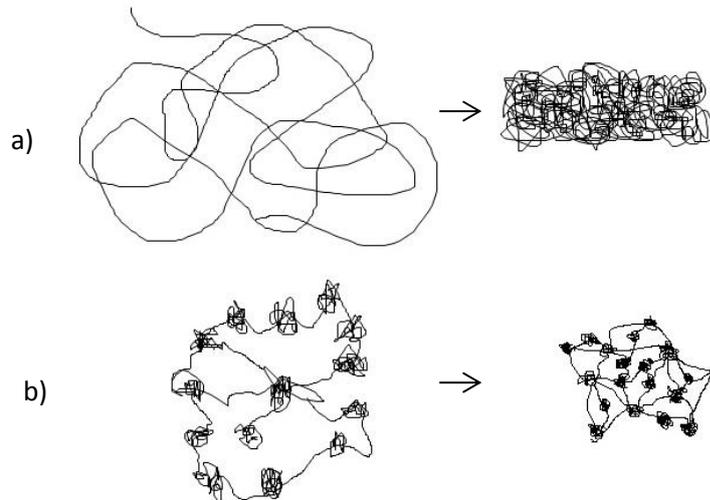


Figura 6. Diferencias estructurales entre catálisis ácida (a) y básica (b).

1.4.3 RECUBRIMIENTOS SOL-GEL SOBRE METAL

Como ya se ha comentado, una de las ventajas del proceso sol-gel es que permite obtener el material en distintas formas y con diferentes configuraciones. El sol puede ser depositado sobre un sustrato para formar un recubrimiento, en un recipiente con la forma deseada para obtener, por ejemplo, cerámicas monolíticas, vidrios, fibras, membranas o aerogeles; o se puede utilizar para sintetizar polvos de diferentes tamaños.

En el presente trabajo el material sol-gel va destinado a la elaboración de recubrimientos en un sustrato metálico, el titanio. De este modo se va a lograr por un lado, la protección del metal y, por otro lado, se va a poder modular las propiedades de los implantes, optimizándolas para la aplicación a la que van destinados.

Para la obtención del recubrimiento, en primer lugar se prepara el sol; éste es depositado sobre el sustrato mediante diferentes técnicas hasta lograr revestir la superficie.

En términos de técnicas de fabricación, hay varias opciones de deposición tales como el *dip-coating* (recubrimiento por inmersión), el *flow-coating* (recubrimiento por flujo), el *spray-coating* (recubrimiento por pulverización) o el *spin-coating* (recubrimiento por giro a alta velocidad) y el rodillo de recubrimiento que pueden ser utilizadas para recubrir una superficie con una solución de sol [41].

Una de las ventajas a la hora de utilizar el sol-gel para recubrir metales es la buena adhesión que se logra como consecuencia del anclaje químico que se produce entre ambos materiales. Los grupos hidroxilo de la superficie metálica (Me-OH) interactúan con los grupos silanoles del sol-gel (Si-OH) como se observa en la figura 7. En un primer momento este tipo de interacción se basa en enlaces débiles como puentes de hidrogeno, pero durante el curado se logra unir el recubrimiento al sustrato con enlaces covalentes que suponen la perfecta adhesión del sol-gel al implante [42].

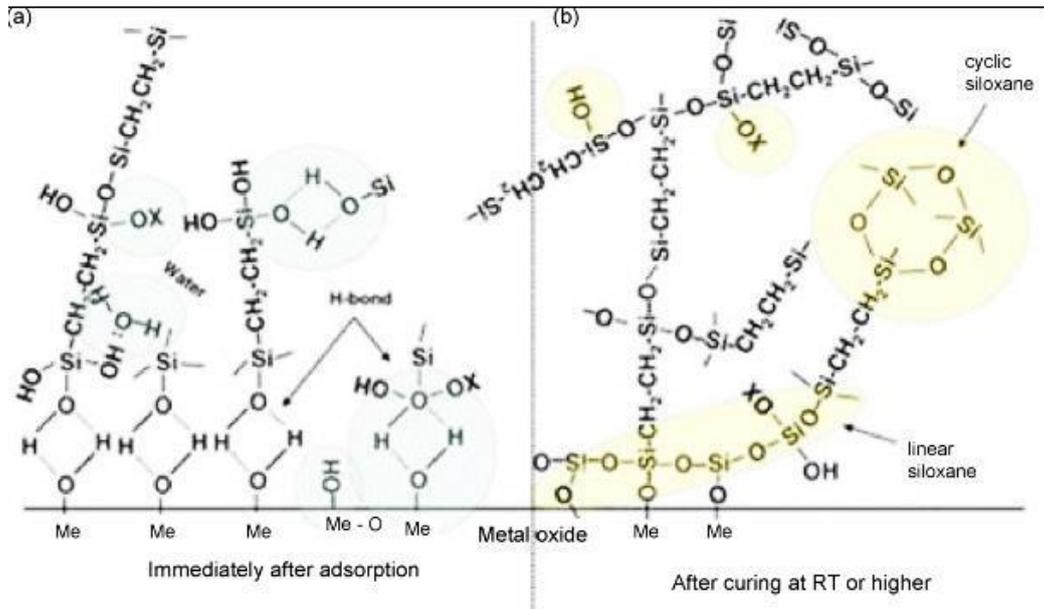


Figura 7. Recubrimiento sol-gel sobre metales. (a: interacción por puente de hidrogeno; b: enlace covalente en la interfase metal-recubrimiento) [42].

1.4.4 RECUBRIMIENTOS SOL-GEL HÍBRIDO PARA APLICACIONES MÉDICAS

La principal ventaja de la química sol-gel es proporcionar condiciones suaves de manera que las especies orgánicas se pueden mezclar con los precursores inorgánicos cerámicos, lo que lleva a la formación de sistemas compuestos o híbridos [38].

Los materiales híbridos permiten la combinación de las propiedades de los materiales tradicionales, como la cerámica y polímeros orgánicos, en la escala nanoscópica. Las propiedades del producto final dependen estrechamente de la naturaleza química y el contenido de los componentes inorgánicos y orgánicos constitutivos [43].

Los recubrimientos sol-gel híbridos presentan varias ventajas frente a los recubrimientos totalmente inorgánico. Así, en primer lugar, los recubrimientos híbridos permiten obtener fácilmente una capa más gruesa, más flexible y sin grietas. En segundo lugar, requieren una menor temperatura de curado, normalmente inferior a 200°C [42].

Una de las formas de obtener estos compuestos híbridos es la utilización de alcóxidos de silicio orgánicamente modificados como precursores; estos compuestos tienen una estructura $R_xSi(OX)_{4-x}$, donde R es una molécula orgánica enlazada al silicio mediante una unión Si-C. De este modo, se pueden conseguir distintas propiedades cambiando la naturaleza de esta molécula orgánica.

El objetivo principal cuando se sintetiza un material híbrido que contiene silicato para cualquier aplicación, incluyendo la biomédica, es aprovechar las propiedades de su

parte orgánica y de su parte inorgánica. El componente inorgánico puede proporcionar dureza, resistencia, estabilidad térmica, densidad, etc., mientras que la orgánica proporciona elasticidad, carácter hidrófobo/hidrófilo o reactividad química [43].

La alta bioactividad del sol-gel híbrido en base silicio deriva de la liberación de silicio al sistema que actúa como señal osteoinductora, unida a la adición de componentes orgánicos bioactivos que funcionalizan el biomaterial.

Jugando con la naturaleza química de las moléculas introducidas en la red es posible modificar las propiedades del material como son la hidrofilia, la rugosidad o la porosidad. Además se puede modificar el grado de funcionalidad de modo que con todos estos factores se puede obtener un recubrimiento más bioactivo que favorezca procesos como la osteointegración.

Ya en el 1997 Tsuru proponía este tipo de silicatos modificados orgánicamente como materiales capaces de mostrar un comportamiento bioactivo y favorecer procesos como la osteointegración [44].

En este sentido se han realizado diferentes investigaciones, ensayos in vivo demuestran que recubrimientos de sol-gel híbrido mejoran el rendimiento de implantes de acero inoxidable AISI 316L puesto que mejora sus propiedades barrera y promueve su bioactividad [45]. Por otro lado, se han logrado desarrollar materiales de sol-gel híbridos basados en tetraetilo-ortosilicato (TEOS) y en trietoxisilano de vinilo (VTES) para estimular la unión celular, la proliferación y diferenciación de las células osteogénicas, evaluando este comportamiento mediante ensayos in vitro con células madre mesenquimales que demostraron la biocompatibilidad y el carácter osteoinductor de los recubrimientos sintetizados [46].

Estos resultados indican que los materiales sol-gel híbrido en base silicio son llamados a desempeñar un papel principal en el futuro de las terapias regenerativas hueso.

1.5 OBJETIVOS

Como se ha explicado en los apartados anteriores, existe una creciente demanda en la reposición de piezas dentales mediante implantes, como consecuencia del envejecimiento de la población. Aunque se logran tasas aceptables de éxito clínico, los tiempos de recuperación son largos y, en algunos casos, resulta imposible realizar la intervención como consecuencia del mal estado del tejido óseo. Además, una vez realizada la cirugía, puede producirse el rechazo del implante como consecuencia de diferentes complicaciones como la periimplantitis. Adicionalmente, cada vez más personas jóvenes recurren a este tipo de cirugía por cuestiones de estética debido a la importancia del aspecto físico en las relaciones sociales; siendo necesario aumentar el tiempo de vida de estas prótesis dentales. Ante esta problemática resulta necesario seguir investigando para lograr la mejora de estos implantes. Por este motivo se plantea lograr solventar estos problemas tratando la superficie del implante dental con un recubrimiento sol-gel con propiedades bioactivas que promueva la osteointegración.

Así, el objetivo de este estudio es el desarrollo y caracterización de recubrimientos bioactivos híbridos formados por una red vítrea de alcoxilanos a partir de composiciones triples de TEOS (tetraetil-ortosilicato), GPTMS (glicidoxipropil-trimetoxisilano) y MTMOS (metil-trimetoxisilano) para ser utilizados con aplicaciones médicas.

De este modo se va a estudiar la viabilidad de estos recubrimientos, comprobando hasta qué punto se puede introducir TEOS a una red de referencia formada por 50% MTMOS y 50% GPTMS. Además se va a analizar cómo afecta a sus propiedades la introducción de este nuevo precursor en distintos porcentajes.

La secuencia de variación del porcentaje de TEOS que se va a estudiar es:

45M:45G:10T – 35M:35G:30T – 25M:25G:50T – 15M:15G:70T – 5M: 5G:90T

Así, se va a ir aumentando progresivamente la concentración de éste precursor en la composición, quedando fijada la proporción de MTMOS y GPTMS, manteniéndola entre sí al 50%.

Los recubrimientos desarrollados con estos materiales son una red vítrea híbrida sol-gel de base silicio, considerando que el TEOS es el precursor más inorgánico, mediante el estudio se va a poder ver cómo son afectadas sus propiedades al incrementar el carácter inorgánico de la estructura.

El plan de trabajo a seguir va a consistir en la síntesis de la serie de recubrimientos antes expuesta y su posterior caracterización físico-química. Además, se van a recubrir implantes dentales de titanio con la composición óptima.

CAPÍTULO 2

MATERIALES, MÉTODOS Y TÉCNICAS

EXPERIMENTALES

2. MATERIALES, MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha explicado en el apartado anterior, el objetivo de este trabajo es el estudio y caracterización de una serie de materiales con distinto carácter inorgánico para el recubrimiento de implantes dentales.

Estos biomateriales híbridos son obtenidos mediante proceso sol-gel, partiendo de la combinación de precursores de silicio con distintos grupos funcionales orgánicos. Se producen una serie de reacciones de hidrólisis y condensación que dan como resultado una red de silicio (parte inorgánica) con los grupos funcionales introducidos con los precursores (parte orgánica).

A continuación, se van a describir tanto los materiales utilizados como el proceso para obtener los biomateriales objetivo de estudio, se van a explicar los métodos para la preparación de muestras y las técnicas necesarias para su análisis, de modo que al final de este trabajo queden caracterizadas las distintas propiedades físico-químicas de la serie de biomateriales.

2.2 SERIE DE MATERIALES

Los precursores seleccionados para obtener el recubrimiento fueron el metil-trimetoxisilano (MTMOS, Sigma-Aldrich), el glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS, Sigma-Aldrich) y el tetraetil-ortosilicato (TEOS, Sigma-Aldrich).

En la figura 8 se muestra la estructura de cada uno de estos compuestos:

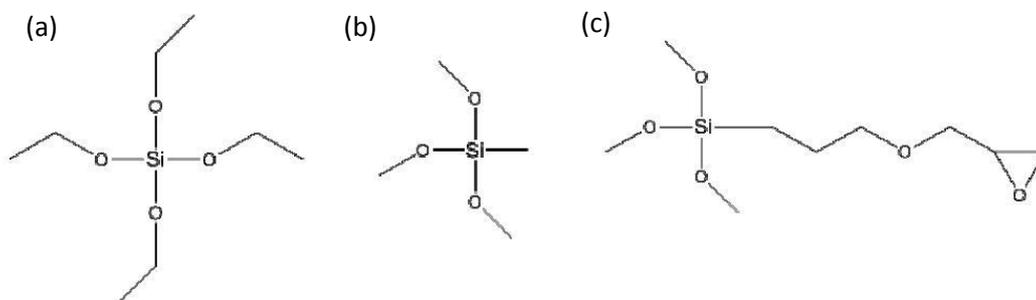


Figura 8. Estructura molecular del TEOS (a), MTMOS (b) y GPTMS (c).

Partiendo como referencia de la composición 50% MTMOS - 50% GPTMS, se van a incorporar a este sistema diferentes porcentajes de TEOS manteniendo la proporción MTMOS:GPTMS igual a 1; elaborando así diferentes composiciones triples con estos tres precursores.

De esta forma se definen la referencia y los cinco materiales elegidos para el estudio de la serie, sus composiciones se muestran en la tabla 1:

	MTMOS (%)	GPTMS (%)	TEOS (%)
50M50G	50	50	0
45M45G10T	45	45	10
35M35G30T	35	35	30
25M25G50T	25	25	50
15M15G70T	15	15	70
5M5G90T	5	5	90

Tabla 1. Composiciones objeto de estudio.

Con estos materiales se van a realizar recubrimientos sobre distintos sustratos o se van a obtener films del material, en función de los ensayos a realizar. Los sustratos utilizados van a ser planchas de acero inoxidable de 50x50x1 mm, portas de vidrio e implantes dentales GMI modelo Frontier de titanio de grado 4, tipo L8, de 3,73 mm de diámetro que están pasivados químicamente y esterilizados por irradiación gamma y son proporcionados por la empresa Ilerimplant S.L..

2.3 PREPARACIÓN DEL SOL-GEL

El protocolo a seguir para obtener los diferentes materiales se basa en la preparación de una disolución de los distintos precursores en isopropanol (Sigma-Aldrich) con una relación en volumen alcohol:precursor 1:1.

A esta disolución mantenida en agitación con un agitador magnético, se le añade, gota a gota, la cantidad estequiométrica necesaria de agua para que se produzca la hidrólisis de los precursores empleados, el agua se añade acidificada con HNO₃ (Panreac) a pH 1 para catalizar la reacción.

La mezcla se mantiene en agitación durante una hora. Transcurrido este tiempo, la agitación se detiene y se mantiene al material una hora en reposo para que el sistema se estabilice.

Tanto los tiempos de reacción como los de reposo han sido fijados en base a estudios previos [47].

Todo el proceso descrito se realiza bajo unas condiciones de humedad controladas, de modo que las condiciones de trabajo en el laboratorio son de una humedad del 40% y temperatura ambiente.

El procedimiento explicado se representa en la figura 9:

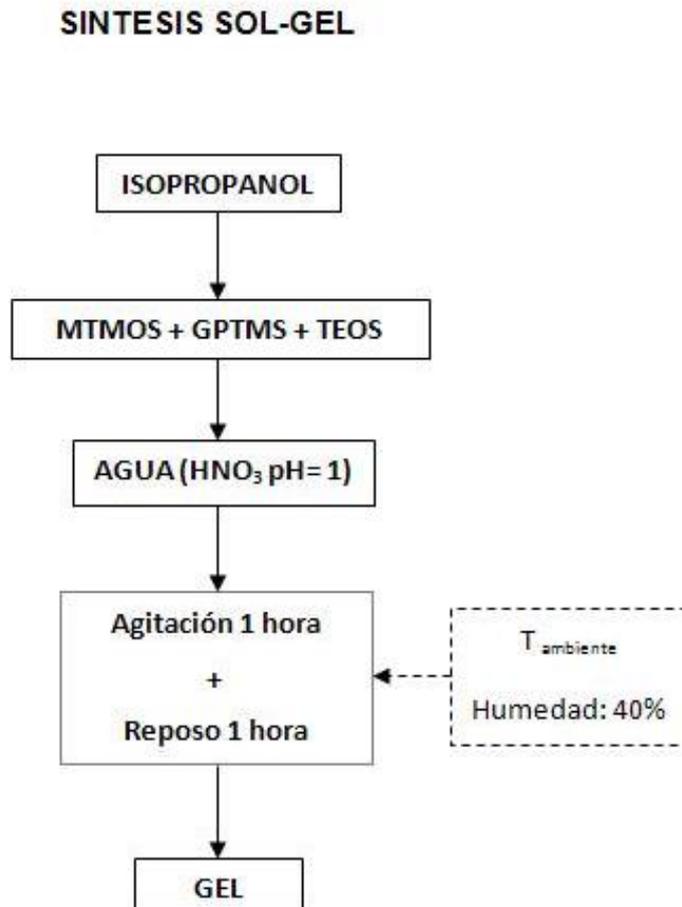


Figura 9. Esquema preparación sol-gel.

2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez sintetizado el material, éste puede ser empleado para recubrir un determinado sustrato o para obtener un film libre.

Para obtener una película libre se vierten 4 ml de sol-gel sobre un molde de teflón antiadherente, obteniendo así films de bajo espesor, a los que posteriormente se les aplica el proceso térmico de curado correspondiente.

Para la obtención de recubrimientos, la superficie de los tornillos de titanio está granallada de forma que pueden ser recubiertos directamente.

Sin embargo, la superficie de las planchas de acero inoxidable debe ser preparada. El pretratamiento superficial consiste en el lijado de la plancha con lija, con un tamaño de grano de 1200 partículas/cm², en cuatro direcciones distintas. A continuación las

planchas se lavan con agua y posteriormente con acetona para eliminar los posibles restos orgánicos. Se secan bien y se utilizan inmediatamente.

En la figura 10 se esquematiza el proceso de lijado de las planchas de acero inoxidable:

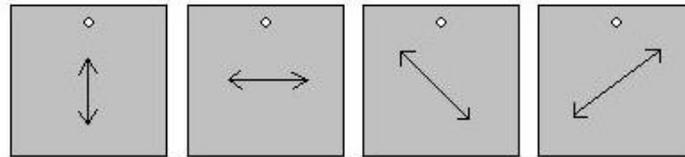


Figura 10. Proceso de lijado de las planchas de acero inoxidable.

Los portas de vidrio también deben ser pretratados; estos se limpian bien en un baño de ultrasonidos en una disolución de HNO_3 al 25% en volumen durante 15 minutos y a 30 W de potencia. A continuación se lavan con agua destilada y después con acetona y finalmente se secan en estufa a 100°C .

Excepto con los porta de vidrio, en todos los casos los recubrimientos se han realizado mediante la técnica del dip-coating, que consiste en la inmersión del sustrato en el sol-gel controlando la velocidad y el tiempo. Así, empleando un dip-coater de la marca KSV Instrument modelo KSVDC se introdujeron los distintos sustratos en el sol-gel con una velocidad controlada de 60 mm/min para la bajada, se mantuvieron un minuto sumergidos y finalmente se extrajeron con una velocidad controlada de 100 mm/min de subida. Este procedimiento se representa en la figura 11:

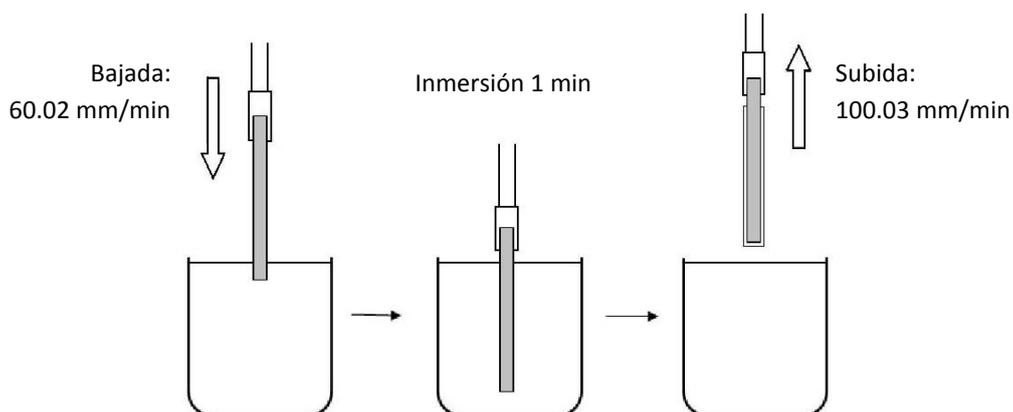


Figura 11. Esquema técnica dip-coating.

Los portas de vidrio se recubren mediante la técnica del flow-coating que consiste en verter el sol-gel sobre la superficie a recubrir de forma continua, estando ésta inclinada 45° respecto a la horizontal.

TRATAMIENTO TÉRMICO

Una vez obtenido el biomaterial y preparada la muestra, ya sea en forma de film o de recubrimiento, este se somete a un tratamiento térmico de curado en estufa con el objetivo de promover las reacciones de condensación y la eliminación de los disolventes de la red. En base a estudios previos [47-48] se determina que el proceso óptimo de curado de los materiales es la realización de una rampa de temperaturas constituida por 15 minutos de curado a 50°C, transcurrido este tiempo se aumenta la temperatura hasta 100°C y se mantiene el material otros 105 minutos.

2.5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los materiales se caracterizan químicamente mediante dos técnicas: Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio (Si-RMN) en estado sólido y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio (Si-RMN):

El fenómeno de la Resonancia Magnética Nuclear se puede observar sólo en compuesto que contengan elementos con núcleos magnéticamente activos, es decir, en aquellos cuyo espín nuclear sea diferente a cero. De esta forma la técnica se basa en someter al material a un campo magnético externo, de modo que algunos núcleos atómicos absorben radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias. La frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, de modo que permite determinar la estructura de la molécula en la que se encuentran.

Así, esta técnica permite estudiar la estructura final del material obtenido, ya que al tratarse de un material vítreo y, por tanto, ser un sólido amorfo desordenado, no dispone de cristales adecuados para su estudio por rayos X. Sin embargo, con el Si-RMN de sólidos si es posible estudiar la cantidad de enlaces Si-O-Si que se han formado por condensación alrededor de cada átomo de Si y, en conclusión, obtener información acerca del grado de entrecruzamiento de la red producida.

Se ha utilizado un espectrómetro Bruker 400 Avance III WB Plus para realizar los ensayos. Se realizan dos replicas para cada material.

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR):

Esta técnica se basa en el intercambio de energía entre la materia y las diferentes regiones del espectro electromagnético, así la absorción de radiación que realiza la materia indica los tipos de enlaces y grupos funcionales que se encuentran presentes en ella, por tanto la información que proporciona un espectro de infrarrojo es característica de cada sustancia.

Se ha realizado un análisis químico de los materiales objeto de estudio mediante espectroscopia IR con ayuda de un accesorio de reflexión atenuada (ATR) con una resolución de 4 cm⁻¹, 32 de nº Scan, un rango de medida de 600-4000 cm⁻¹ y a

temperatura ambiente. El equipo utilizado es un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Equinox 55. Las medidas se realizan a los distintos materiales obtenidos en forma de film libre, realizando dos medidas a cada uno de ellos.

CARACTERIZACIÓN TÉRMICA

La caracterización térmica de los materiales se realiza mediante dos técnicas: Termogravimetría (TGA) y con Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

Termogravimetría (TGA):

Esta técnica se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un ciclo de temperaturas en una atmósfera controlada, aportando información acerca de la estabilidad térmica y de la composición de los materiales a estudiar.

Se ha empleado para realizar los ensayos un TG-STD A Mettler Toledo modelo TGA/SDTA851e/LF/1600, acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo PFEIFFER VACCUM modelo THERMOSTAT.

Las medidas se realizan en atmósfera de N₂ y el ciclo aplicado consta de una isoterma a 50°C durante 10 minutos y un barrido de 50 a 900 °C a 10 °C/minuto. Las muestras a medir se obtienen a partir de films libres del material y se realizan dos medidas para cada uno de ellos.

Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC):

Es una técnica termoanalítica que se utiliza para analizar que le ocurre al material cuando es calentado y permite estudiar sus transiciones térmicas.

El equipo analiza las diferencias de calor entre la muestra y una referencia, medidas como una función de la temperatura. La técnica se basa en que cuando el material a estudiar experimenta una transformación física, se requiere que fluya una cantidad diferente de calor a la muestra que a la referencia para poder mantener ambas a la misma temperatura; de este modo determinando la diferencia de flujo calorífico el DSC es capaz de medir la cantidad de calor absorbido o eliminado en estas transiciones, así como identificar a que temperaturas se producen. De este modo mediante la técnica se puede identificar la temperatura de transición vítrea de los distintos materiales, así como temperaturas de cristalización y de fusión.

El equipo empleado en la realización de estos ensayos es un Differential Scanning Calorimetry Mod. DSC-7, Perkin Elmer.

El ciclo térmico consta de una isoterma a 45 °C durante 1 minuto, un calentamiento de 45 a 250°C a 10 °C/minuto y finalmente otra isoterma a 250°C durante 1 minuto. Se emplean cápsulas de 40 µL en las que se introducen masas en torno a 10 mg de material obtenido en forma de film libre. Se realizan dos medidas a cada material.

PROPIEDADES SUPERFICIALES

Respecto a las propiedades superficiales de los materiales a estudiar, es importante caracterizar el grado de hidrofilia de la superficie puesto que esta propiedad tiene gran influencia en la adhesión celular.

Un modo de determinar ese carácter es mediante la medida del ángulo de contacto.

Ángulo de contacto:

El equipo Dataphysics OCA 20 (Figura 12) permite determinar el ángulo de contacto entre un sólido y un líquido.

Para ello se recubren por dip-coating planchas de acero inoxidable con cada uno de los distintos materiales, realizando las medidas sobre éstas. Como líquido se utiliza Agua-W04 y las gotas se forman aplicando un Dosing Rate de $27.5 \mu\text{L/s}$ y un volumen de gota de $10 \mu\text{L}$. Las medidas se realizan con ayuda del software SCA20 a temperatura ambiente y exactamente 21 segundos después de la deposición de la gota sobre el recubrimiento.

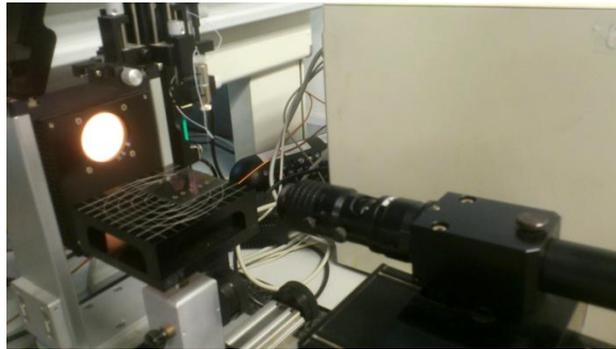


Figura 12. Equipo Dataphysics OCA 20.

Se miden dos planchas de cada material, depositando tres líneas de cinco gotas cada una a diferentes alturas de la plancha, tal como se observa en la figura 13.

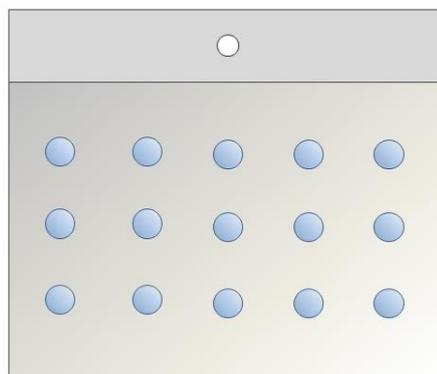


Figura 13. Disposición de las gotas en la plancha para la medida del ángulo de contacto.

Se mide tanto el ángulo derecho como el izquierdo, de forma que para cada material se obtienen un total de 60 medidas a las que se les realiza una media. En la figura 14 se muestra el esquema de cómo se mide el ángulo de contacto a una gota:

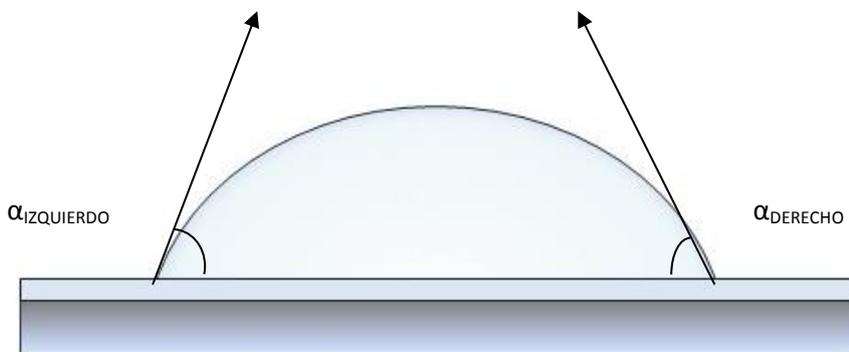


Figura 14. Esquema de la medida del ángulo de contacto entre el sustrato y el líquido.

ENSAYOS DE ESTABILIDAD

En este sentido, se realizan ensayos de degradación hidrolítica que se complementan con ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica que permiten conocer la integridad y estabilidad del recubrimiento y, por tanto, la protección que ofrece éste al implante.

Degradación hidrolítica:

Para determinar cómo se degrada el material al estar en contacto con agua se realizan ensayos de degradación hidrolítica.

Para ello se recubren portas de vidrio con los distintos materiales por flow-coating, según se ha explicado anteriormente. Se realizan tres muestras por cada material y se ponen en contacto con agua destilada en estufa a 37 °C, que corresponde a la temperatura del cuerpo humano.

Las muestras se extraen a los 7, 14, 28, 42 y 63 días, secándolas en estufa de vacío y midiendo la pérdida de masa en cada periodo.

Ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica:

Para medir la capacidad de protección frente a la corrosión de los recubrimientos, se han caracterizado mediante ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

Se trata de una técnica no destructiva que consiste en la medida de la respuesta del sistema ante una señal sinusoidal de excitación de potencial eléctrico a diferentes

frecuencias, que expresada como una función de tiempo, se representa mediante la ecuación 1:

$$E(t) = E_0 \cdot \cos(w \cdot t) \quad (1)$$

Donde E_0 es la amplitud en voltios, w la frecuencia radial en rad/s y f es la frecuencia expresada en hercios (Hz).

Esta perturbación en el potencial del sistema produce una señal de salida en forma de corriente sinusoidal $I(t)$, en esta señal de respuesta se ha desplazado en fase y tiene una amplitud distinta.

$$I(t) = I_0 \cdot \cos(w \cdot t - \theta) \quad (2)$$

Donde I_0 es la amplitud en amperios y θ es la fase en grados [49].

De este modo se define la Impedancia electroquímica (Z) como la relación entre el potencial aplicado y la intensidad resultante, este valor representa la resistencia de un circuito al paso de flujo de una corriente alterna.

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = Z_0 \frac{\cos(wt)}{\cos(wt-\theta)} \quad (3)$$

Aplicando la relación de Euler (4), la impedancia (Z) se representa como un vector suma de una parte real y otra imaginaria; donde Z' y Z'' son la componente real e imaginaria del vector y θ el ángulo de fase.

$$\exp(i\theta) = \cos\theta + i\sin\theta \quad (4)$$

$$Z = Z_0(\cos\theta + j\sin\theta) = Z' + jZ'' \quad (5)$$

De esta forma, el vector impedancia también puede ser definido mediante un módulo $|Z|$ y su dirección (θ); con el teorema de Pitágoras es posible calcular estos parámetros [50]:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (6)$$

$$\theta = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad (7)$$

Estos parámetros se presentan a partir de los datos experimentales obtenidos mediante los diagramas de Nyquist y de Bode.

El diagrama de Nyquist muestra la impedancia (Z) en el plano complejo, representando su parte real (Z') en el eje de abscisas y su parte imaginaria (Z'') en el eje de ordenadas para las diferentes frecuencias. De este modo al unir todos los extremos de los vectores para los diferentes valores de frecuencia se obtiene el diagrama descrito, como se puede observar en la figura 15.

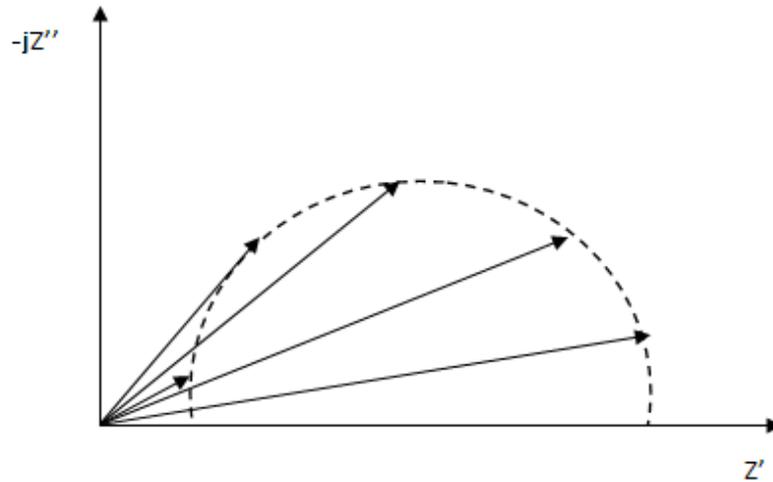


Figura 15. Variaciones de la impedancia con la frecuencia. Diagrama Nyquist.

Por otro lado, estos parámetros también pueden ser representados mostrando el módulo $|Z|$ en escala logarítmica y el ángulo de fase (θ), ambos en el eje de ordenadas, y en el eje de abscisas la frecuencia en escala logarítmica: obteniendo así el diagrama de Bode. Este diagrama se representa en la figura 16.

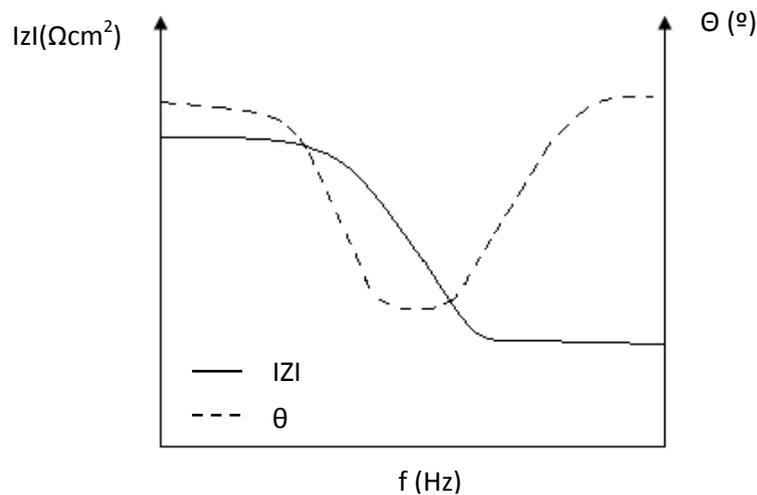


Figura 16. Diagrama de Bode.

A partir de la información obtenida en estos diagramas se deducen mecanismos de degradación y corrosión del biomaterial.

Para realizar estos ensayos se recubren planchas de acero inoxidable con los distintos materiales a estudiar y se ponen en contacto con un electrolito, que consiste en una disolución acuosa al 3.5% de NaCl. El área en contacto con dicho electrolito se limita a 3.14 cm^2 mediante cinta aislante. Las medidas se realizan dentro de una celda de

Faraday con una celda electrolítica compuesta por de tres electodos, como se puede ver en la figura 17.



Figura 17. Ensayo EIS.

- Un electrodo de trabajo (WE) que es el electrodo al que se le aplica el potencial (V) y consiste en la plancha de acero inoxidable recubierta con el biomaterial.
- Un electrodo de referencia (RE) que consiste en un electrodo de Ag/AgCl.
- Un contraelectrodo (CE) de grafito.

En la figura 18 se muestra el esquema de una celda electrolítica:

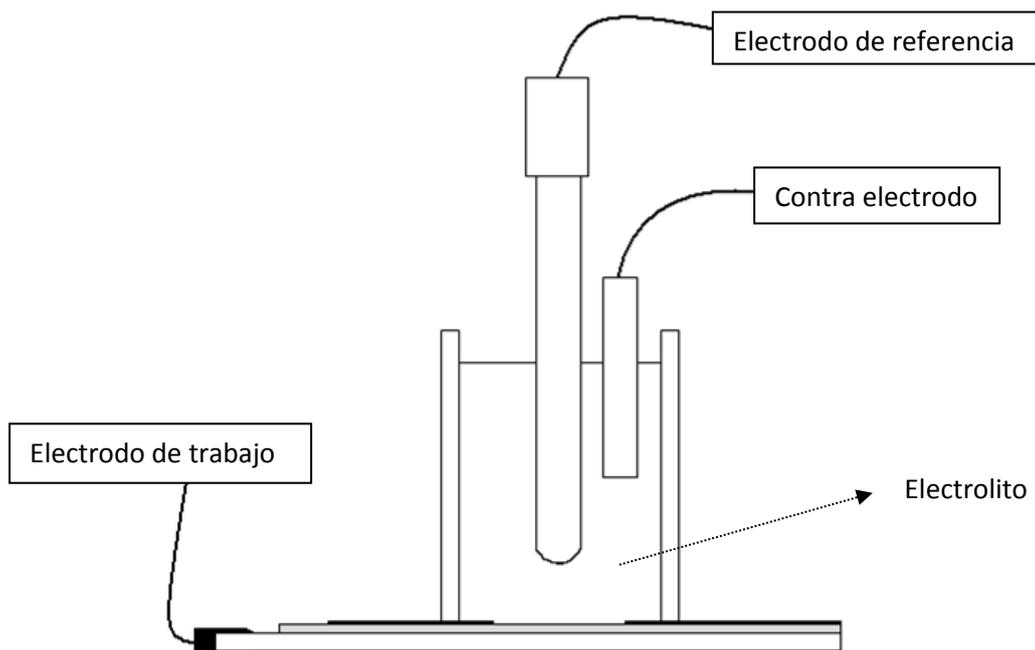


Figura 18. Celda electrolítica.

El equipo utilizado para realizar la señal sinusoidal al electrodo de trabajo en la celda electroquímica es un potenciostato-galvanostato AUTOLAB ECO CHEMIE PGSTAT30. Las medidas se obtienen aplicando un barrido de frecuencias de 0.1 a 100000 Hz y una amplitud de señal sinusoidal de ± 10 mV.

De este modo, una vez programado el sistema, se van realizando medidas a diferentes tiempos (0, 1.5, 3, 4, 6, 8, 10, 24 y 48 h) para ir analizando como se ve afectado el recubrimiento por estar en contacto con el electrolito; siendo el software del equipo, denominado Frequency Response Analyzer (FRA), el encargado de aplicar la señal sinusoidal y analizar la respuesta en el rango de frecuencias de trabajo. Se analizan dos replicas por cada material.

La interpretación del espectro de impedancias se realiza mediante circuitos eléctricos equivalentes. De esta forma cada proceso se puede representar con un elemento eléctrico y la combinación de estos elementos describe el sistema electroquímico y los procesos que se producen en él. En este punto, es sumamente importante seleccionar el modelo eléctrico adecuado para que éste represente adecuadamente el sistema estudiado.

Una vez realizado los ensayos y definido el circuito equivalente que representa al sistema se procede a la modelización de los datos obtenidos para calcular el valor de los parámetros del circuito. Esta modelización se realiza mediante el software ZView con el objetivo de obtener los valores representativos de la resistencia y de la permeabilidad del recubrimiento [49].

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

En este sentido, se ha realizado, por un lado, ensayos de perfilometría mecánica para caracterizar la rugosidad de los distintos materiales; por otro lado para verificar el buen recubrimiento de los implantes dentales se ha recurrido al Microscopio de Barrido Electrónico (SEM).

Perfilometría mecánica:

La rugosidad del biomaterial es un parámetro importante en el anclaje celular, por este motivo es importante caracterizar esta propiedad. Para ello se utiliza un Perfilómetro Mecánico modelo Dektack 6 de la empresa Veeco que permite la caracterización del perfil y de la rugosidad de estas superficies.

Se realizan recubrimientos en placas de acero inoxidable por dip-coating con cada material y se toman tres medidas de cada uno de ellos, obteniendo tanto el perfil como los parámetros de rugosidad.

Microscopía de Barrido Electrónico (SEM):

Esta técnica se basa en la interacción de un haz de electrones con el material a estudiar. El haz realiza un barrido coordinado generando diferentes tipos de señales que permiten obtener información morfológica de la muestra estudiada. Esto permite

realizar imágenes de gran resolución, pudiendo así examinar detenidamente las muestras.

Las muestras a estudiar no necesitan ser preparadas puesto que pueden conducir la electricidad. En el caso de que éstas no fuesen conductoras eléctricas deberían ser recubiertas con una fina capa de carbono o de algún metal como platino u oro para convertirlas en conductoras.

Se utiliza un Microscopio de Barrido Electrónico Leica-Zeiss LEO 440 con un cañón de electrones 1-30 kV, LaB6 i W.

Para llevar a cabo el análisis se recubren tornillos de titanio granallado por dip-coating con la composición óptima, con el objetivo de verificar que se logra un recubrimiento adecuado del implante a pesar de la complejidad de forma de éste.

CAPÍTULO 3

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se van a exponer los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados para caracterizar físico-químicamente los materiales estudiados. Además, se van a analizar y comentar estos resultados con la finalidad de decidir cuál de los recubrimientos es el más apropiado para la aplicación a la que van destinados.

3.1 SÍNTESIS DE LA SERIE DE RECUBRIMIENTOS SOL-GEL DE BASE SILICIO CON DISTINTO CARÁCTER INORGÁNICO

Dentro del objetivo de estudio de la serie de composiciones basadas en la adición de distintos porcentajes de TEOS al sistema de referencia 50% MTMOS-50% GPTMS, se debía comprobar el grado de compatibilidad de estos precursores y ver la viabilidad de este tipo de recubrimientos.

Como ya se ha explicado en el capítulo anterior, se van a incorporar a este sistema diferentes porcentajes de TEOS manteniendo la proporción MTMOS:GPTMS igual a 1; elaborando así diferentes composiciones triples con estos tres precursores.

Con este objetivo, se realizaron distintas síntesis aumentando progresivamente el porcentaje de TEOS, comprobándose que el sistema triple aceptaba cualquier proporción y que incluso era viable la realización de un recubrimiento 100% TEOS.

Una vez comprobado que la adición de TEOS permitía la realización de recubrimientos en todo el rango de composiciones, se fijaron un total de cinco porcentajes que representasen todo este espectro.

De este modo, se definen los materiales 45M:45G:10T, 35M:35G:30T, 25M:25G:50T, 15M:15G:70T y 5M:5G:90T para caracterizar la serie.

Se logró sintetizar con éxito los cinco materiales siguiendo la metodología anteriormente comentada, obteniendo en todo el rango de composiciones un sol transparente, incoloro y homogéneo.

Además se realizaron distintos tipos de muestras con estos materiales según las necesidades de las pruebas a realizar.

Se obtuvieron films libres de los cinco materiales, comprobando que a medida que aumentaba el porcentaje de TEOS el film era menos flexible y más quebradizo.

También se lograron realizar recubrimientos con los cinco materiales y la referencia, obteniendo en todos los casos un recubrimiento homogéneo, transparente, brillante y bien adherido al sustrato, así en la figura 19 se muestran planchas de acero inoxidable perfectamente recubiertas con los distintos materiales.

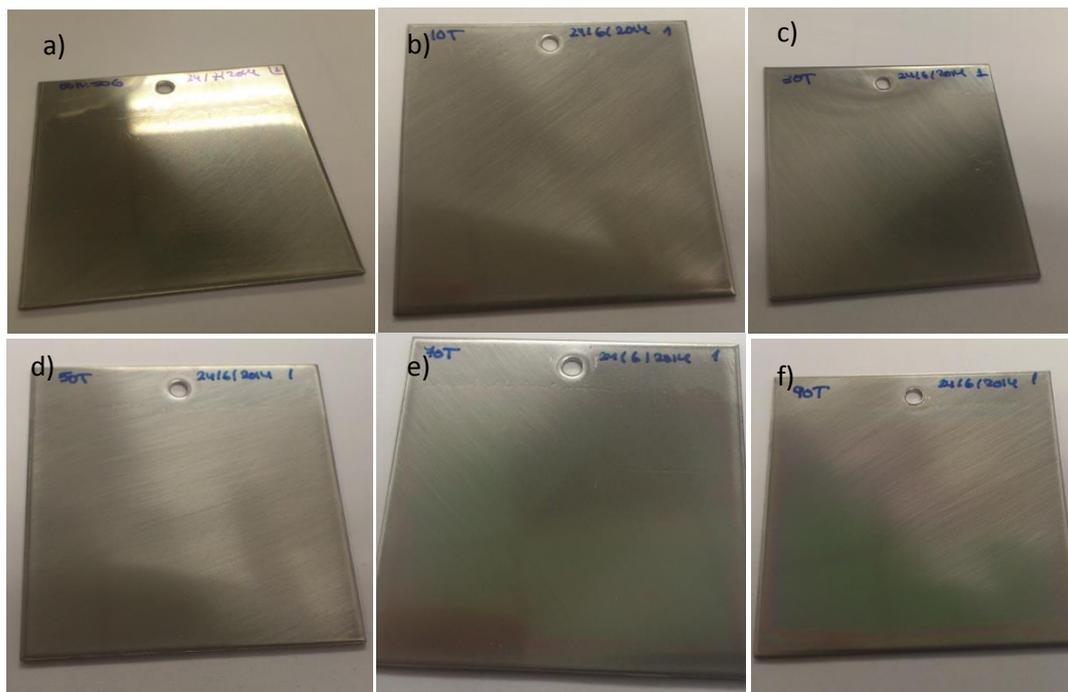


Figura 19. Planchas de acero inoxidable recubiertas con sol-gel híbrido (a: referencia; 50M:50G, b: 45M45G10T, c: 35M35G30T, d: 25M25G50T, e: 15M15G70T, f: 5M5G90T)

3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

3.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL ÁTOMO DE SILICIO (Si-RMN)

La posición de la señal de silicio en el dominio del espectro de frecuencias del RMN refleja el entorno inmediato del núcleo de silicio, permitiendo así evaluar el grado de reticulación obtenido tras las reacciones de hidrólisis y condensación del sol-gel.

La señal de los átomos de silicio unidos a tres oxígenos se codifica con la letra T, mientras que la señal de los unidos a cuatro oxígenos se les codifica con la letra Q. Puesto que las señales del GPTMS y del MTMOS se solapan, la letra T simboliza conjuntamente a los compuestos MTMOS y GPTMS y la letra Q al TEOS.

Por otro lado, a las letras T y Q se les añade un superíndice n, que indica el grado de condensación (Q^n y T^n), por tanto este superíndice muestra el número de formaciones siloxano respecto de cada átomo de silicio.

Para las estructuras Q^n se espera que la señal obtenida se encuentre en un rango de δ comprendido entre -80 y -120 ppm, mientras que las estructuras T^n se encuentran en el rango comprendido entre -40 y -80 ppm [47]. Esta información se visualiza mejor en la figura 20.

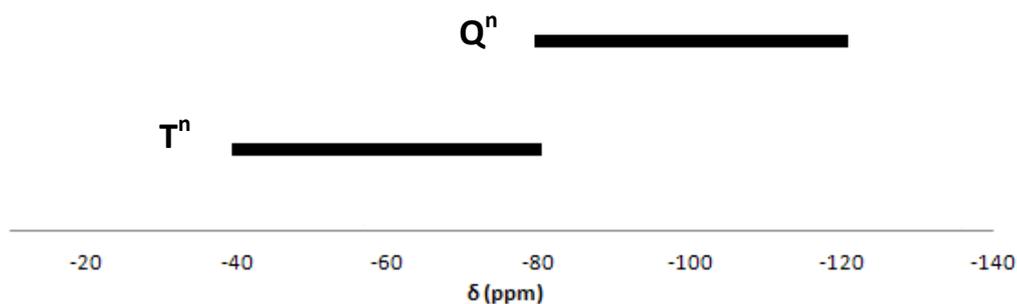


Figura 20. Desplazamiento químico de Si en función del grado de condensación.

Además dentro de estos rangos, a medida que las especies estén más condensadas se obtendrá la señal en un valor más negativo de δ .

En la tabla 2 se muestran los valores del desplazamiento químico a los cuales se encuentra cada señal T^n y Q^n :

δ (ppm)					
T^1	T^2	T^3	Q^2	Q^3	Q^4
-52	-60	-70	-100	-114	-118

Tabla 2. Valores de δ del Si-RMN [47].

En la figura 21 se muestra el Si-RMN de sólidos del material de referencia 50M:50G:

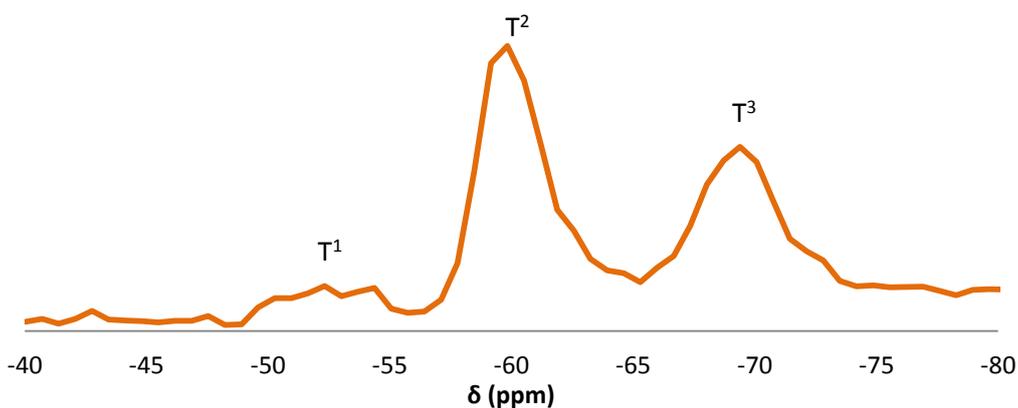


Figura 21. Espectro Si-RMN de sólidos del 50M:50G [47].

Se observan señales asociadas al entorno del átomo de silicio del tipo T^1 , T^2 y T^3 , según la tabla que muestra los valores del desplazamiento químico para cada señal.

De este modo, siguiendo las pautas marcadas en el capítulo anterior se preparan los cinco materiales mediante la técnica sol-gel con una relación estequiométrica agua-precursores 1:1 molar, un pH igual a 1 y un curado en estufa durante el tiempo y temperatura correspondiente.

En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos con los materiales de la serie en estudio:

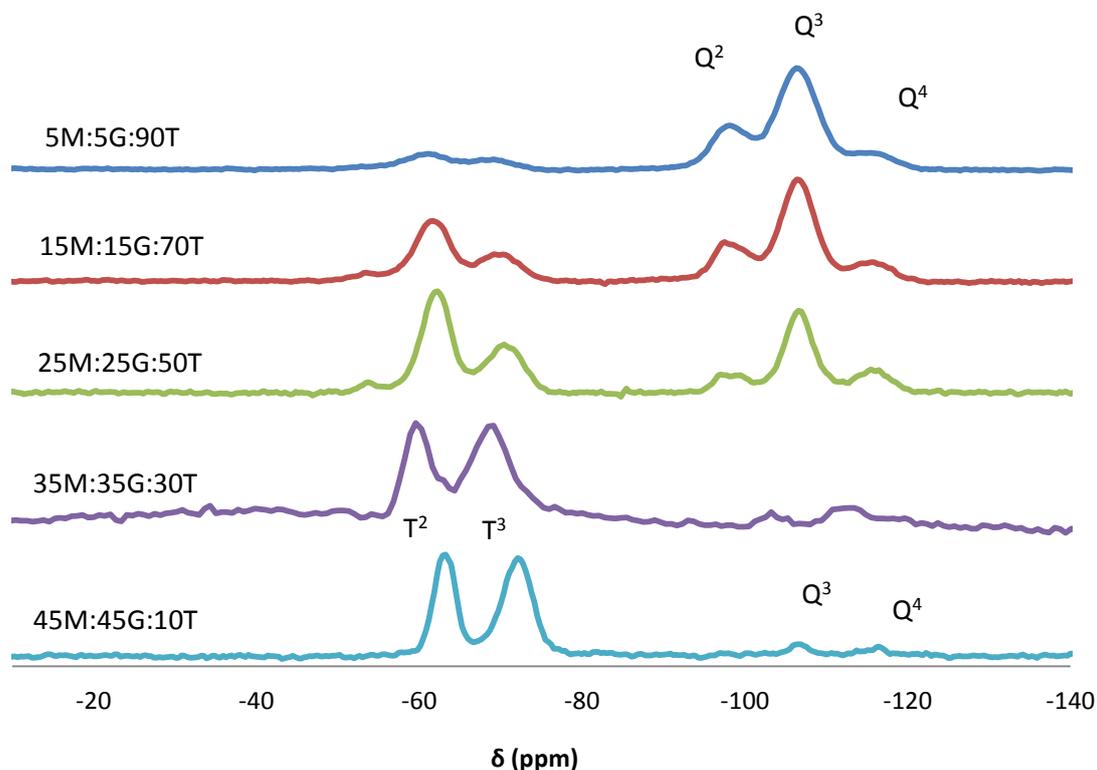


Figura 22. Espectro Si-RMN de sólidos de la serie con distinto carácter inorgánico.

Al añadir TEOS en distintos porcentajes a la composición de referencia se observan señales asociadas a entornos del átomo de silicio del tipo T^2 , T^3 y Q^2 , Q^3 y Q^4 .

En los espectros no aparecen las señales del T^0 y del Q^0 , que representan a los precursores sin reaccionar, ni las señales de T^1 y Q^1 ; esto muestra que las reacciones de condensación se han desarrollado correctamente y que los métodos de obtención de los recubrimientos y las condiciones de su curado son adecuados ya que buena parte de las posiciones alrededor de los átomos de silicio se han condensado en grupos siloxano Si-O-Si.

A medida que se añade más proporción de TEOS a la composición se observa como las señales Q^n van siendo más intensas y como las T^n , características del GPTMS y el MTMOS, se van atenuando debido a que hay menos cantidad de estos precursores para condensar.

La adición de un nuevo precursor no impide la condensación, sino que la favorece. Al añadir a la composición 50M:50G una pequeña cantidad de TEOS, obteniendo la

composición 45M:45G:10T se observa como la señal del T¹ desaparece y aumentan las del T² y T³, lo que supone una mejora del grado de reticulación de la red.

Esto se debe a que el TEOS es una molécula pequeña y puede acceder y anclarse fácilmente en las posiciones del átomo de silicio que no reaccionan en la composición de referencia.

Sin embargo, al llegar a composiciones con un porcentaje de TEOS importantes aumenta la dificultad para llegar a estas posiciones libres del GPTMS y del MTMOS, puesto que la red está constituida principalmente por cadenas de TEOS. Esto es lo que explica que a partir de la composición 25M:25G:50T la señal de T² sea más intensa que la de T³ y que a la señal Q² acabe teniendo más intensidad que la Q⁴ a partir de la composición 15M15G70T.

3.2.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRASFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Mediante los ensayos de FT-IR se han estudiado las diferencias entre las estructuras químicas de la serie en función de la cantidad de TEOS añadida a la composición.

El TEOS hace que la red del sol-gel tenga un carácter más inorgánico; así, a medida que se aumenta su presencia en el material, se está reduciendo el porcentaje de materia orgánica característica del MTMOS y del GPTMS; además aumenta la proporción de red polisiloxánica (Si-O-Si) respecto a la composición de referencia 50M:50G, como se ha visto en los ensayos de RMN.

Para llevar a cabo los ensayos, se preparan films libres con los distintos materiales y se realizan las medidas con ayuda de un ATR.

En la figura 23 se muestran los espectros obtenidos:

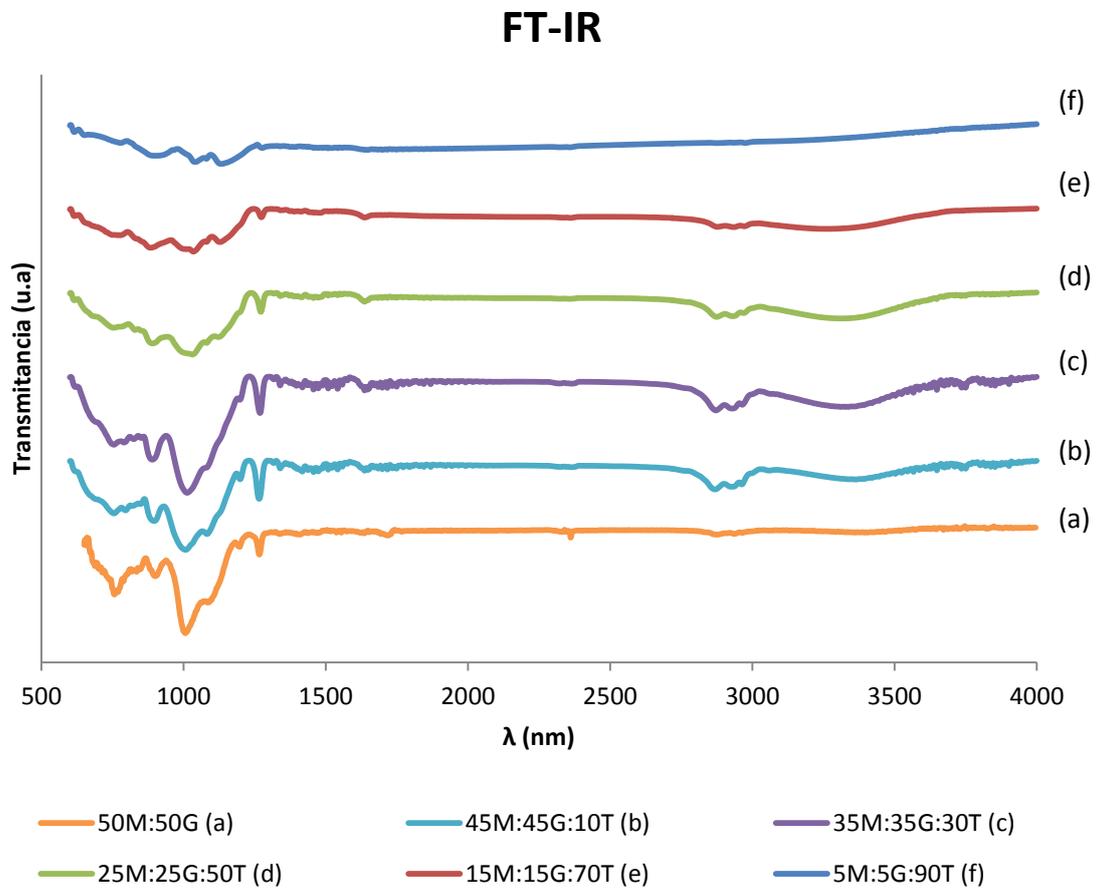


Figura 23. Resultados de la espectroscopia infrarroja (FT-IR) de los materiales 50M50G [47], 45M45G10T, 35M35G30T, 25M25G50T, 15M15G70T, 5M5G90T.

A continuación, se procede a identificar las señales que aparecen en los espectros obtenidos; así, este análisis se muestra en la figura 24.

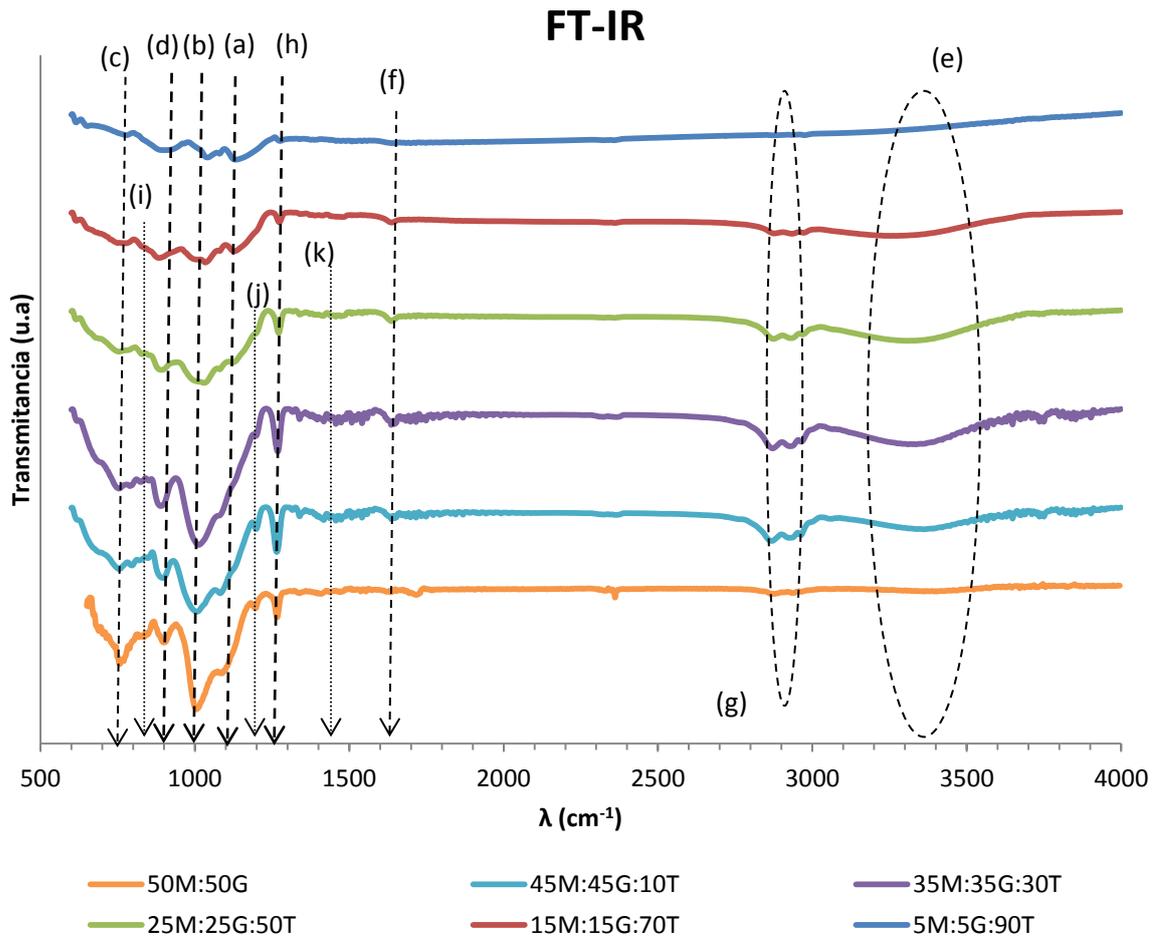


Figura 24. Análisis de la espectroscopia infrarroja (FT-IR) de los materiales 50M50G [47], 45M45G10T, 35M35G30T, 25M25G50T, 15M15G70T, 5M5G90T.

En el espectro obtenido se pueden identificar los diferentes grupos funcionales presentes en las redes formadas.

Se detecta una región asociada a las vibraciones de la sílice estructural alrededor de $700 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ [51]. En torno a los 1100 y 1010 cm^{-1} aparece la banda de vibración característica de la red Si-O-Si, señales (a) y (b) respectivamente; la primera de las bandas representa la red polisiloxánica con una estructura longitudinal (LO), mientras que la segunda representa una estructura transversal (TO) [51-53].

A 780 cm^{-1} (señal c) se observa una banda asociada a la vibración simétrica de los átomos de oxígeno del enlace Si-O-Si, que surge por la formación de red inorgánica [53].

Además a una longitud de onda de 890 cm^{-1} (señal d) aparecen las bandas asociadas a la vibración de los grupos terminales Si-OH [51-53].

Por otro lado, se observan las bandas asociadas a la vibración de grupos hidroxilos entre $3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$. De esta forma se observa que en torno a 3350 cm^{-1} (señal e) aparece una banda ancha correspondiente a los grupos OH que no han condensado en el curado [51].

Los materiales con señales (d) y (e) más intensas tendrán mayor número de grupos hidroxilo. Estos son los materiales con un 10% y un 30% de TEOS.

A longitudes de onda de 1630 cm^{-1} se encuentra la señal (f), consecuencia de la vibración de moléculas de agua en la red [51-52].

También se identifican las bandas producidas como consecuencia de la materia orgánica introducida en la red con los precursores MTMOS y GPTMS.

De esta forma en la señal (g), entre 2870 y 2950 cm^{-1} [51, 54], se encuentra la banda detectada como consecuencia de las vibraciones producidas por los enlace C-H.

Por otro lado, a una longitud de onda de 1265 cm^{-1} se detecta la señal (h) característica de los enlaces Si-C presentes en los precursores GPTMS y MTMOS [51].

Además se detectan señales más pequeñas como la (i) a 820 cm^{-1} , que se identifica con el enlace C-C del GPTMS [51]. Y a 1200 cm^{-1} se identifica la señal característica del anillo epoxi (j) [47].

Se reconoce otra señal, k, a una longitud de onda de 1450 cm^{-1} , esta banda se corresponde a las vibraciones producidas por los enlaces O-C-H [51].

Estas señales son más intensas en aquellos materiales con menor proporción de TEOS.

En conclusión, el FT-IR indica que se ha formado red Si-O-Si, por tanto, las reacciones de condensación se han desarrollado correctamente, puesto que se ha logrado obtener una red con la reticulación deseada; demostrando que el proceso de obtención de los recubrimientos es adecuado para todos los materiales. Además, se ha demostrado la presencia de moléculas orgánicas en la red introducidas con los precursores GPTMS y MTMOS, por lo que durante el procesado de los materiales se ha logrado incorporar estas moléculas bioactivas a la estructura, manteniendo la integridad de estos grupos funcionales.

3.3 CARACTERIZACIÓN TÉRMICA

3.3.1 TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)

En el análisis termogravimétrico se somete al material a un tratamiento térmico detectando las variaciones de peso que se producen en la muestra.

En la figura 25 se muestran las curvas de pérdida de peso (TG) y la derivada de la pérdida de peso (dTG) para los materiales 25M25G50T, 15M15G70T y 5M5G90T. Queda pendiente la realización de los ensayos con el resto de materiales y con la referencia, no ha sido posible incluirlos en este trabajo para la fecha de entrega por problemas técnicos con el equipo en Servicios Centrales de la Universitat Jaume I.

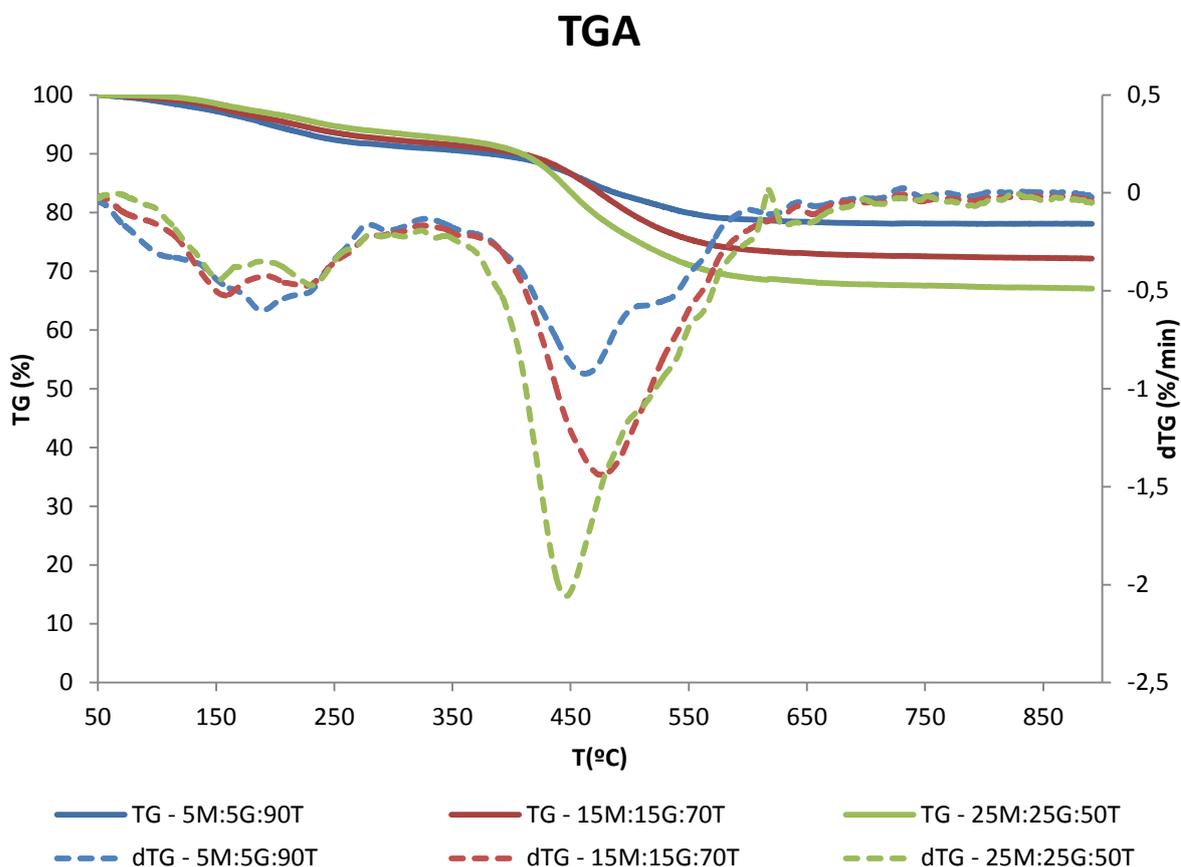


Figura 25. Curvas de TGA.

Al analizar las curvas obtenidas, se observa que la pérdida de peso total de estos materiales se encuentra comprendida entre valores del 20 y el 30 %. Este valor de pérdida de peso disminuye a medida que aumenta el porcentaje de TEOS en la

composición, al igual que el valor de dTG máximo; esto se debe a que a medida que aumenta la cantidad de TEOS el material es más inorgánico.

En la tabla 3 se muestran las pérdidas de peso finales de los materiales estudiados:

Materiales	Pérdida de peso (%)
25M25G50T	33
15M15G70T	27
5M5G90T	20

Tabla 3. Pérdida de peso final.

Los valores de residuo son elevados puesto que en el ensayo no se alcanzan temperaturas suficientes como para degradar la red inorgánica Si-O-Si, de carácter y comportamiento correspondiente a material cerámico.

En las curvas obtenidas se detectan diferentes procesos:

- A temperaturas alrededor de 100°C se observa un proceso de pérdida de peso que podría deberse a la eliminación del agua libre y del isopropanol que ha podido quedar en la red tras el proceso de curado.
- A temperaturas comprendidas entre 150 y 200°C se observa otra etapa de pérdida de peso que podría deberse a la eliminación grupos OH sin condensar en el material. Esto estaría relacionado con reacciones de curado que se llevan a cabo con los grupos silanoles no condensados que quedan en el material. Estas reacciones dan como producto agua que se eliminaría y sería la responsable de la pérdida de peso detectada.
- A temperaturas entre 350 y 550 °C se produce un proceso de degradación que podría deberse a la eliminación de la materia orgánica presente en el material.

3.3.2 CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)

Para estudiar las transiciones térmicas experimentadas por las diferentes composiciones al ser sometidas a temperatura, se recurre a ensayos de calorimetría de barrido diferencial (DSC).

Así, en la figura 26 se muestran las curvas obtenidas tras la realización de un ciclo de temperaturas de 45 a 250°C con una velocidad de calentamiento de 10 C°/min. La medida del material de referencia se realiza en un intervalo más amplio, de 45 a 300°C y a la misma velocidad de calentamiento.

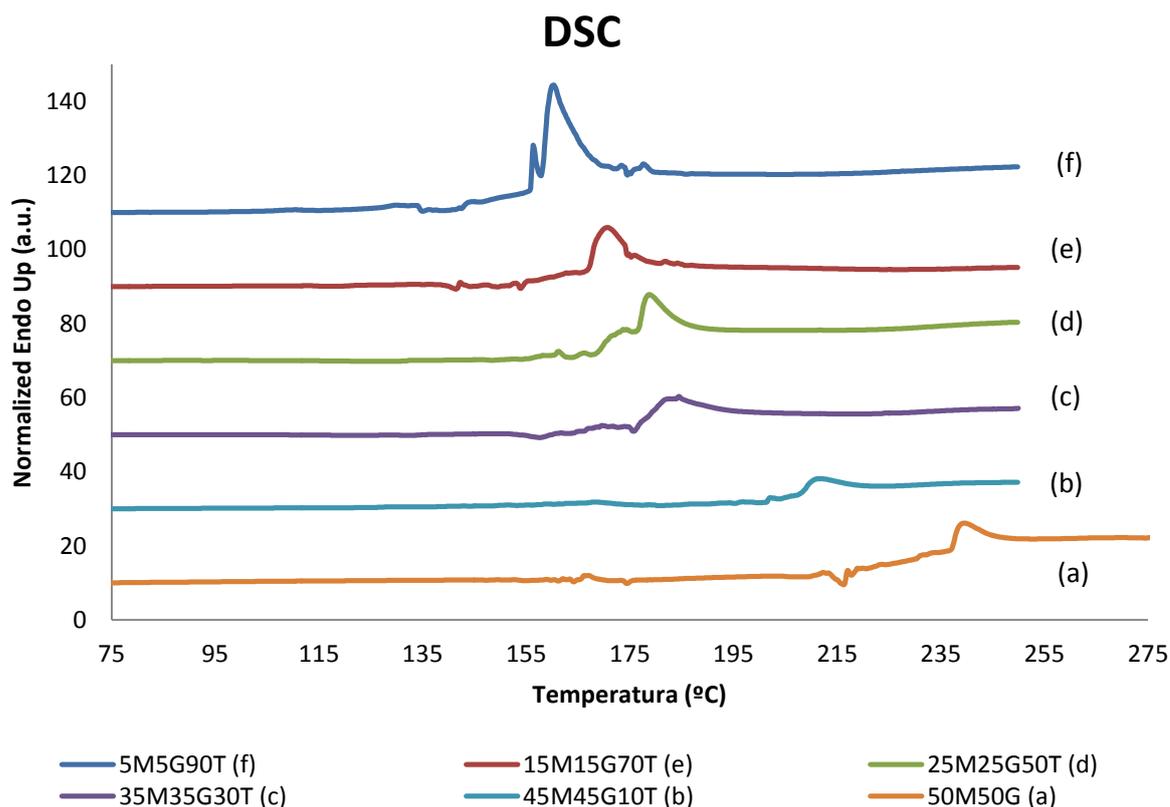


Figura 26. Curvas de DSC.

Como se puede observar en las curvas, en éstas se produce un cambio de altura debido a que al alcanzar una determinada temperatura se produce un aumento en la movilidad estructural de la red vítrea del material.

Además se observa que esta transición se solapa con un envejecimiento del sol-gel que podría deberse a un proceso de estructuración de la red, este proceso de envejecimiento se intensifica al aumentar el contenido en TEOS por ser el componente estructural más simple de los que componen el material.

Además se observa que la T_g característica de estos materiales se desplaza a temperaturas más bajas a medida que se aumenta la proporción de TEOS en la estructura.

En la figura 27 se muestran los valores de T_g y de ΔC_p obtenidos a partir de las curvas anteriores:

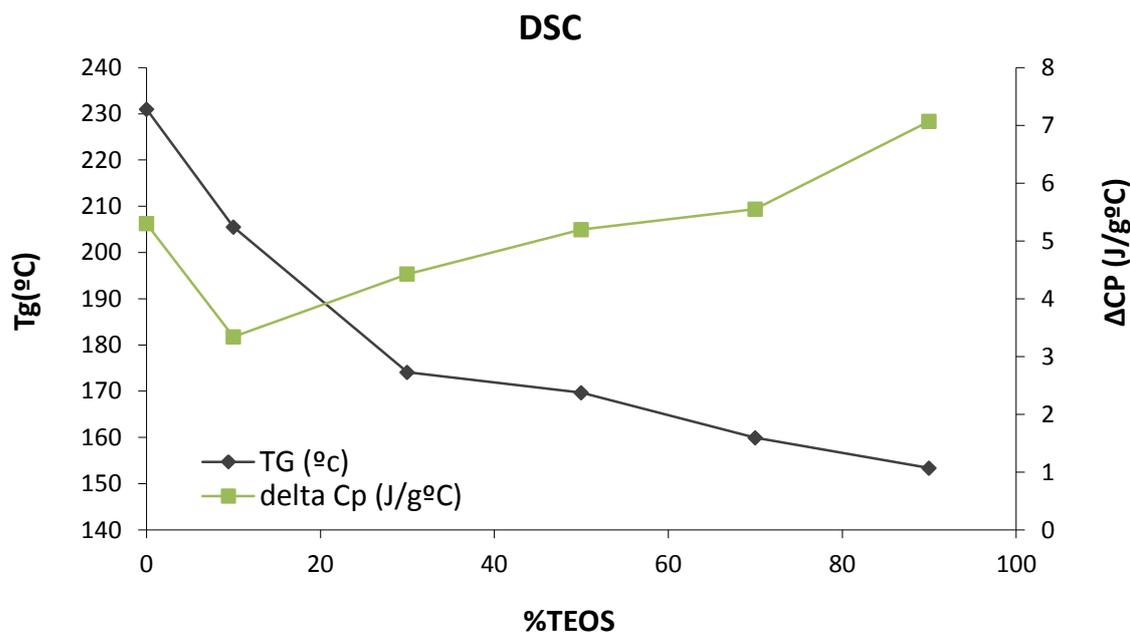


Figura 27. TG de la serie de materiales estudiados.

Como se puede observar en la imagen anterior, el valor de Tg disminuye a medida que se aumenta la proporción de TEOS en la composición del material, esto se debe a que al aumentar el contenido de este precursor, que es estructuralmente más simple, la red se basa en cadenas más cortas y estructuras más sencillas, lo que favorece la dinámica molecular, requiriendo menores niveles de energía para iniciar la movilidad molecular.

Respecto al valor de ΔC_p se observan dos comportamientos diferentes. Al añadir una pequeña proporción de TEOS, es decir, al pasar de la referencia 50M:50G a la composición 45M:45G:10T se detecta una disminución del valor de este parámetro. Sin embargo, al añadir una mayor proporción de TEOS su valor aumenta.

La explicación a este fenómeno podría deberse a que la presencia de TEOS podría favorecer la apertura del anillo epoxi del GPTMS, tal como más adelante se verá en los resultados del ángulo de contacto, lo que provocaría una disminución de la movilidad de la red y, consecuentemente, de su capacidad de almacenar energía, explicando así el comportamiento del sistema a bajos porcentajes de TEOS. Por otro lado, al añadir a la red más cantidad de TEOS debido a su simplicidad aumenta la movilidad estructural del material, la red se basa en cadenas más cortas y más simples que hacen que haya una mayor dinámica molecular y por tanto una mayor capacidad de almacenar energía, provocando un aumento en el valor de ΔC_p ; a la par que disminuye la presencia de los otros precursores, con sus funcionalidades químicas características, como el anillo epoxi.

3.4 PROPIEDADES SUPERFICIALES: ÁNGULO DE CONTACTO

Para determinar y comparar el grado de hidrofilia de los distintos recubrimientos se recurre a la medida del ángulo de contacto.

De la bibliografía se obtiene que el valor del ángulo de contacto para el material de referencia es de $66,9 \pm 2,0^\circ$ [47]. A este material se le va a incorporar un nuevo precursor y se va a aumentar progresivamente su contenido en la red.

Los resultados obtenidos con el resto de materiales de muestran en la tabla 4 y a continuación se representan (figura 28) para poder visualizar mejor las diferencia encontradas:

Recubrimiento	Ángulo de contacto (°)
50MTMOS:50GPTMS	66.9 ± 2.0
45MTMOS:45GPTMS:10TEOS	61.0 ± 1.2
35MTMOS:35GPTMS:30TEOS	60.6 ± 1.0
25MTMOS:25GPTMS:50TEOS	63.5 ± 0.7
15MTMOS:15GPTMS:70TEOS	70.2 ± 0.8
5MTMOS:5GPTMS:90TEOS	70.4 ± 0.7

Tabla 4. Datos del ángulo de contacto de la serie de materiales.

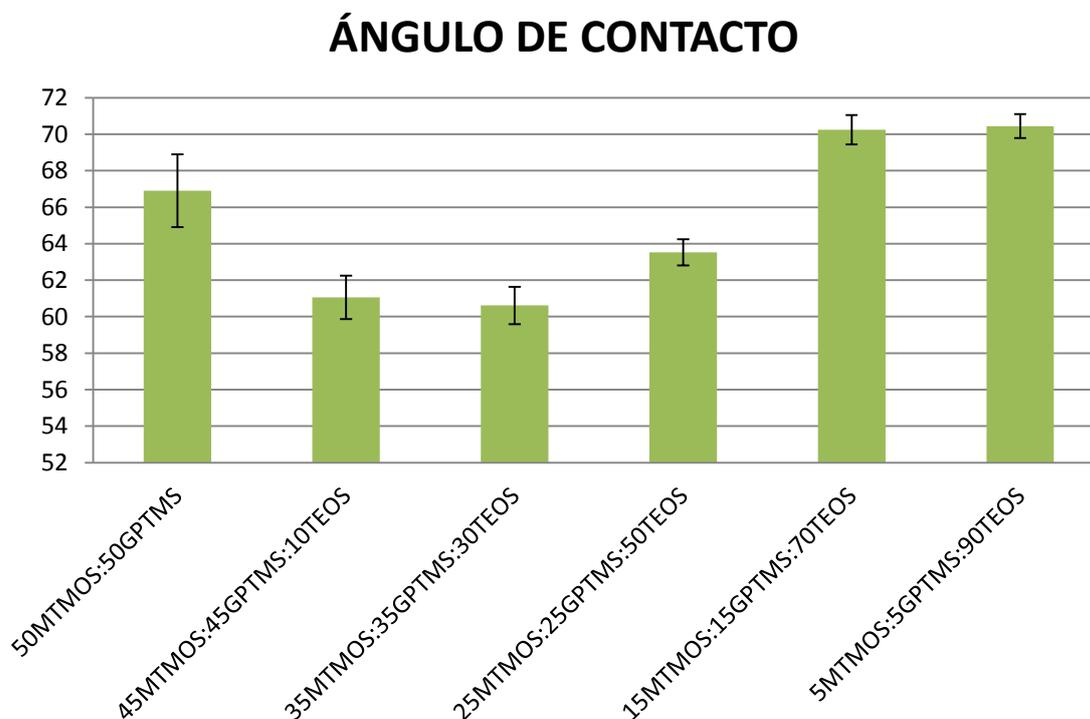


Figura 28. Evolución del grado de hidrofilia de la serie de materiales.

En un principio cabría esperar que al añadir TEOS y aumentar el carácter inorgánico de la red el ángulo de contacto disminuya mostrando un carácter más hidrófilo, puesto que el GPTMS y el MTMOS poseen en su estructura moléculas orgánicas hidrófobas. Sin embargo, como se puede observar en la figura 28 ocurre lo contrario.

Se detectan dos tendencias diferentes, en primer lugar al incorporar en la estructura del 50M:50G el nuevo precursor, en proporciones moderadas, el ángulo de contacto disminuye, es decir, el material se vuelve más hidrófilo; reduciéndose desde un valor de $66,9 \pm 2,0^\circ$, correspondiente al material de referencia, hasta el valor mínimo de $60,6 \pm 1,0^\circ$ correspondiente a la composición 35M:35G:30T.

En segundo lugar, a partir de este valor mínimo al aumentar el contenido en TEOS el ángulo de contacto aumenta, siguiendo una tendencia contraria a lo esperado y alcanzando un valor de $70,4 \pm 0,7^\circ$ para la composición 5M:5G:90T; este valor supone que este material es incluso más hidrófobo que el material de referencia 50M:50G, a pesar de ser mucho más inorgánico.

La explicación a este fenómeno se puede deber a que el anillo epoxi del GPTMS se abre en la red durante el proceso de formación del sol-gel, lo que supone un aumento de grupos silanoles en la estructura. La presencia de estos grupos OH hace que con el precursor GPTMS se puedan obtener recubrimientos hidrófilos, a pesar de que dicho precursor tiene un comportamiento hidrófobo cuando el anillo no se abre [47].

Además, se detecta que la presencia del precursor TEOS favorece este fenómeno de apertura del anillo epoxi; por este motivo al añadir pequeñas proporciones de TEOS a la composición se logra un recubrimiento más hidrófilo aún. Sin embargo, si se añade una proporción mayor al 30% de TEOS, la reducción del contenido de GPTMS en la composición supone una reducción de la cantidad de grupos OH formados a partir de la apertura del anillo epoxi, de modo que el efecto del aumento del carácter inorgánico de la estructura no compensa esta pérdida y el recubrimiento se vuelve menos hidrófilo, como indica el aumento del ángulo de contacto obtenido en los ensayos.

Para la aplicación a la que van destinados estos recubrimientos, los estudios revelan que las superficies hidrófilas parecen ser más deseables que las hidrófobas, puesto que favorecen las interacciones con fluidos biológicos, células y tejidos [5]. Esto se traduce en que para cumplir el objetivo planteado en este estudio y, de este modo, favorecer el proceso de osteointegración, se requiere que el recubrimiento tenga unas propiedades superficiales con carácter de tipo hidrófilo. Por tanto, desde el punto de vista de estos ensayos, los ángulos de contacto revelan que el material de la serie más adecuado sería el 35M35G30T.

3.5 ENSAYOS DE ESTABILIDAD

3.5.1 DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

Este ensayo se realiza con el objetivo de estudiar cómo evoluciona el comportamiento del recubrimiento en lo referente a su degradación al estar en contacto con agua, a medida que se aumenta su carácter inorgánico.

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos, incluyendo la curva de degradación del material de referencia 50M:50G obtenida en la bibliografía [47]:

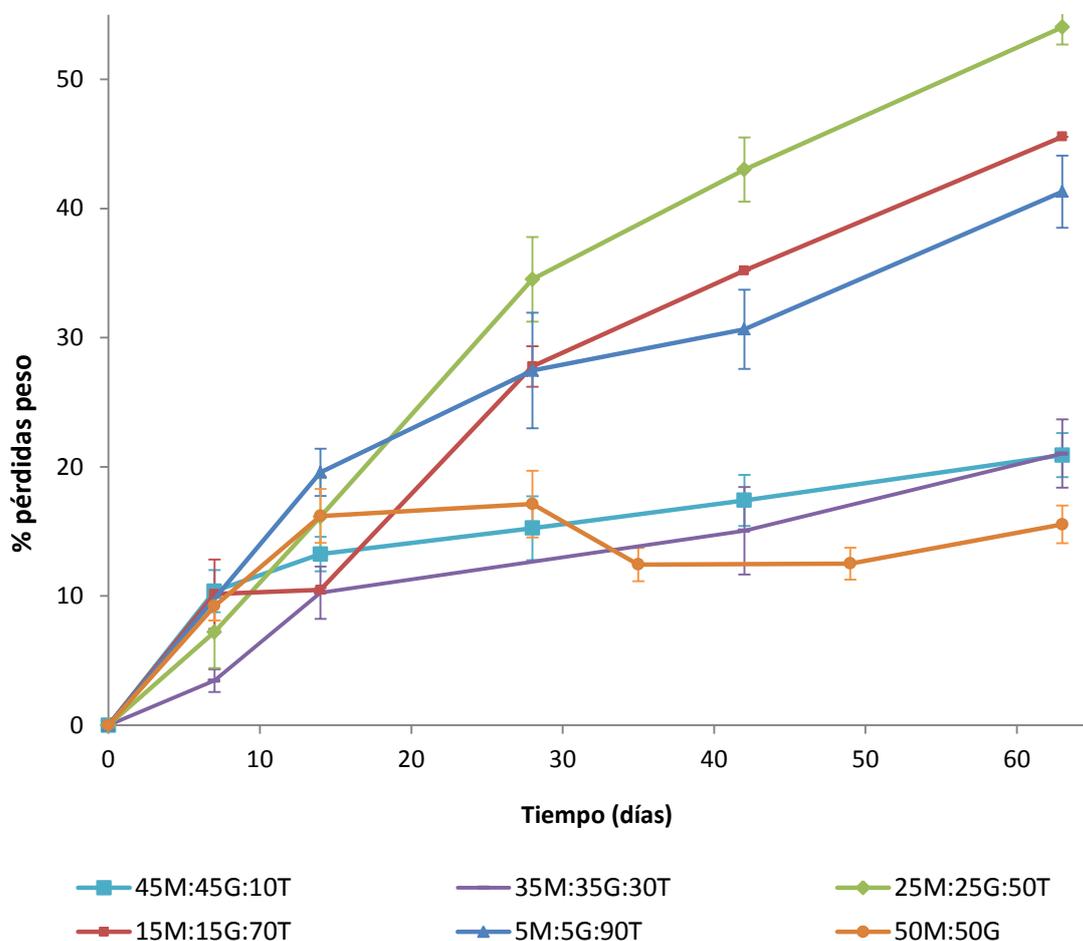
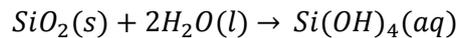


Figura 29. Degradación hidrolítica por pérdida de peso a 37°C.

Se observa que en todos los casos los materiales se degradan pudiendo inferir que esta degradación conlleva una liberación de silicio en el sistema, sin embargo, en función de la composición esta degradación tiene una cinética diferente. Esta liberación de silicio tiene propiedades osteoinductoras [46-47].

La degradación del sol-gel se basa en la siguiente reacción [55]:



Al analizar los resultados obtenidos se determinan dos comportamientos. Al añadir pequeñas cantidades de TEOS a la red vítrea la estructura es más compacta, como se ha concluido a partir de los ensayos de Si-RMN de sólidos. Esto hace que la cinética de degradación sea más lenta que la de la referencia, siendo el 35M35G30T el que mejor comportamiento presenta.

Al añadir cantidades mayores de TEOS la estructura se simplifica y se vuelve más débil, de forma que las composiciones 25M:25G:50T, 15M:15G:70T y 5M:5G:90T presentan una mayor cinética de degradación; alcanzando valores de pérdida de peso entorno al 50% tras 62 días en contacto con agua.

Se requiere una cinética de degradación lenta para que el recubrimiento proteja el implante durante los primeros estadios del proceso de osteointegración, ya que la liberación de iones metálicos podría interferir negativamente en éste.

Como consecuencia de las limitaciones de la técnica empleada, los valores experimentales muestran dispersiones importantes y no es posible determinar con precisión la influencia del contenido en TEOS en la cinética de degradación, más allá de las tendencias apuntadas.

Además se observa que la pérdida de masa del recubrimiento de referencia 50M:50G disminuye a partir del día 28, esto se debe a que la muestra no se ha debido secar bien por la acumulación de muestras en la estufa y esto ha dado como resultado un aumento de la masa en la muestra.

3.5.2 ENSAYOS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

Para la realización de estos ensayos se recubren planchas de acero inoxidable mediante la técnica del dip-coating con los materiales 50M:50G, 45M:45G:10T, 35M:35G:30T, 25M:25G:50T, 15M:15G:70T y 5M:5G:90T.

Estos recubrimientos son puestos en contacto con un electrolito de NaCl al 1% durante 48 horas, manteniendo el área de contacto a $3,14 \text{ cm}^2$, de modo que los ensayos se basan en la medida de la respuesta del sistema ante una señal sinusoidal a diferentes frecuencias.

Los resultados obtenidos en los ensayos de degradación hidrolítica demuestran que los recubrimientos se degradan en mayor o menor medida en función del porcentaje de TEOS añadido a su composición.

Mediante estos ensayos se va a evaluar la capacidad de protección de los recubrimientos, mediante el análisis de dos parámetros: su resistencia al electrolito y su permeabilidad.

Resulta importante evaluar la capacidad de protección que ofrecen los recubrimientos al metal, porque esta es necesaria para evitar la liberación de iones metálicos que pudiesen afectar negativamente al proceso de osteointegración, sobre todo en su primera etapa [2].

Los datos obtenidos en los ensayos son analizados mediante la realización de dos diagramas distintos.

Por un lado el diagrama de Nyquist muestra la impedancia (Z) en el plano complejo, representando su parte real (Z') en el eje de abscisas y su parte imaginaria (Z'') en el eje de ordenadas para las diferentes frecuencias. Como se realizan varias medidas a diferentes tiempos comprendidos de 0 a 48 horas, es posible visualizar cómo evoluciona la impedancia con el tiempo.

Por otro lado, los datos pueden ser representados mediante el diagrama de Bode mostrando el módulo $|Z|$ en escala logarítmica y el ángulo de fase (θ), ambos en el eje de ordenadas, y en el eje de abscisas la frecuencia en escala logarítmica. Al igual que ocurría con el diagrama anterior, al realizar varias medidas en el tiempo es posible observar cómo evolucionan estos parámetros con el tiempo.

En primer lugar en las figuras 30 a 41 se muestran los diagramas de Bode y de Nyquist obtenidos para cada material.

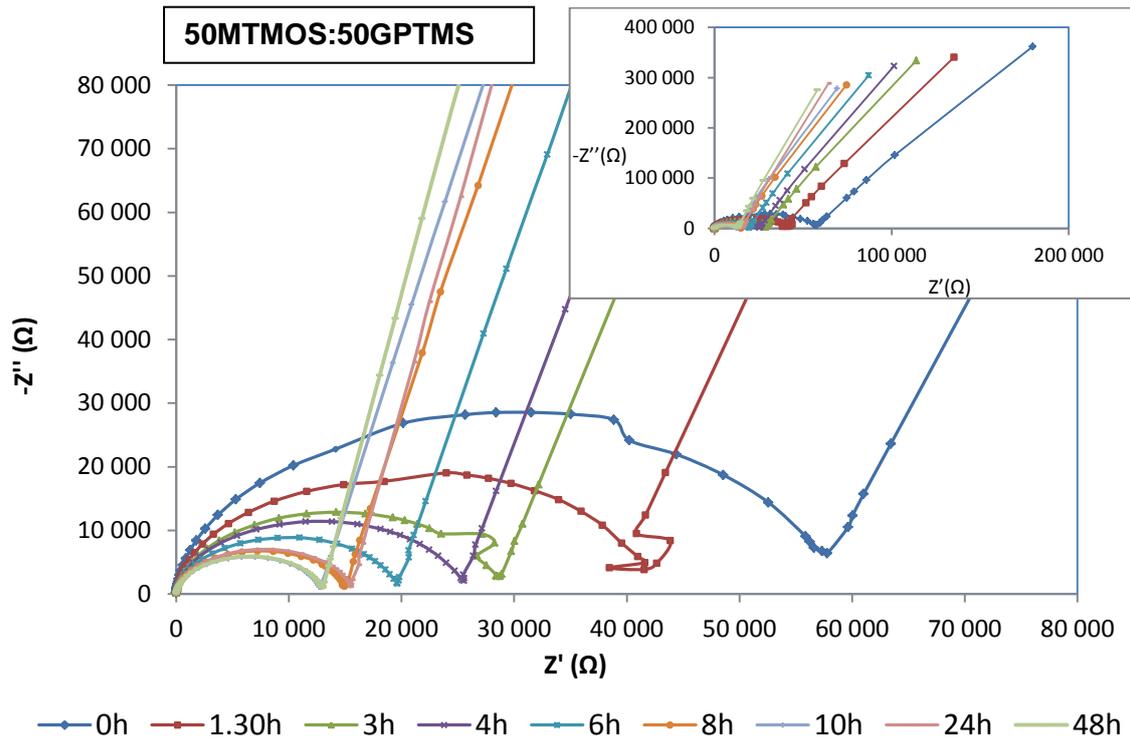


Figura 30. Diagrama de Nyquist de la composición de referencia 50M50G para diferentes tiempos [47].

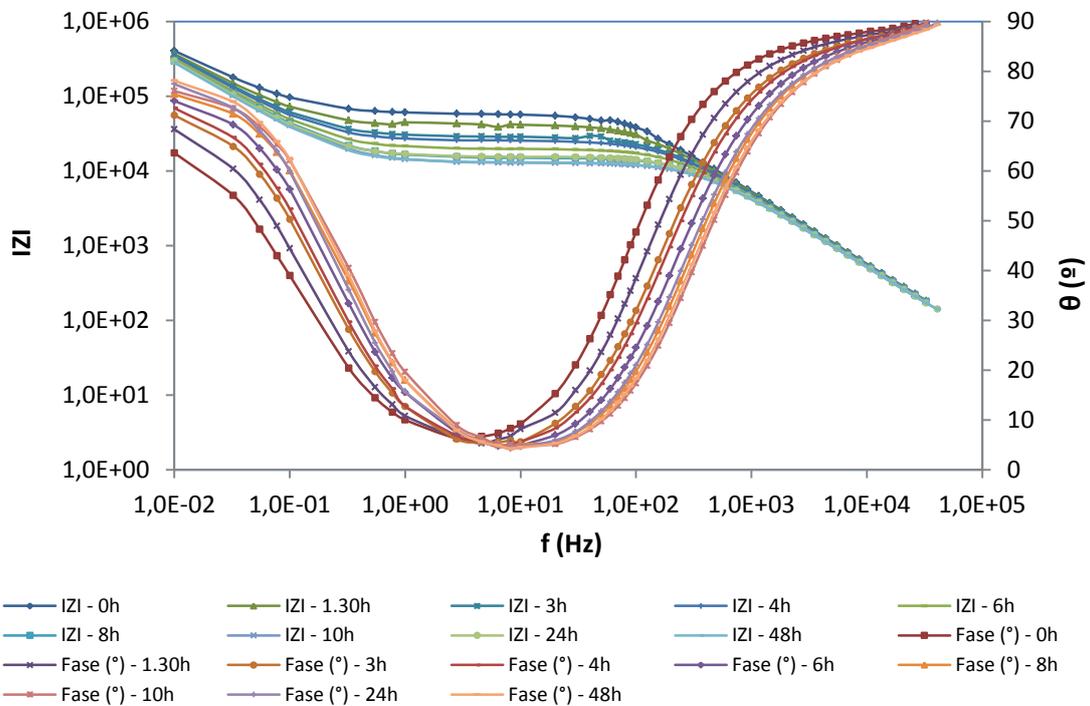


Figura 31. Diagrama Bode de la composición de referencia 50M50G para diferentes tiempos [47].

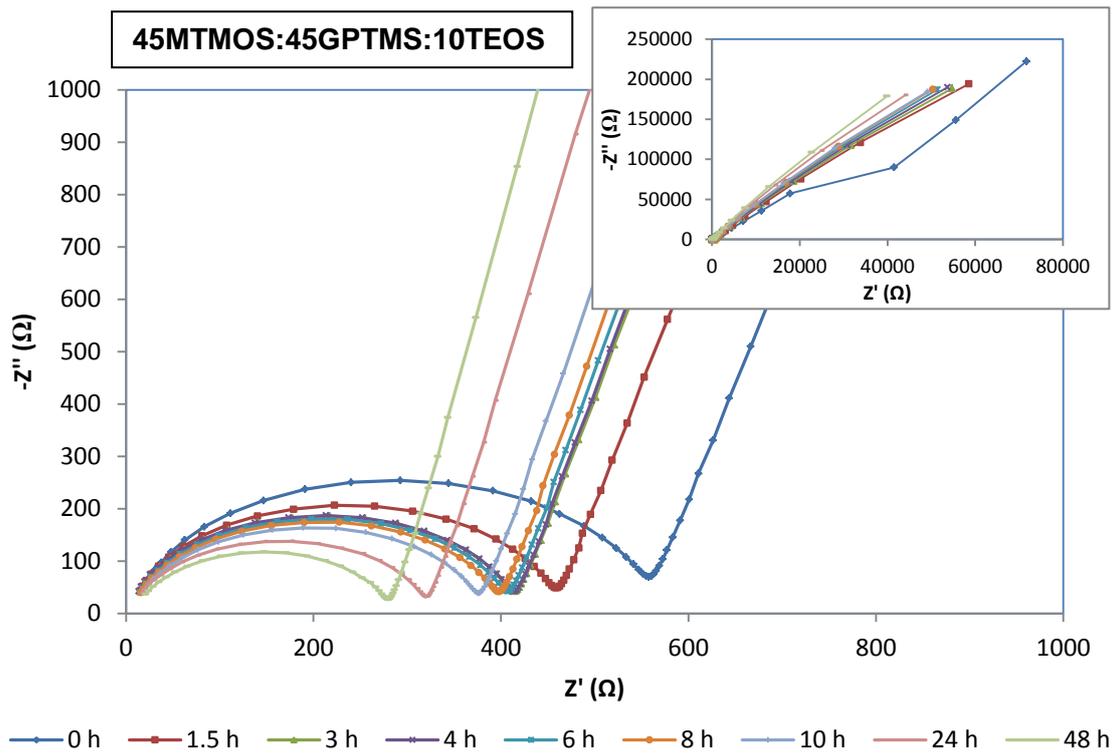


Figura 32. Diagrama de Nyquist de la composición 45M45G10T para diferentes tiempos.

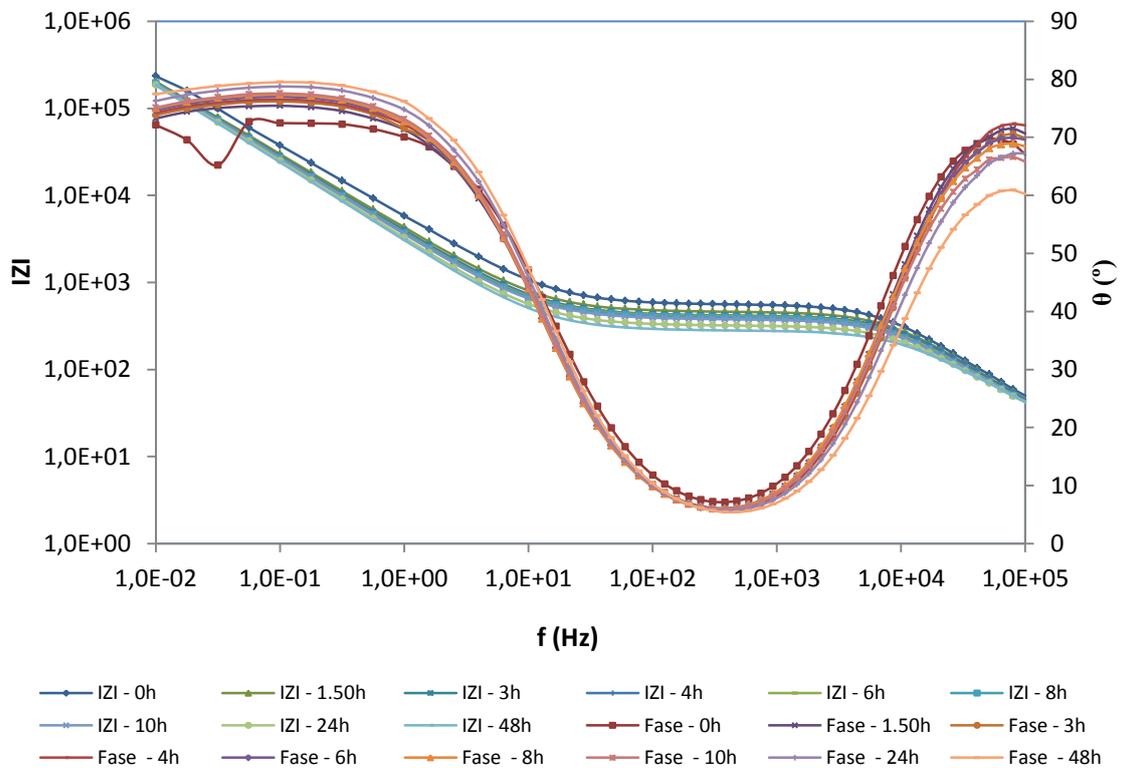


Figura 33. Diagrama Bode de la composición de referencia 45M45G10T para diferentes tiempos.

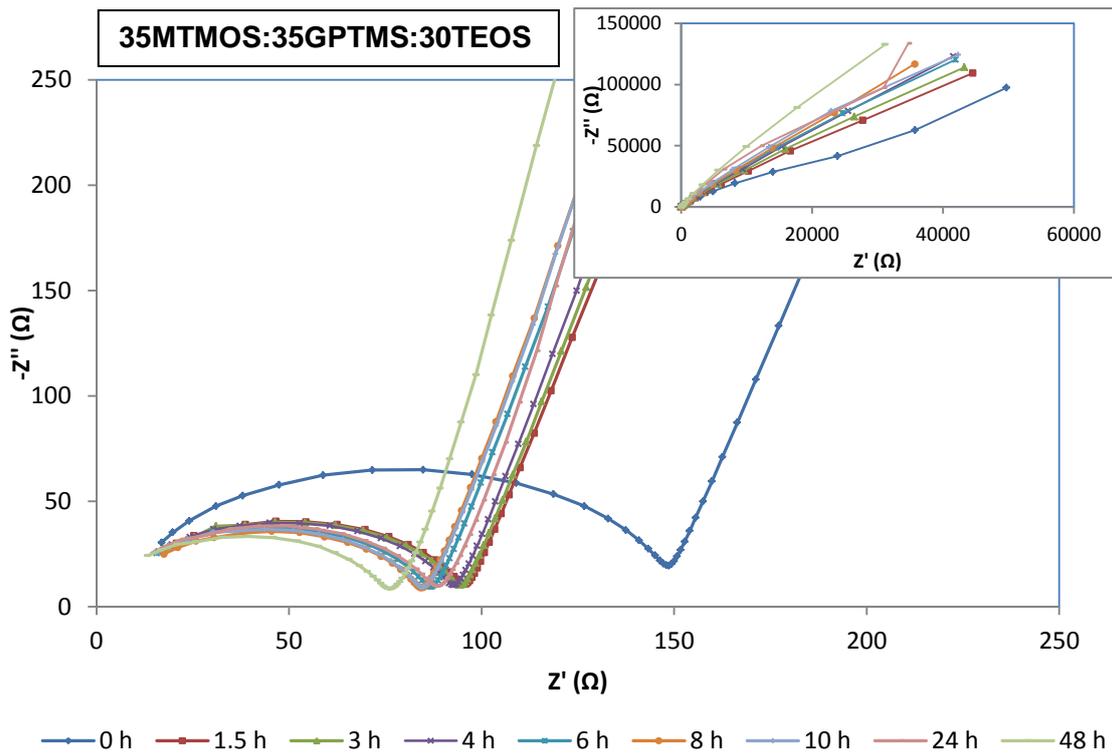


Figura 34. Diagrama de Nyquist de la composición 35M35G30T para diferentes tiempos.

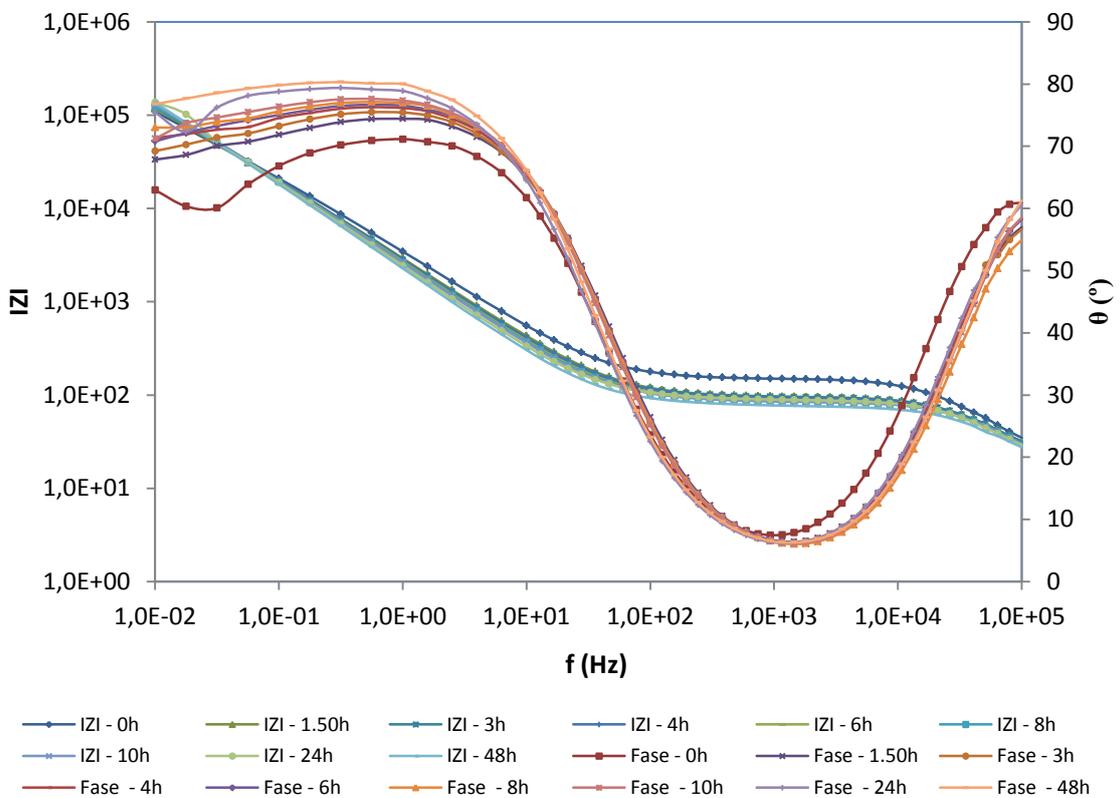


Figura 35. Diagrama Bode de la composición de referencia 35M35G30T para diferentes tiempos.

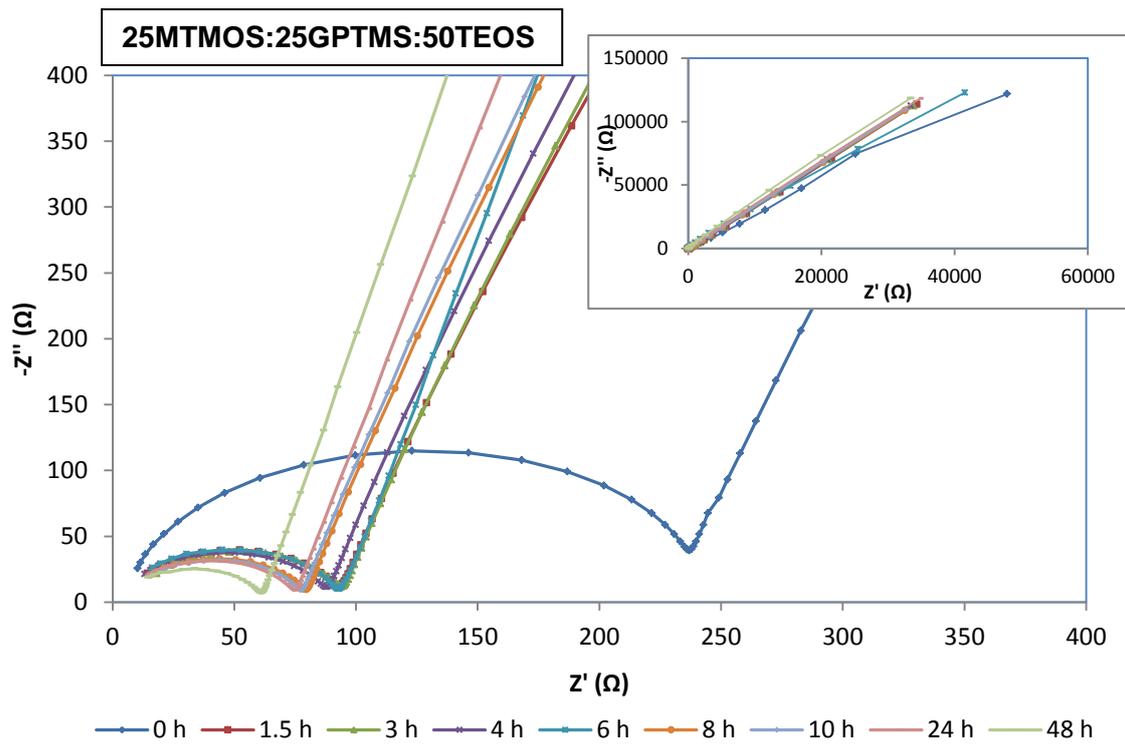


Figura 36. Diagrama de Nyquist de la composición 25M25G50T para diferentes tiempos.

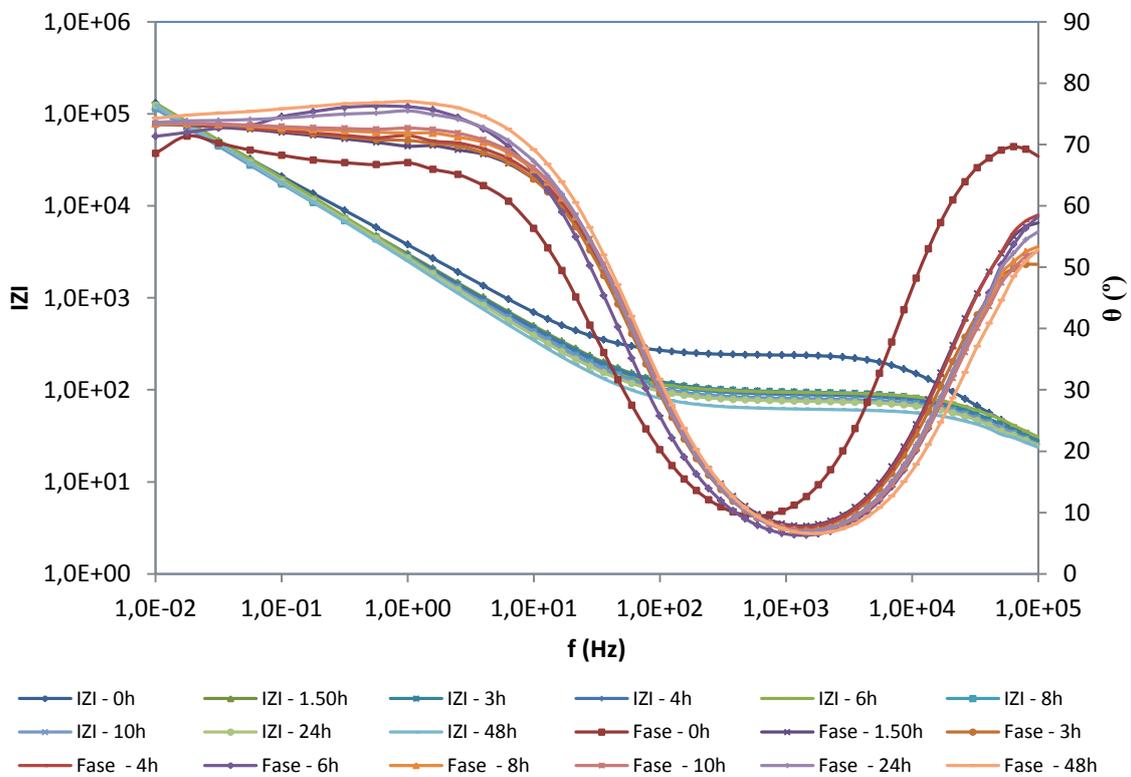


Figura 37. Diagrama Bode de la composición de referencia 25M25G50T para diferentes tiempos.

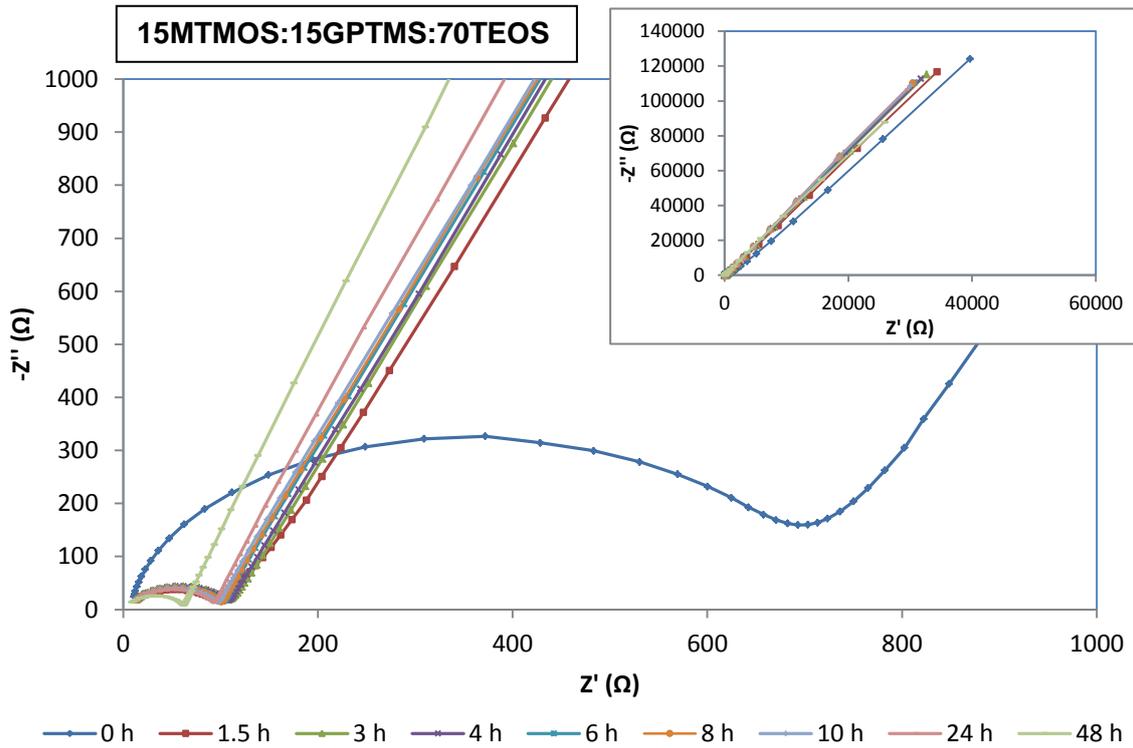


Figura 38. Diagrama de Nyquist de la composición 15M15G70T para diferentes tiempos.

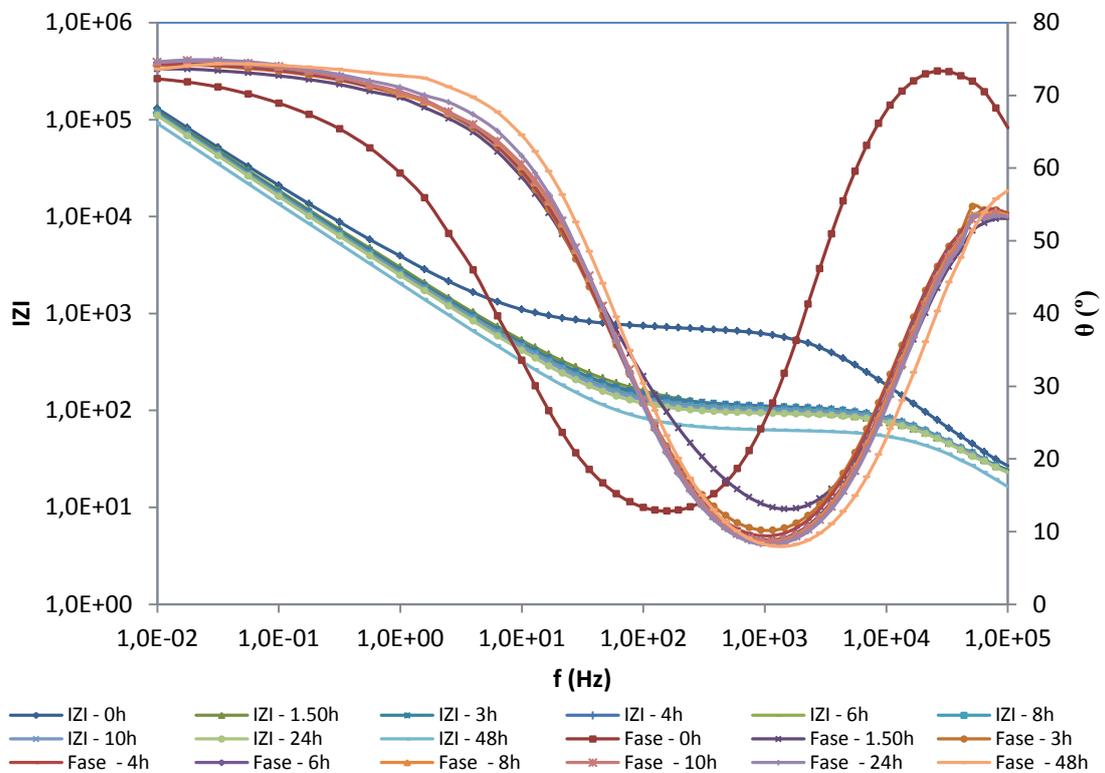


Figura 39. Diagrama Bode de la composición de referencia 15M15G70T para diferentes tiempos.

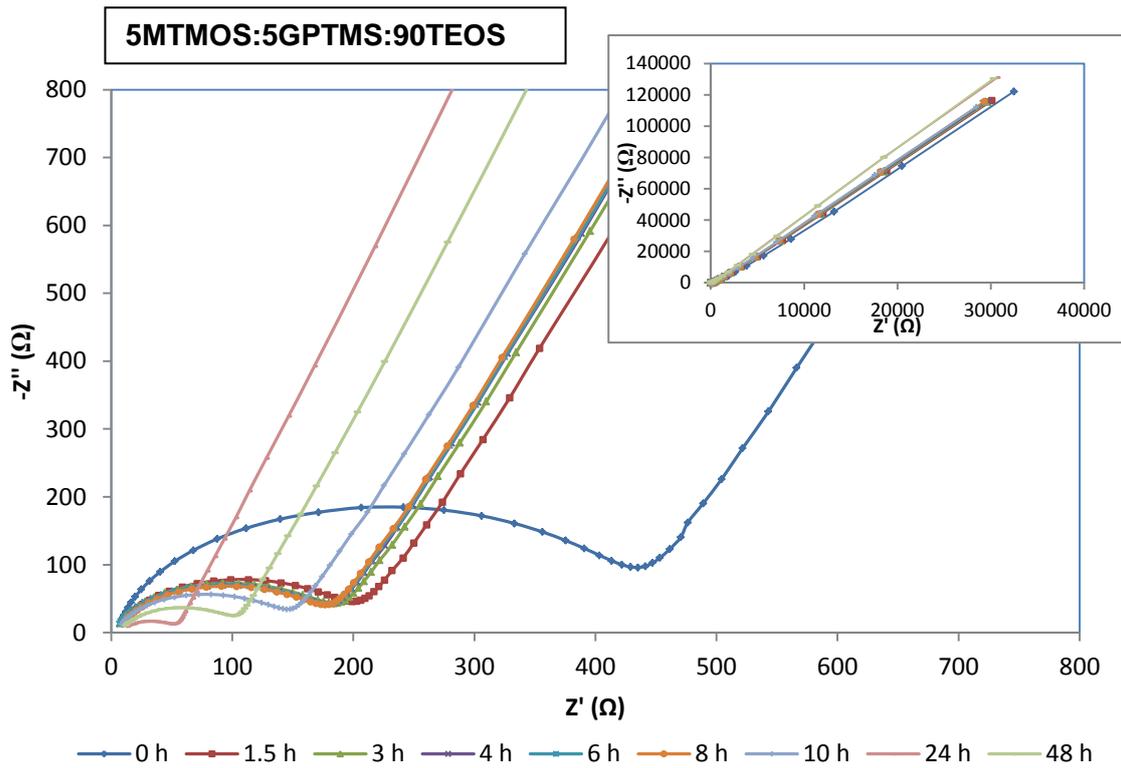


Figura 40. Diagrama de Nyquist de la composición 5M5G90T para diferentes tiempos.

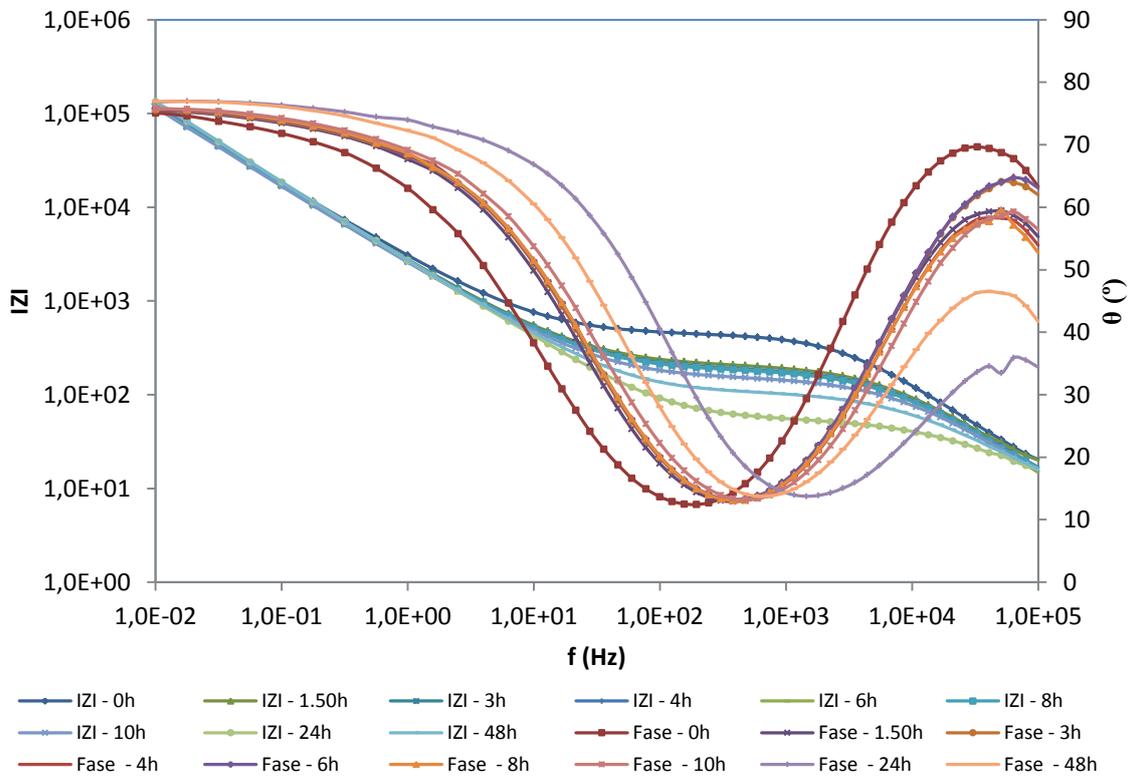


Figura 41. Diagrama Bode de la composición de referencia 5M5G90T para diferentes tiempos.

Al analizar los diagramas de Nyquist obtenidos se observa que en todos los materiales la impedancia disminuye con el tiempo de exposición del recubrimiento con el electrolito.

Del mismo modo, en los diagramas de Bode se observa como el módulo de la impedancia disminuye con el tiempo.

Esto muestra que la resistencia que ofrecen los recubrimientos disminuye con el tiempo de contacto con el electrolito, por tanto pierden capacidad de protección frente a la corrosión. Esto se debe a que el recubrimiento se degrada con el tiempo al estar en contacto con agua, tal como se ha observado en los ensayos de degradación hidrolítica.

Al visualizar los diagramas de todos los materiales, se comprueba que todos tienen una forma similar a pesar de haber introducido TEOS en la red en diferentes proporciones.

Sin embargo, aunque en líneas generales se detecta que los valores de la impedancia disminuyen al aumentar el contenido de TEOS en la red, no se ve muy claro; por ese motivo se modelizan los resultados.

Observando el diagrama de Bode, se pueden deducir las constantes de tiempo que intervienen en el proceso en función de las pendientes de la representación del módulo de la impedancia frente a la frecuencia. Se determina que tanto para la composición de referencia 50M:50G como para las composiciones triples en las que se ha incluido el TEOS como precursor la respuesta de la impedancia muestra tres procesos diferentes con sus tres constantes de tiempo correspondientes.

Estas constantes se pueden visualizar también en el diagrama de Nyquist, el primer semicírculo representa la envolvente de dos semicírculos más pequeños consecuencia de las dos primeras constantes. El resto del diagrama representa el inicio de un semicírculo mucho más grande debido a la tercera constante, este semicírculo no está definido completamente en el intervalo de frecuencias de trabajo porque los fenómenos que representa necesitan tiempos más grandes.

La primera de estas constantes aparece a altas frecuencias y representa propiedades dieléctricas del recubrimiento, la segunda constante que se encuentra en un rango de frecuencias medias representa las propiedades de los productos de reacción en la interfase recubrimiento-metal y la tercera constante que aparece a frecuencias bajas representa las propiedades de la interfase entre el metal y el resto del sistema.

Partiendo de esta información, se procede a modelizar con ayuda del Zview los datos obtenidos en los ensayos mediante el circuito equivalente mostrado en la figura 42.

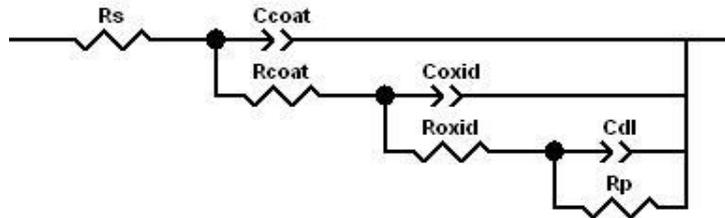


Figura 42. Circuito equivalente con tres constantes de tiempo.

Donde por un lado R_s hace referencia a la resistencia del electrolito de NaCl. Por otro lado, C_{coat} y R_{coat} son parámetros característicos del recubrimiento y representan su capacitancia y su resistencia respectivamente. Los parámetros C_{oxid} y R_{oxid} hacen referencia a la capacitancia de la capa de óxido y a su resistencia, es decir, aportan información acerca de los productos de corrosión formados en la interfase. Respecto a los parámetros de la tercera constante de tiempo, C_{dl} simboliza la capacidad de la doble fase, mientras que R_p representa la resistencia a la polarización; ambos son característicos de la interfase en el metal.

A continuación, en la figura 43, se muestran los resultados obtenidos en la modelización, representándose los parámetros correspondientes del recubrimiento, R_{coat} y C_{coat} :

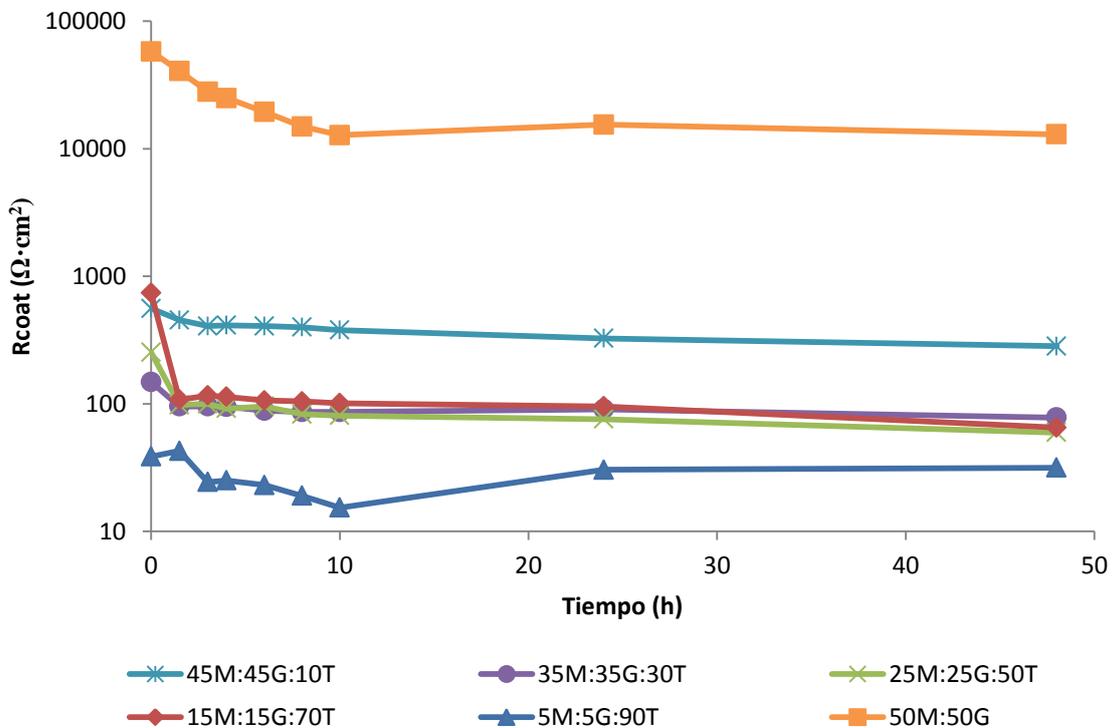


Figura 43. Datos de R_{coat} de la modelización con tres constantes de tiempo de la serie de materiales.

El valor de Rcoat representa la resistencia de poro del recubrimiento sol-gel, de modo que al observar su evolución con el tiempo de exposición al electrolito el parámetro está indicando como cambia su resistencia, su capacidad de evitar la formación de poros a su través, y por tanto su capacidad de protección al implante.

Como se puede observar en el gráfico anterior, en todos los casos el valor de Rcoat disminuye con el tiempo de ensayo, con mayor pendiente a tiempos cortos; para tiempos mayores aunque la tendencia sigue siendo negativa su pendiente se reduce mucho, manteniéndose el valor de Rcoat prácticamente constante.

Así el material de referencia 50M50G muestra una Rcoat de $57798 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a tiempo 0 horas, mientras que tras un tiempo de 48 horas en contacto con el electrolito este valor disminuye hasta los $12960 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Al introducir TEOS al sistema, la composición 45M45G10T muestra un valor de Rcoat a tiempo 0 horas de $559,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y tras las 48 horas de ensayo este valor es de $282,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Añadir un 10% de TEOS a la composición supone reducir el valor de Rcoat varios ordenes de magnitud.

Se detecta que, a medida que aumenta la cantidad de TEOS en la red, la resistencia al poro del recubrimiento se reduce. Se ve como los materiales 35M35G30T, 25M25G50T y 15M15G70T que muestran un comportamiento similar, poseen valores de Rcoat inferiores al obtenido en el material 45M45G10T.

Al aumentar la proporción de TEOS hasta porcentajes del 90% el Rcoat se reduce todavía más que en las formulaciones anteriores.

En algunas de las curvas se observa que el valor de Rcoat aumenta con el tiempo, esto se debe a que se producen deposiciones que taponan los poros del recubrimiento.

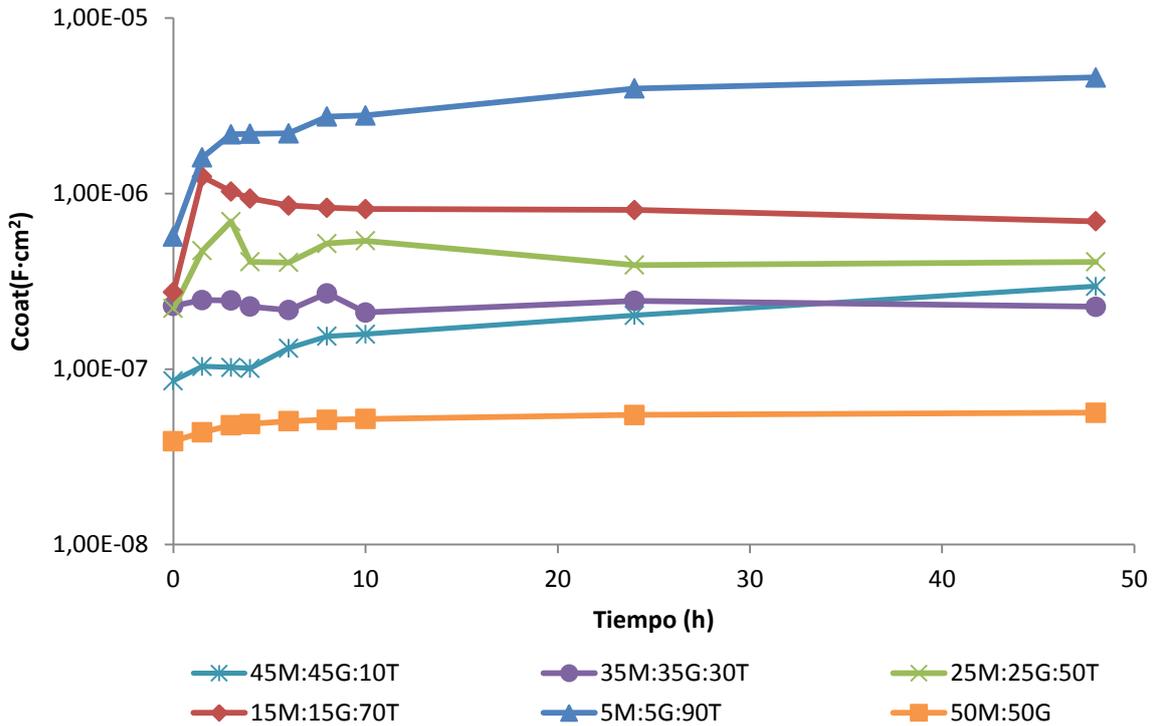


Figura 44. Datos de Ccoat de la modelización con tres constantes de tiempo de la serie de materiales.

El parámetro Ccoat representa la capacitancia del recubrimiento, es decir, la facilidad con la que el agua es capaz de penetrar a su través.

Como se puede observar en la figura 44, en todos los casos el valor de Ccoat aumenta a medida que aumenta el tiempo de contacto entre recubrimiento y el electrolito. Esto se debe a que a medida que pasa el tiempo, la red de sol-gel se va degradando, su integridad disminuye y en consecuencia, resulta más fácil la entrada de agua.

Adicionalmente, los datos obtenidos señalan que a medida que aumenta la cantidad de TEOS en la red la capacitancia del recubrimiento, Ccoat, aumenta. Por tanto, la presencia de TEOS reduce la estabilidad del material como recubrimiento, tal y como se ha constatado con los dos parámetros de la modelización.

Tras realizar los ensayos, se retira el electrolito y las muestras se secan con un secador para observar en qué estado se encuentran los recubrimientos.

En la figura 45 se puede observar el aspecto del sol-gel tras estar expuesto 48 horas a la disolución de NaCl:

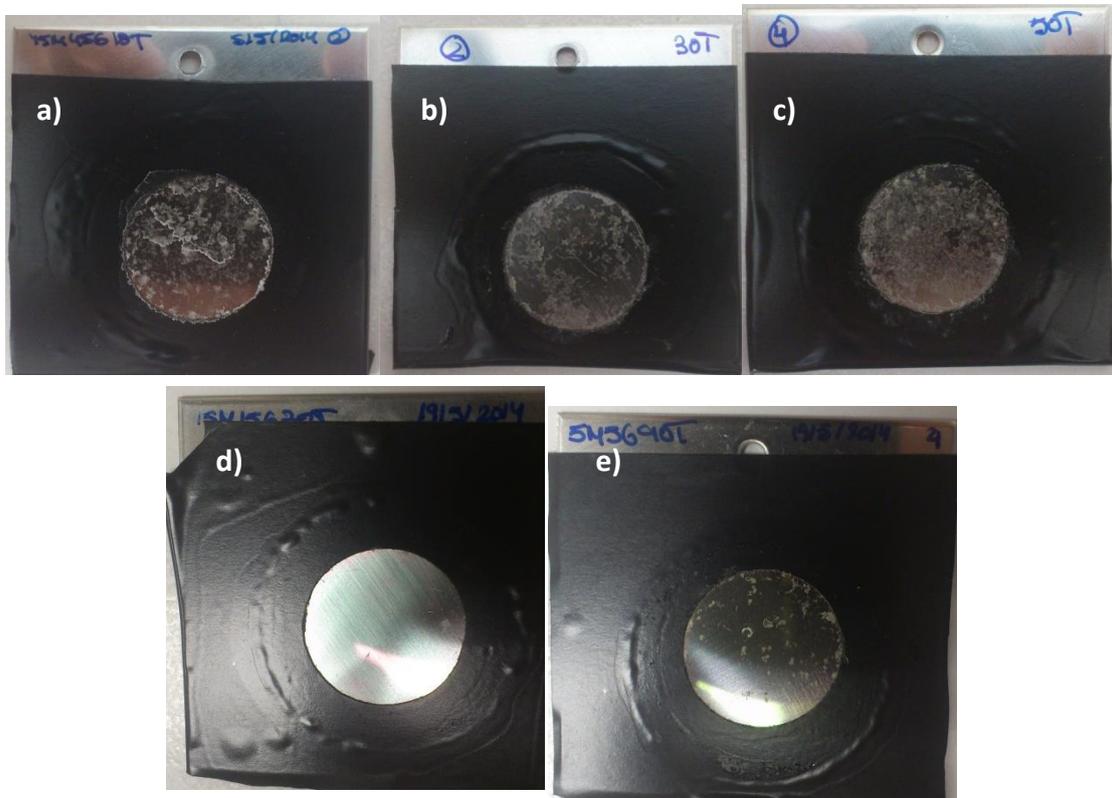


Figura 45. Planchas de acero inoxidable recubiertas con sol-gel híbrido tras 48 horas de exposición en electrolito de NaCl al 1% (a: 45M45G10T, b: 35M35G30T, c: 25M25G50T, d: 15M15G70T, e: 5M5G90T)

Al igual que ocurría en las degradaciones hidrolíticas, se observa como el recubrimiento está más deteriorado a medida que se aumenta la proporción de TEOS en la composición del biomaterial. El sol-gel menos degradado es la composición 45M45G10T; al aumentar el contenido en TEOS aumenta la degradación, hasta llegar a porcentajes del 70 y 90% en TEOS para los que, como se puede ver en la imagen, apenas queda recubrimiento

3.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

3.6.1 PERFILOMETRÍA MECÁNICA

Mediante esta técnica se pueden obtener los perfiles bidimensionales de los recubrimientos realizados con los distintos materiales que componen la serie, así como calcular parámetros de rugosidad.

Estos ensayos se realizan puesto que la rugosidad es un parámetro crítico en el proceso de adhesión celular, por lo que es clave para la osteointegración del implante.

En la figura 46 se representan el perfil del material de referencia 50M:50G junto a los perfiles obtenidos con el resto de materiales de la serie.

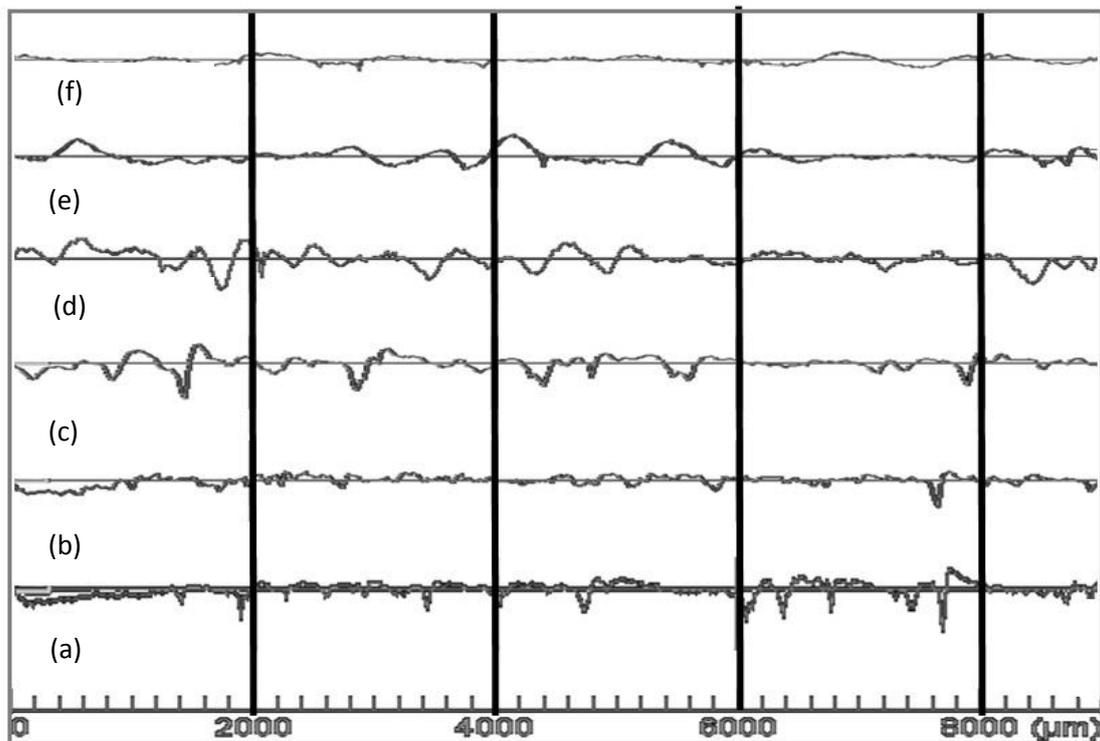


Figura 46. Perfiles topográficos de los recubrimientos sobre planchas de acero inoxidable obtenidos con los biomateriales obtenidos por sol-gel (a: 50M50G, b: 45M45G10T, c: 35M35G30T, d: 25M25G50T, e: 15M15G70T, f: 5M5G90T)

Además, mediante el software del equipo se obtiene el valor de Ra, un parámetro que cuantifica la rugosidad de la superficie. A continuación, en la tabla 5, se muestran los datos obtenidos y se representan gráficamente en la figura 47, para visualizar mejor la evolución de esta propiedad en función de la composición del material.

Material	Ra (Å)
50M50G	288.7 ± 73.1
45M45G10T	659.5 ± 50.2
35M35G30T	788.5 ± 3.5
25M25G50T	646.3 ± 33.3
15M15G70T	496.7 ± 26.8
5M5G90T	475.7 ± 81.7

Tabla 5. Datos de rugosidad obtenidos mediante perfilometría mecánica.

Perfilometría

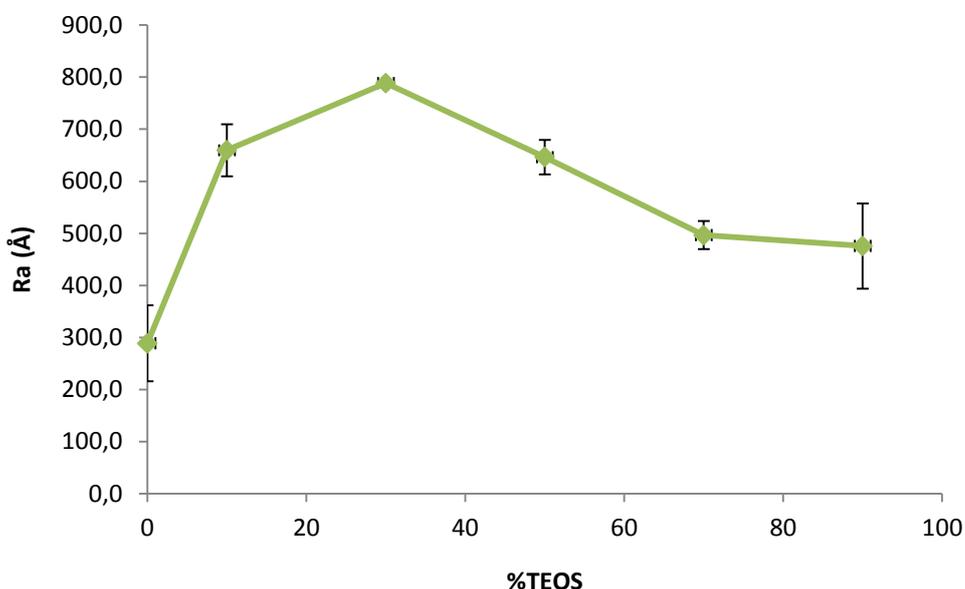


Figura 47. Representación gráfica de Ra.

Como se puede observar tanto en la tabla como en el gráfico anterior, se parte de un valor de Ra para el material de referencia 50M50G de 288.7 ± 73.1 Å. Al introducir en la estructura el nuevo precursor se observa que el valor de Ra aumenta hasta alcanzar un máximo de 788.5 ± 3.5 Å para la composición 35M35G30T. Sin embargo, a partir de este porcentaje de TEOS el perfil de rugosidad disminuye obteniendo valores de 475.7 ± 81.7 Å para la composición 5M4G90T.

La bibliografía indica que la rugosidad es otro de los parámetros clave en el anclaje celular, que es fundamental para que el proceso de osteointegración se desarrolle con éxito [15, 18]. Por esta razón es deseable que el recubrimiento elegido posea un valor adecuado de esta variable.

En este sentido, el material que muestra un valor más elevado de Ra y por tanto el que posee una mayor rugosidad es el 35M35G30T.

3.6.2 MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

Tras analizar los ensayos anteriores y teniendo en cuenta la influencia de las propiedades superficiales del implante en el proceso de osteointegración; se selecciona como proporción de TEOS óptima la adición de un 30% a la composición del biomaterial. Esto se debe a que los recubrimientos realizados con el material 35M35G30T son los que han mostrado un mayor carácter hidrofílico y una mayor rugosidad, manteniendo un comportamiento no demasiado asimilar al resto de formulaciones, respecto del resto de características evaluadas.

En las degradaciones hidrolíticas era el material que menos se degradaba y en los ensayos electroquímicos, aunque las diferencias entre materiales en la mayoría de los casos no eran muy significativas; éste presenta un comportamiento resistivo adecuado.

Una vez seleccionado el biomaterial con mejores cualidades para la aplicación a la que va a ir destinado, se recubre mediante la técnica del dip-coating un implante de titanio real y se analiza mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) obteniendo las siguientes imágenes.

En primer lugar se muestran en las figuras de la 48 a la 51 las imágenes obtenidas con un tornillo patrón sin recubrir:

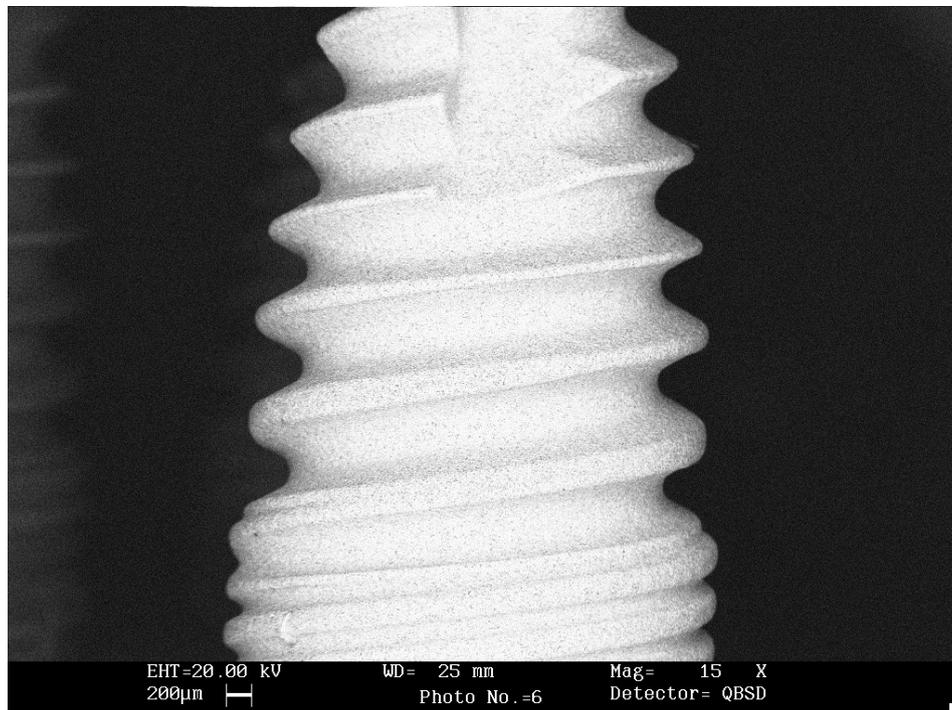


Figura 48. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado superficialmente (Vista general).

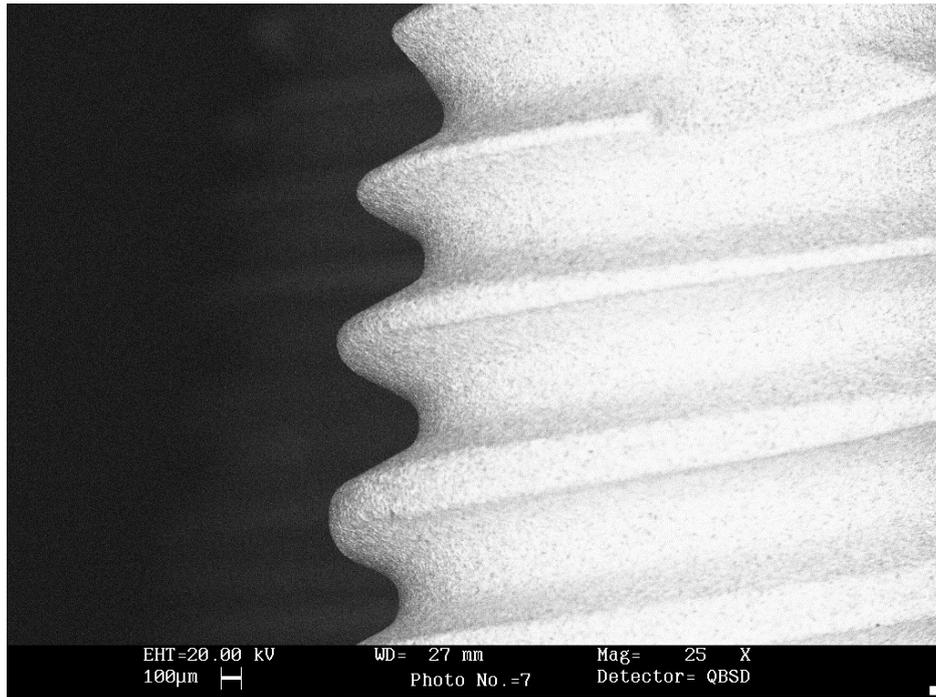


Figura 49. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado superficialmente (Valles y las crestas del implante).

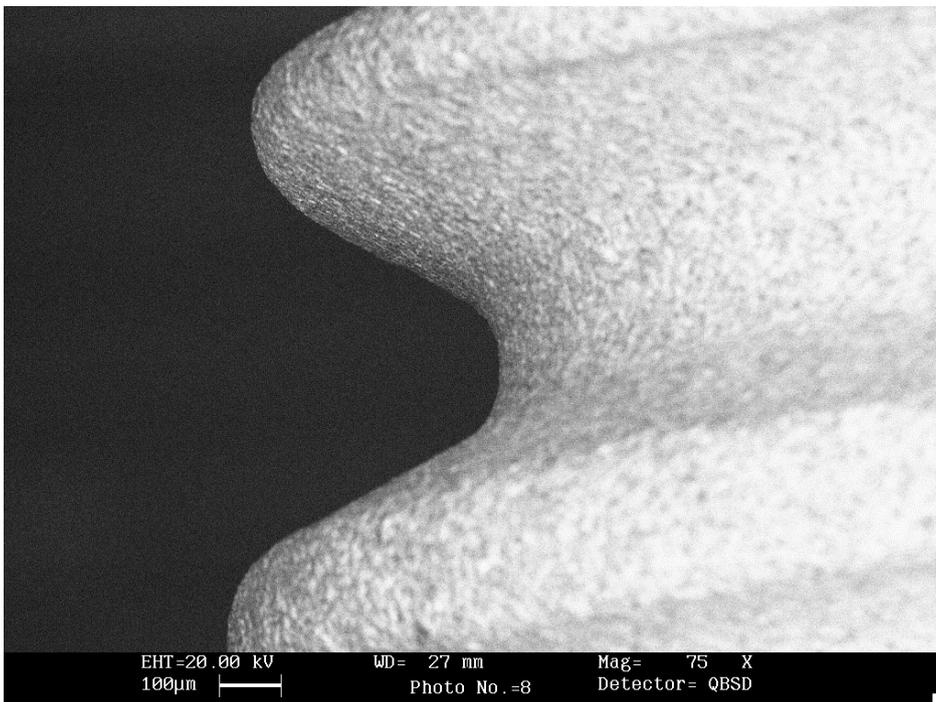


Figura 50. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado superficialmente (Valle 2).

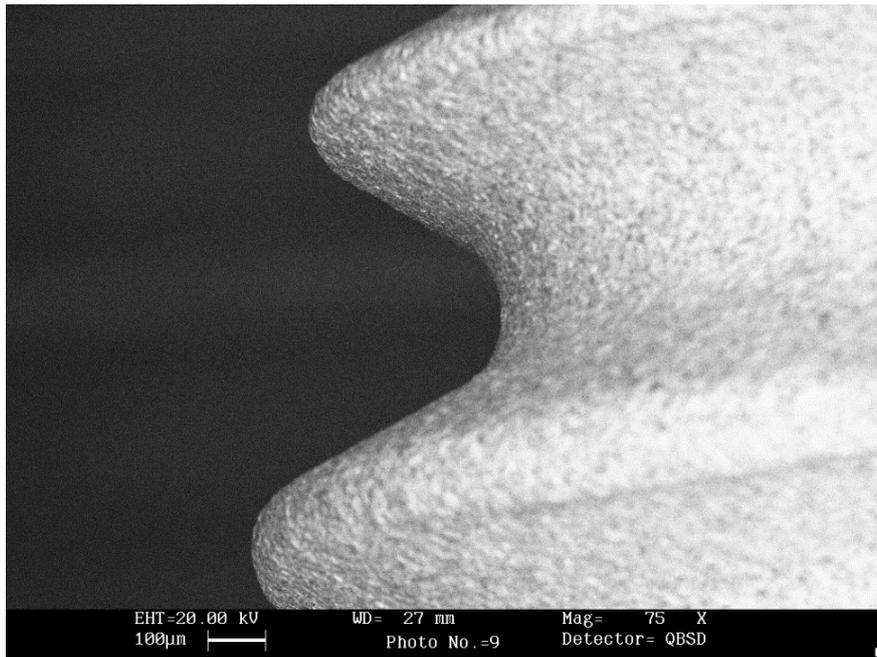


Figura 51. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado superficialmente (Valle 3).

A continuación se muestran en las figuras de la 52 a la 55 las imágenes obtenidas con el tornillo recubierto con el material 35M35G30T:

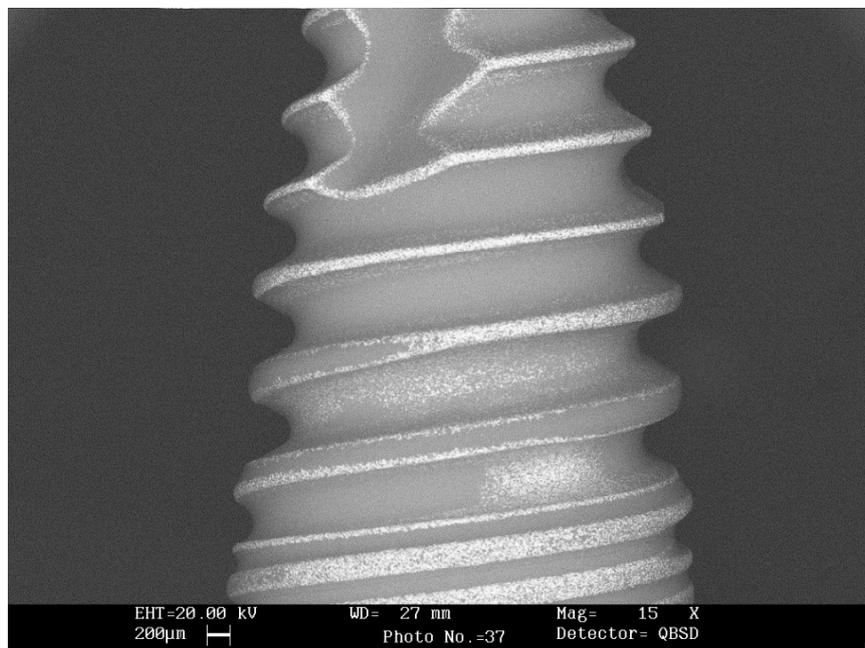


Figura 52. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado con un recubrimiento híbrido sol-gel de composición 35M35G30T (Vista general).

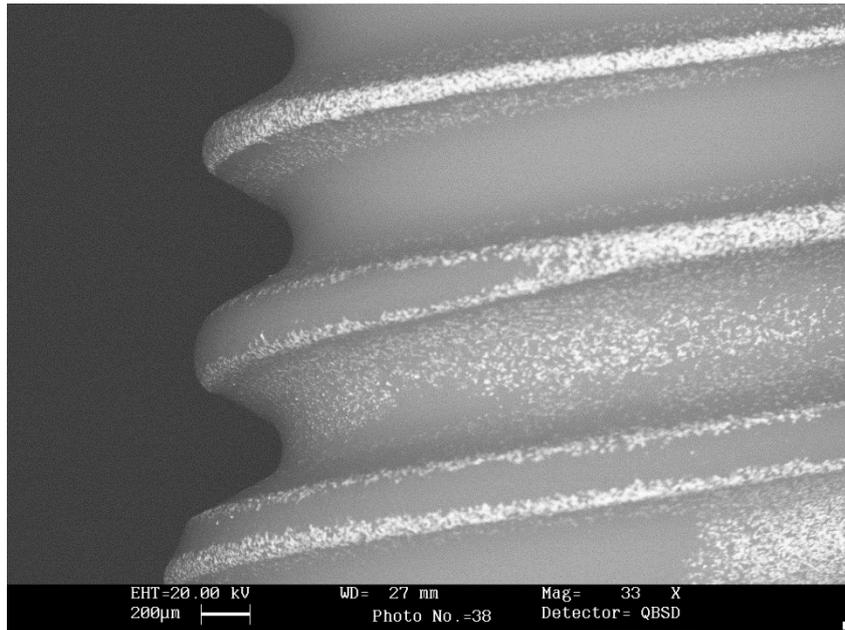


Figura 53. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado con un recubrimiento híbrido sol-gel de composición 35M35G30T (Valles y crestas).

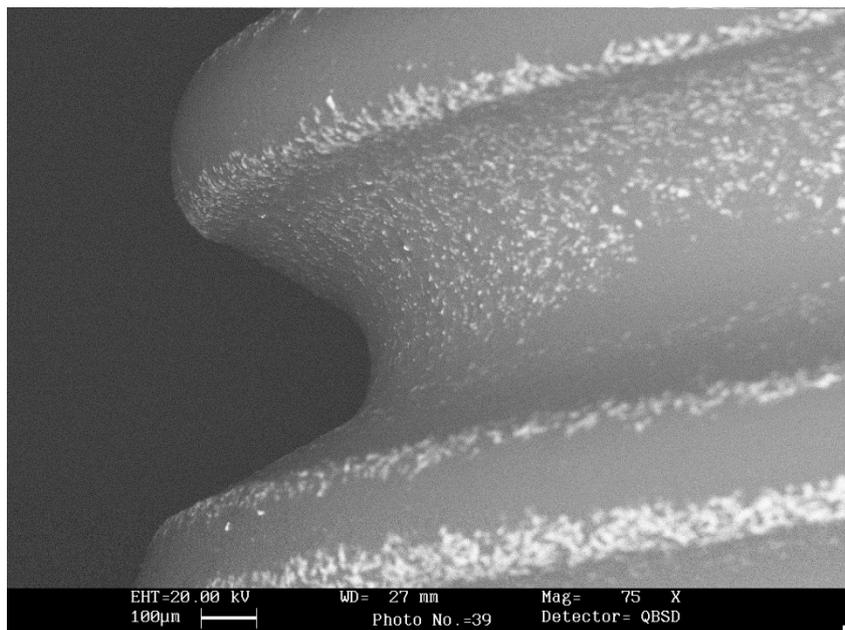


Figura 54. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado con un recubrimiento híbrido sol-gel de composición 35M35G30T (Valle 2).

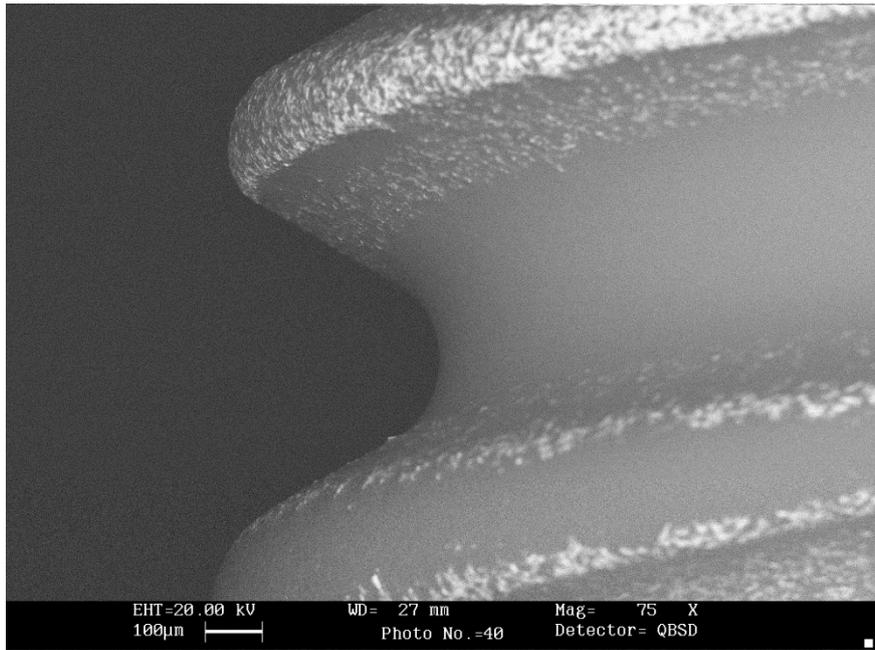


Figura 55. Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado con un recubrimiento híbrido sol-gel de composición 35M35G30T (Valle 3).

Mediante las imágenes de SEM, se puede observar en la muestra patrón la superficie rugosa del titanio como consecuencia del tratamiento de granallado.

Al comparar las fotografías obtenidas con el implante de titanio sin recubrir y las los implante recubiertos con el material escogido, se comprueba que a pesar de la compleja forma del implante, este está perfectamente recubierto por el sol-gel.

Además, se detecta que en los valles la acumulación de recubrimiento es mayor, mientras que en las crestas de los tornillos la capa de biomaterial es más delgada y se observa cómo se sigue marcando el granallado del sustrato.)

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

Uno de los objetivos del proyecto era estudiar hasta qué punto la red híbrida de composición 50M50G admitía la adición de un nuevo precursor, el TEOS; manteniendo en todo momento constante la proporción MTMOS:GPTMS a 1:1, al igual que en el material de referencia.

Se ha comprobado que el sistema admite sin problemas cualquier proporción de este nuevo precursor y que en todos los casos se logra obtener recubrimientos homogéneos y bien adheridos.

De esta forma, se han definido cinco composiciones para estudiar la serie con el objetivo de analizar cómo se veía afectado este sistema a medida que se aumentaba su carácter inorgánico mediante el TEOS.

Los materiales definidos fueron la serie de composiciones 45M:45G:10T, 35M:35G:30T, 25M:25G:50, 15M:15G:70T y 5M: 5G:90T.

Estos materiales fueron sintetizados sin problemas y, posteriormente, fueron analizados mediante distintas técnicas experimentales junto a la referencia, comparando los resultados obtenidos.

De este modo, se caracterizó químicamente la serie de materiales concluyendo a partir de los resultados obtenidos con el Si-RMN de sólidos y con el FT-IR que, en todos los casos, las reacciones de condensación se desarrollaban adecuadamente y se obtenía una red reticulada; demostrando así que los procedimientos de síntesis y preparación de las muestras eran adecuados.

Además se comprobó mediante los espectros del FT-IR que las moléculas bioactivas de las estructuras moleculares del GPTMS y del MTMOS introducidas a la red vítrea con estos precursores se habían integrado en la estructura cerámica.

Al comparar los resultados entre materiales se dedujo que la adición de pequeños porcentajes de TEOS al sistema de referencia mejoraba el entrecruzamiento, puesto que el TEOS es una molécula sencilla que puede acceder a las posiciones que quedaban sin condensar en este sistema.

Respecto a la degradación térmica, los TGA determinan que a medida que se aumenta el porcentaje de TEOS, el material es más inorgánico y consecuentemente las pérdidas de peso a las temperaturas del análisis son menores.

Por otro lado, los resultados de los ensayos de DSC muestran que los materiales presentan un proceso de transición vítrea en el intervalo de temperaturas estudiado, el valor de esta Tg disminuye a medida que se adiciona más TEOS a la composición, ya que, este compuesto es estructuralmente más simple, la red que se forma tiene cadenas más cortas y estructuras más sencillas que requieren menos energía para iniciar la movilidad. Esto se traduce en un aumento de ΔC_p en el sistema a medida que aumenta el porcentaje de TEOS; sin embargo, el grado de movilidad que se

puede desarrollar también se ve afectado por la apertura del anillo epoxi, fenómeno que se ve favorecido por la presencia de TEOS, de forma que a adiciones de pequeños porcentajes se invierte el comportamiento y el ΔC_p aumenta al añadir el contenido de este precursor.

La hidrofilia de los materiales se estudió mediante la medida del ángulo de contacto. Al analizar los resultados se detecta un máximo carácter hidrofílico en la composición 35M:35G:30T. Añadiendo TEOS a la red de referencia 50M:50G en pequeñas proporciones el ángulo de contacto disminuye porque el material se vuelve más hidrófilo; alcanzando un tope de comportamiento en la composición indicada. A partir de ella, al aumentar el contenido en TEOS, el ángulo de contacto aumenta, indicando comportamiento más hidrófobos.

Este comportamiento es consecuencia de la apertura del anillo epoxi del GPTMS que supone un aumento de grupos OH en la estructura. Además, se detecta que la presencia del precursor TEOS favorece este fenómeno de apertura del anillo epoxi; por este motivo al añadir pequeñas proporciones de TEOS a la composición se logra un recubrimiento más hidrófilo aún. Sin embargo, si se añade una proporción mayor al 30% de TEOS, la reducción del contenido de GPTMS en la composición supone la reducción de este efecto.

Los estudios revelan que las superficies hidrófilas favorecen las interacciones con fluidos biológicos, células y tejidos; de modo que favorecen la osteointegración del implante. En consecuencia, desde este punto de vista el material de la serie más adecuado es el 35M:35G:30T.

Por otra parte, se realizaron ensayos de degradación hidrolítica que revelan que los materiales que más tiempo necesitan para degradarse en contacto con agua son los que contienen un 10% y un 30% de TEOS. La degradación de materiales con mayor contenido de este precursor presentan degradaciones mucho más acusadas.

Que el recubrimiento sea biodegradable es positivo, puesto que por un lado se logra eliminar el material una vez acabado el proceso y por otro, durante la degradación se libera silicio que actúa como señal osteointegradora. Sin embargo, se requiere que su cinética de degradación pueda asegurar que el material va a proteger el implante mientras sea necesario. Eso puede hacer pensar que las cinéticas de degradación más rápidas no pueden permitir la consecución de ese cometido.

Por este motivo se realizaron ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) para evaluar la capacidad de protección del recubrimiento, determinándose que a medida que se aumenta la proporción de TEOS en la composición la resistencia al poro del recubrimiento disminuye. Por otra parte, se detecta que al aumentar el contenido en TEOS en la red aumenta la permeabilidad de ésta. Teniendo en cuenta que se requiere que el recubrimiento proteja al implante y evite la liberación de iones procedentes del metal que puedan obstaculizar el proceso de osteointegración; se determina que los biomateriales más adecuados para asegurar que esto no suceda son los que tienen un menor contenido en TEOS.

Según la bibliografía la rugosidad es uno de los parámetros clave para que se produzca la adhesión de las células al sustrato, resultando esto fundamental para que

el proceso de osteointegración. Por este motivo se realizaron ensayos de perfilometría, con el objetivo de estudiar la topografía de los recubrimientos obtenidos. Así se observa que el material que presenta una mayor rugosidad es el 35M35G30T.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos en el presente trabajo, se concluye que de las composiciones estudiadas la que presenta un conjunto de propiedades más adecuado para ser utilizada como recubrimiento bioactivo que favorezca la osteointegración de implantes dentales es la 35M:35G:30T.

Una vez seleccionado el biomaterial se recubre un implante de titanio real y se analiza éste y un tornillo control sin recubrir mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) obteniendo imágenes de sus topografías superficiales.

Al comparar las imágenes obtenidas se comprueba que a pesar de la compleja forma del implante, éste está perfectamente recubierto por el sol-gel; demostrando así la viabilidad de recubrir implantes con el biomaterial obtenido.

Una vez encontrado el material óptimo desde un punto de vista físico-químico, el siguiente paso sería la realización de ensayos in vitro e in vivo para estudiar su comportamiento celular y demostrar que el biomaterial obtenido tiene propiedades osteoinductoras.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Davide Camporcia, Lucio Montanaro, Carla Renata Arciola. A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 34(2013) 8018-8029.
- [2] F.H. Jones. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Department of Biomaterials, The Eastman Dental Institute for Oral Health Care Sciences, University College London, University of London.*
- [3] L.L. Hench, Ceramics, glasses and glass-cements, in: *B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (Eds.), Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press, New York, 1996, p. 75.*
- [4] J.W. Simmelink. Histology of enamel in: *J.K. Avery (Ed.), Oral Development and Histology, Thieme Medical Publishers Inc., New York, 1994.*
- [5] G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D.L. Cochran, et al.. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A. Volume 74, Issue 1, 1 July 2005, Pages 49-58.*
- [6] K. Subramani , R.T. Mathew. Chapter 6 – Titanium Surface Modification Techniques for Dental Implants—From Microscale to Nanoscale. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry Processes, Materials and Applications (Volumen A in Micro and Nano Technologies 2012, Pages 85–102).*
- [7] T. Albrektsson, P.I. Branemark, H.A. Hansson, J. Lindstrom. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop. Scand., 52 (4) (1981), p. 155.*
- [8] M. Franchi, B. Bacchelli, D. Martini, V.De Pasquale, E. Orsini, V. Ottani, M. Fini, G. Giavaresi, R. Giardino, A. Ruggeri. Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials, Volume 25, Issue 12, May 2004, Pages 2239-2246.*
- [9] Annabel Braem, Amol Chaudhari, Marcio Vivan Cardoso, Jan Schrooten, Joke Duyck, Jozef Vleugels. Peri- and intra-implant bone response to microporous Ti coatings with surface modification. *Acta Biomaterialia, Volume 10, Issue 2, February 2014, Pages 986-995.*
- [10] P. Brånemark. Osseointegration and its experimental background. *J. Prosthet. Dent., 50 (3) (1983), p. 399.*

- [11] Marianna Gaintantzopoulou, Spiros Zinelis, Nick Silikas, George Eliades. Micro-Raman spectroscopic analysis of TiO₂ phases on the root surfaces of commercial dental implants. *Dental Materials*, Volume 30, Issue 8, August 2014, Pages 861-867.
- [12] A. Arys, C. Philippart, N. Dourov, Y. He, Q.T. Le, J.J. Pireaux. Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: combined histological electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy approach. *J. Biomed. Mater. Res.*, 43 (3) (1998), pp. 300–312.
- [13] Philipp Metzler, Cornelius von Wilmsowky, Bernd Stadlinger, Wolfgang Zemmann, Karl Andreas Schlegel, Stephan Rosiwal, Stephan Rupprecht. Nano-crystalline diamond-coated titanium dental implants – A histomorphometric study in adult domestic pigs. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, Volume 41, Issue 6, September 2013, Pages 532-538.
- [14] L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, Review Article. *Dental Materials*, Volume 23, Issue 7, July 2007, Pages 844-854.
- [15] S. Lavenus, J. Rozé, A. Hoornaert, G. Louarn, P. Layrolle. Chapter 5 - Impact of Nanotechnology on Dental Implants. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry*, 2012, Pages 71-84.
- [16] R. Miller, Z. Guo, E.A. Vogler, C.A. Siedlecki. Plasma coagulation response to surfaces with nanoscale chemical heterogeneity. *Biomaterials*, 27 (2006), pp. 208–215.
- [17] T. Sawase, R. Jimbo, K. Baba, Y. Shibata, T. Ikeda, M. Atsuta, et al. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin. Oral Implants Res.*, 19 (2008), pp. 491–496.
- [18] D. Buser, N. Broggini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research* Volume 83, Issue 7, July 2004, Pages 529-533.
- [19] J. Rozé, S. Babu, A. Saffarzaden, M. Gayet-Delacroix, A. Hoornaert, P. Layrolle. Correlating implant stability to bone structure. *Clin. Oral Implants Res.*, 20 (2009), pp. 1140–1145.
- [20] E.S. Rosenberg, J.P. Torosian, J. Slots. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin. Oral Implants Res.*, 2 (3) (1991), p. 135.
- [21] M. Franchi, E. Orsini, D. Martini, V. Ottani, M. Fini, G. Giavaresi, R. Giardino, A. Ruggeri. Destination of titanium particles detached from titanium plasma sprayed implants. *Micron*, Volume 38, Issue 6, August 2007, Pages 618-625.
- [22] C. Aparicio, F.J. Gil, C. Fonseca, M. Barbosa, J.A. Planell, Corrosion behavior of commercially pure titanium shot blasted with different materials and size of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials*, 24 (2003), pp. 263–273.
- [23] K. Gotfredsen, U. Karlsson, A prospective 5-year study of fixed partial prostheses supported by implants with machined and TiO₂-blasted surface. *J Prosthodont*, 10 (2001), pp. 2–7.

- [24] C. Massaro, F. Rotolo, F. De Riccardis, E. Milella, A. Napoli, M. Wieland, et al.. Comparative investigation of the surface of commercial titanium dental implants. *Part 1: chemical composition. J Mater Sci Mater Med*, 13 (2002), pp. 535–548.
- [25] M. Wong, J. Eulenberger, R. Schenk, E. Hunziker. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res*, 29 (1995), pp. 1567–1575.
- [26] J.Y. Park, J.E. Davies. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*, 11 (2000), pp. 530–539.
- [27] J.E. Ellingsen. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J Mater Sci Mater Med*, 6 (1995), pp. 749–758.
- [28] Bao Hong Zhao, Inho Han, Hai Lan Feng, Wei Bai, Fu-Zhai Cui, In-Seop Lee. Histological and histomorphometrical study of connective tissue around calcium phosphate coated titanium dental implants in a canine model. *Surface and Coatings Technology*, Volume 201, Issues 9-11, 26 February 2007, Pages 5696-5700.
- [29] Hamdan S. Alghamdi, Ruggero Bosco, Sanne K. Both, Michele Iafisco, Sander C.G. Leeuwenburgh, John A. Jansen, Jeroen J.J.P. van den Beucken. Synergistic effects of bisphosphonate and calcium phosphate nanoparticles on peri-implant bone responses in osteoporotic rats. *Biomaterials*, Volume 35, Issue 21, July 2014, Pages 5482-5490.
- [30] P. Habibovic, J. Li, C.M. van der Valk, G. Meijer, P. Layrolle, C.A. van Blitterswijk, et al.. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials*, 26 (2005), pp. 23–36.
- [31] Y. Ku, C.P. Chung, J.H. Jang. The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior. *Biomaterials*, 26 (25) (2005), p. 5153.
- [32] S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. Sigrüst. Immobilization of the cell-adhesive peptide arg-gly-asp-cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 8 (12) (1997), p. 867.
- [33] E.P. Briggs, A.R. Walpole, P.R. Wilshaw, M. Karlsson, E. Pålsgård. Formation of highly adherent nano-porous alumina on Ti-based substrates: a novel bone implant coating. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 15 (9) (2004), p. 1021.
- [34] F. Chen, W.M. Lam, C.J. Lin, G.X. Qiu, Z.H. Wu, K.D. Luk, et al.. Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: in-vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 82 (1) (2007), p. 183.
- [35] C.P. Klein, P. Patka, H.B. van der Lubbe, J.G. Wolke, K. de Groot. Plasma-sprayed coatings of tetracalciumphosphate, hydroxyl-apatite, and alpha-TCP on titanium alloy: an interface study. *J. Biomed. Mater. Res.*, 25 (1) (1991), p. 53.
- [36] Elena I. Morosanova .Silica and silica–titania sol–gel materials: Synthesis and analytical application. *Talanta*, Volume 102, 15 December 2012, Pages 114-122.

- [37] C. Jeffrey Brinker, George W. Scherer. Sol-gel science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing.
- [38] Véronique Bounor-Legaré, Philippe Cassagnau. In situ synthesis of organic-inorganic hybrids or nanocomposites from sol-gel chemistry in molten polymers. *Progress in Polymer Science, Volume 39, Issue 8, August 2014, Pages 1473-1497.*
- [39] J.B. Chan, J. Jonas. Effect of various amide additives on the tetramethoxysilane sol-gel process. *Journal of Non-Crystalline Solids. Volume 126, Issues 1-2, 1 December 1990, Pages 79-86.*
- [40] Desarrollo de recubrimientos híbridos osteoinductores para implantes dentales. Miriam Hernández Escolano. Universidad Politécnica de Valencia.
- [41] Amun Amri, Zhong Tao Jiang, Trevor Pryor, Chun-Yang Yin, Sinisa Djordjevic. Developments in the synthesis of flat plate solar selective absorber materials via sol-gel methods: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, Volume 36, August 2014, Pages 316-328.*
- [42] Duhua Wang, Gordon. P. Bierwagen. Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. *Progress in Organic Coatings, Volume 64, Issue 4, March 2009, Pages 327-338.*
- [43] Daniel Arcos, María Vallet-Regí. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia, Volume 6, Issue 8, August 2010, Pages 2874-2888.*
- [44] K. Tsuru, C. Ohtsuki, A. Osaka, Iwamoto T. Mackenzie Bioactivity of sol-gel derived organically modified silicates. *J Mater Sci Mater Med, 8 (1997), pp. 157-161*
- [45] Josefina Ballarre, Inderchand Manjubala, Wido H. Schreiner, Juan Carlos Orellano, Peter Fratzl, Silvia Ceré. Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants. *Acta Biomaterialia, Volume 6, Issue 4, April 2010, Pages 1601-1609.*
- [46] Hernández-Escolano, M. , Juan-Díaz, M.J., Martínez-Ibáñez, M., Suay, J., Goñi, I., Gurruchaga, M. Synthesis of hybrid sol-gel materials and their biological evaluation with human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Volume 24, Issue 6, June 2013, Pages 1491-1499.*
- [47] Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales. María Jesús Juan Díaz. Universidad del País Vasco.
- [48] Síntesis de redes híbridas orgánico-inorgánicas basadas en silicio con aplicación en biomateriales. Anne Larrea Ibáñez. Universidad Jaume I.
- [49] Calos Valero Vidal and Anna Igual Muñoz. Electrochemical Aspects in Biomedical Alloy Characterization: Electrochemical Impedance Spectroscopy. Universidad Politécnica de Valencia.

- [50] A.Amirudin, D.Thierry. Swedish . Application of electrochemical impedance spectroscopy to study the degradation of polymer-coated metals. *Corrosion Institute, Roslagsvägen 101 Hus 25, S-104 05 Stockholm, Sweden.*
- [51] Larissa B. Capeletti, Ione M. Baibich, Ian S. Butler, João H.Z. dos Santos. Infrared and Raman spectroscopic characterization of some organic substituted hybrid silicas. *Spectrochimica Acta. Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Volume 133, 10 December 2014, Pages 619-625.*
- [52] H. Aguiar, J. Serra, P. González, B. León. Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids, Volume 355, Issue 8, 1 April 2009, Pages 475-480.*
- [53] J. Jabboura , S. Calasb, S. Gattia, R.K. Kribicha, M. Myaraa, G. Pillea, P. Etienneb, Y. Moreaua. Physics of Non-Crystalline Solids 11 by IR spectroscopy of an hybrid sol-gel material used for photonic devices fabrication. *Journal of Non-Crystalline Solids. Volume 354, Issues 2-9, 15 January 2008, Pages 651-658.*
- [54] Rami Al-Oweini, Houssam El-Rassy. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si(OR)₄ and RⁿSi(OR')₃precursors. *Journal of Molecular Structure. Volume 919, Issues 1-3, 17 February 2009, Pages 140-145.*
- [55] Gupta, R. and A. Kumar, Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomedical Materials, 2008. 3(3):p.1-15.*
- [56] P.A. Downey, M.I. Siegel. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther, 86 (2006), pp. 77-91.*
- [57] K.J. McNeil, J.A. DiCaprio, D.A. Walsh, R.F. Pratt. Kinetics and mechanism of hydrolysis of a silicate trimer, tris(2-methoxyethoxy)phenylsilane. *J Am Chem Soc, 102 (1980), pp. 1859-1865.*