

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**PROGRAMA DE NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGIA**

**“Síntesis de Recubrimientos de
Hidroxiapatita Nanocristalina sobre
Ti6Al4V para Uso Biomédico”**

T E S I S

Que presenta

FERNANDO FRANCISCO RIOS PIMENTEL

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGIA**

Directores de la Tesis:

Dra. María Magdalena Méndez González

Dr. Miguel García Rocha

Ciudad de México

Julio, 2023

AGRADECIMIENTOS

Al CINVESTAV por permitirme continuar mi educación y formación como investigador.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A mis directores de tesis: Dra. María Magdalena Méndez González y Dr. Miguel García Rocha por brindarme el apoyo necesario para la realización del proyecto de doctorado.

A Northeastern University por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar mi proyecto de investigación.

A los colaboradores de tesis: Thomas J. Webster y Kanny Run Chang por apoyarme con sus conocimientos para poder sintetizar y caracterizar mis recubrimientos.

Al Laboratorio de Caracterización de Nanoestructuras y Materiales por permitirme el acceso a su microscopio electrónico de transmisión.

A los sinodales: Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis, Dr. Jaime Santoyo Salazar, Dr. Juan Pedro Luna Arias, Dr. Arturo Isaías Martínez Enríquez.

Al coordinador académico del programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología del CINVESTAV, Dr. Salvador Gallardo Hernández.

Al personal administrativo del CINVESTAV por su colaboración con los trámites necesarios para la realización de este doctorado.

A la compañía Mogel Fluidos S.A. de C.V. por la aportación de recursos materiales para la realización de mi proyecto de doctorado.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	<u>6</u>
ÍNDICE DE FIGURAS	<u>7</u>
RESUMEN	<u>9</u>
ABSTRACT	<u>10</u>
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	<u>11</u>
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	<u>13</u>
2.1 Hidroxiapatita (HA)	<u>13</u>
2.1.1 Recubrimientos por plasma spray	<u>19</u>
2.2 Materiales nanoestructurados	<u>20</u>
2.3 Nanohidroxiapatita (nHA)	<u>23</u>
2.4 Nanopartículas de péptido anfifílico (APnPs)	<u>24</u>
2.5 Técnicas de síntesis	<u>25</u>
2.5.1 Precipitación química	<u>25</u>
2.5.2 Polimerización por radicales libres	<u>27</u>
A. Se encuentran dos cadenas en crecimiento	<u>30</u>
B. Se da la desproporción de dos radicales	<u>31</u>
C. Existe transferencia de cadena al polímero	<u>31</u>
2.5.3 Depósito por lanzamiento de gota	<u>33</u>
2.6 Técnicas de caracterización	<u>34</u>
2.6.1 Difracción de rayos-X (XDR)	<u>34</u>
2.6.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	<u>37</u>
2.6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	<u>40</u>
2.6.4 Espectroscopía por dispersión de energía de rayos-X (EDS)	<u>42</u>
2.6.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	<u>43</u>
2.6.6 Difracción de electrones (ED)	<u>45</u>
2.6.7 Ensayo de densidad celular de osteoblastos	<u>45</u>
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	<u>47</u>
3.1 Justificación	<u>47</u>
3.2 Objetivos	<u>47</u>
CAPÍTULO 4. DETALLES EXPERIMENTALES	<u>49</u>
4.1 Síntesis de hidroxiapatita nanocristalina (nHA)	<u>49</u>
4.2 Síntesis de polihidroxietilmetacrilato (pHEMA)	<u>51</u>
4.3 Obtención de pHEMA+nHA1	<u>52</u>
4.4 Obtención de nanopartículas de péptido anfifílico (APnPs)	<u>52</u>
4.5 Obtención de pHEMA+APnPs	<u>53</u>
4.6 Obtención de pHEMA+nHA1+APnPs	<u>53</u>
4.7 Obtención de recubrimientos	<u>53</u>
4.8 Caracterización de nHA1	<u>54</u>
4.9 Caracterización de recubrimientos	<u>54</u>
4.9.1 Adherencia de osteoblastos	<u>54</u>

4.9.2	Morfología	54
CAPÍTULO 5. RESULTADOS		56
5.1	Caracterización de nHA1	56
5.1.1	Difracción de rayos-X	56
5.1.2	Espectroscopía infrarroja	58
5.1.3	Microscopía electrónica de barrido	59
5.1.4	Espectroscopía de energía dispersiva	59
5.1.5	Microscopía electrónica de transmisión	60
5.1.6	Difracción de electrones	62
5.2	Caracterización de recubrimientos	63
5.2.1	Adherencia de osteoblastos	63
5.2.2	Morfología	65
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES		70
CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS		72
BIBLIOGRAFÍA		73
PRODUCTOS DEL TRABAJO		78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
2.1	Relación Ca/P de los fosfatos de calcio más usados para recubrir implantes óseos.	13
2.2	Parámetros de red de apatitas minerales, sintéticas y biológicas.	17
2.3	Efectos cualitativos de algunos sustitutos de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- .	18
2.4	Composición, propiedades cristalográficas, propiedades mecánicas de esmalte, hueso y HA.	19
4.1	Nomenclatura de las soluciones obtenidas.	53
5.1	Porcentajes atómicos de nHA1 y nHA2.	59
5.2	Indexación del patrón de difracción de nHA1.	63
5.3	Resultados obtenidos de las pruebas de adherencia de osteoblastos.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
2.1	A) Estructura cristalina de la hidroxiapatita. B) Posiciones teóricas de los iones en la celda unitaria de hidroxiapatita.	<u>14</u>
2.2	Patrón de difracción de hidroxiapatita estequiométrica.	<u>15</u>
2.3	Espectro infrarrojo de absorción de la hidroxiapatita.	<u>16</u>
2.4	Esquema de la técnica plasma spray.	<u>20</u>
2.5	Radio de moléculas, nanopartículas y material voluminoso según el número de átomos.	<u>21</u>
2.6	Generación progresiva. A) Estructuras rectangulares. B) Estructuras curvilíneas.	<u>22</u>
2.7	Estructura química del péptido anfífilico (APnPs).	<u>25</u>
2.8	Ensamble de los péptidos anfífilicos	<u>25</u>
2.9	Azo-Bis-IsobutiroNitrilo (AIBN).	<u>28</u>
2.10	Descomposición del AIBN en radicales libres.	<u>28</u>
2.11	Reacción entre un radical libre y una molécula de etileno.	<u>29</u>
2.12	Reacción de propagación empleando el iniciador peróxido de benzoilo	<u>30</u>
2.13	Unión de dos cadenas en crecimiento.	<u>30</u>
2.14	Desproporción de dos radicales.	<u>31</u>
2.15	Transferencia de cadena al polímero.	<u>32</u>
2.16	Técnica de lanzamiento de gota.	<u>34</u>
2.17	Proceso de difracción de rayos-X.	<u>35</u>
2.18	Esquema del tubo de rayos-X.	<u>35</u>
2.19	Proceso de difracción de rayos-X en un cristal.	<u>36</u>
2.20	Esquema de las vibraciones moleculares.	<u>38</u>
2.21	Luz infrarroja de longitud de onda continua que pasa por la muestra, cada filtro absorbe una longitud de onda característica.	<u>39</u>
2.22	Esquema del microscopio electrónico de barrido.	<u>40</u>
2.23	Producción de rayos-X y emisión de electrones.	<u>42</u>
2.24	Esquema del microscopio electrónico de transmisión.	<u>43</u>
2.25	Interacción entre el haz de electrones y la muestra en el TEM.	<u>44</u>
4.1	Hidroxietilmetacrilato (HEMA).	<u>51</u>
4.2	Polihidroxietilmetacrilato (pHEMA).	<u>51</u>
4.3	Estructura química del péptido anfífilico.	<u>52</u>
5.1	A) Patrones de difracción de nHA1, nHA2 y patrón ICDD. B) Índices de Miller de los planos en los que ocurre difracción en nHA1.	<u>57</u>
5.2	Espectroscopía IR de nHA1 y nHA2.	<u>58</u>

5.3	Morfología de nHA1.	<u>59</u>
5.4	Nano barras de 20 nm de ancho y 40 nm de longitud en nHA1.	<u>60</u>
5.5	A) Dirección preferencial (200). B) Distribución de los planos atómicos a mayor resolución.	<u>61</u>
5.6	Difracción de electrones de nHA1.	<u>62</u>
5.7	Densidad de osteoblastos en recubrimientos con pHEMA, APnPs y nHA1.	<u>64</u>
5.8	Morfología del recubrimiento con pHEMA. a) Baja y b) Alta resolución (SEM).	<u>66</u>
5.9	Morfología del recubrimiento con pHEMA+APnPs. a) Baja y b) Alta resolución (SEM).	<u>67</u>
5.10	Morfología del recubrimiento con pHEMA+nHA1. a) Baja y b) Alta resolución (SEM).	<u>68</u>
5.11	Morfología del recubrimiento con pHEMA+nHA1+APnPs. a) Baja y b) Alta resolución (SEM).	<u>69</u>

RESUMEN

Los trabajos de investigación han mostrado que implantes metálicos fabricados de aleaciones de titanio (Ti6Al4V) recubiertos con $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ hidroxiapatita nanocristalina (nHA) han tenido más vida útil que cualquier otro tipo de implante. Las características nanométricas de las nano partículas de péptido anfifílico (APnPs), hacen que estas sean buenas candidatas para ser empleadas como recubrimientos de los implantes metálicos, ya que son vectores de carga genética no virales, que pueden auto-ensamblarse en micelas esféricas o estructuras fibrosas con cubiertas hidrofílicas y centros hidrofóbicos con soluciones acuosas y son comúnmente empleadas como transporte de medicamentos. Los APnPs contienen el péptido ácido arginilglicilaspártico (RGD), que no solo promueve la adherencia de las células sino también otras funciones celulares como la proliferación celular. Debido a que no se han realizado investigaciones en las que se empleen nano partículas de péptido anfifílico como recubrimientos de implantes metálicos y ya que los péptidos RGD, ofrecen una buena estrategia para controlar la interfaz del material, se planteó como objetivo general del presente trabajo, la obtención de recubrimientos para implantes metálicos de Ti6Al4V que contengan hidroxiapatita nanocristalina y APnPs que puedan mejorar la adherencia de los osteoblastos. La hidroxiapatita obtenida fue caracterizada por las técnicas de XRD, FTIR, SEM, TEM, ED y EDS. Se obtuvieron recubrimientos de hidrogel de pHEMA con hidroxiapatita nanocristalina y APnPs, sobre sustratos de Ti6Al4V. Se obtuvo la adherencia de osteoblastos y morfología de todos los sustratos recubiertos, obteniendo que los recubrimientos de pHEMA+nHA1+APnPs son los que presentan la mayor adherencia de osteoblastos respecto a los sustratos recubiertos con pHEMA, pHEMA+nHA1 y pHEMA+APnPs, por lo que los implantes metálicos de Ti6Al4V recubiertos con pHEMA+nHA1+APnPs tendrán una mejor osteointegración.

ABSTRACT

Several studies have shown that implants made of Ti6Al4V and coated with $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ nanocrystalline hydroxyapatite (nHA) have lasted longer than any other type of implant. Amphiphilic peptide nanoparticles (APnPs) are good candidates to coat metallic implants due to their nanometric features. These nanoparticles are non-viral gene delivery vectors which can self-assemble into stable spherical micelles or fibrous structures with hydrophilic shells and hydrophobic cores with aqueous solutions. APnPs contain the peptide arginine–glycine– aspartic acid (RGD) which not only promotes cell attachment but enhances other cell functions such as cell proliferation. The general objective of this work is to obtain coatings made of nano hydroxyapatite and APnPs, as there is no previous research in which amphiphilic peptide nanoparticles are used as metallic implants' coatings and RGD peptides offer a good strategy to control material's interface. Hydroxyapatite was characterized by the following techniques: XRD, FTIR, SEM, TEM, ED and EDS. Coatings made of pHEMA hydrogel, nanocrystalline hydroxyapatite and APnPs were obtained over Ti6Al4V substrates. The osteoblasts adherence as well as morphology was obtained for all the coatings synthesized. The coatings made of pHEMA+nHA1+APnPs showed the greatest osteoblasts adherence when compared with coatings obtained with pHEMA, pHEMA+nHA1 and pHEMA+APnPs. Therefore, Ti6Al4V implants coated with pHEMA+nHA1+APnPs will have higher osseointegration.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se ha intentado encontrar materiales más adecuados para la fabricación de implantes óseos. Con el paso de los años, las investigaciones realizadas han permitido establecer los requisitos que estos implantes deben cumplir para tener el funcionamiento deseado dentro del cuerpo humano. Primeramente, los materiales deben tener las propiedades mecánicas adecuadas para no deformarse durante su estadía en el cuerpo humano; así mismo, se busca que estos materiales puedan transmitir de manera adecuada las cargas a los huesos a los que están integrados. De esta manera se buscan materiales que tengan un módulo de Young cercano al del hueso humano (30 GPa), buena resistencia a la deformación permanente, buena resistencia a la fractura y buena resistencia a la fatiga [1, 2, 3]. También se busca que estos materiales sean biocompatibles (material que cumple su función sin sufrir daños, ni causar daños al medio biológico), bioactivos (material que produce la formación de hueso entre el tejido y el material) y que generen osteointegración (conexión estructural y funcional entre hueso vivo y la superficie del implante) [4, 5, 6]. Finalmente, se quieren materiales resistentes a la corrosión para evitar daños al medio biológico. Los metales, en especial el titanio y sus aleaciones presentan buenas propiedades mecánicas y corrosivas para este fin debido al enlace metálico que estos presentan [7]. Algunos cerámicos, como el hidróxido fosfato de calcio o hidroxiapatita (HA), tienen un módulo de Young cercano al del hueso y buena osteointegración; sin embargo, ninguno presenta buenas propiedades mecánicas. Por otro lado, los polímeros solo presentan un módulo de Young cercano al del hueso. Considerando estas características, se ha decidido que los metales, en especial el titanio y sus aleaciones, son los materiales que cumplen con más de los requisitos necesarios y son por tanto los más adecuados para la

fabricación de implantes óseos; sin embargo, la osteointegración sigue siendo un tema de estudio en la actualidad.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Hidroxiapatita (HA)

A pesar de que los implantes metálicos, en particular el titanio y sus aleaciones, tienen altas resistencias mecánicas, alta resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad, éstos suelen generar poca cantidad de hueso en su superficie y no tienen una buena osteointegración [8]. Estos implantes metálicos presentan altos índices de fallas después de 10 a 15 años de implantación. Por ejemplo, en los Estados Unidos, cerca del 11% de los reemplazos de cadera y el 8% de los reemplazos de rodilla fueron revisiones de reemplazos fallidos durante el 2003 [9]. Por esta razón, desde los inicios de los años 80's los investigadores han trabajado en la modificación de las superficies de los implantes metálicos para promover su osteointegración. Una alternativa para mejorar la osteointegración y reducir el desgaste de los implantes óseos es recubrir sus superficies con materiales similares a los que se encuentran en el hueso. Los fosfatos de calcio parecen ser buenos candidatos para este fin, pues el 65 % de la fase mineral del hueso está compuesta por $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, hidroxiapatita; sin embargo, solo algunos de los fosfatos de calcio son útiles debido a que su solubilidad incrementa cuando su razón Ca/P se reduce. En la Tabla 2.1, se muestra la relación Ca/P de los fosfatos de calcio más utilizados para recubrir implantes óseos.

Tabla 2.1 Ca/P de los fosfatos de calcio más usados para recubrir implantes óseos [10].

Fosfato de calcio	Fórmula	Estructura	Ca/P
Brushita	$\text{CaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$	Monoclínica	1.0
Monetita	CaHPO_4	Triclínica	1.0
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$	Triclínica	1.33
Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Hexagonal	1.50
Whitlockita	$\text{Ca}_{15}\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_{12}$	Hexagonal	1.50
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hexagonal	1.67
Fluorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	Hexagonal	1.67
Cluorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	Hexagonal	1.67
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	-	2.0

La hidroxiapatita, es considerada la mejor opción para recubrir los implantes metálicos [11, 12]. La hidroxiapatita tiene una estructura cristalina hexagonal con parámetros de red $a = 9.43 \text{ \AA}$ y $c = 6.88 \text{ \AA}$ [13]. En la Figura 2.1 (A), se muestra su estructura cristalina. La Figura 2.1 (B), muestra las posiciones teóricas de los iones en la celda unitaria de hidroxiapatita [14].

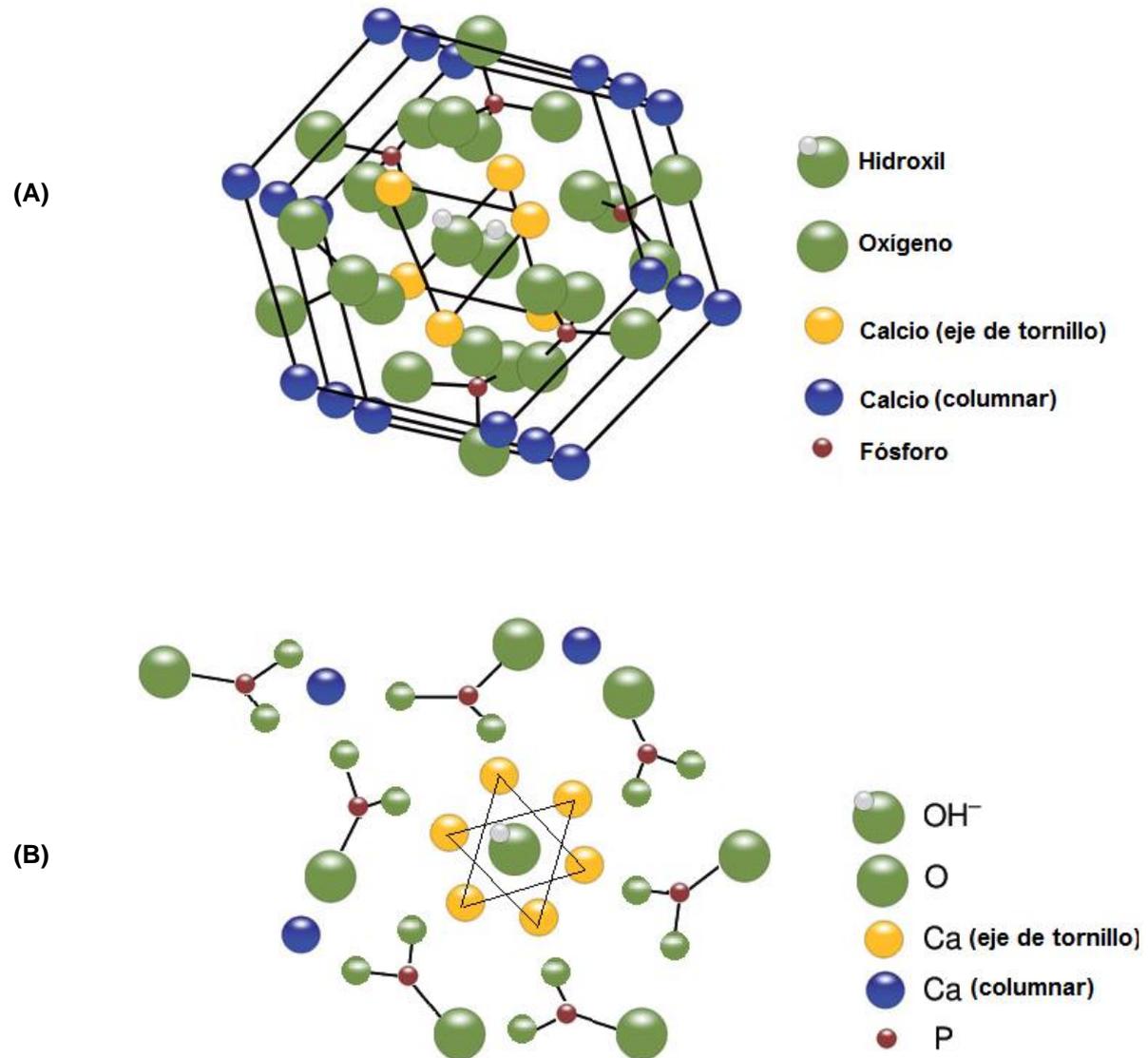


Figura 2.1 A) Estructura cristalina de la hidroxiapatita. B) Posiciones teóricas de los iones en la celda unitaria de hidroxiapatita [14].

En la Figura 2.2, se muestra el patrón de difracción correspondiente a la hidroxiapatita estequiométrica.

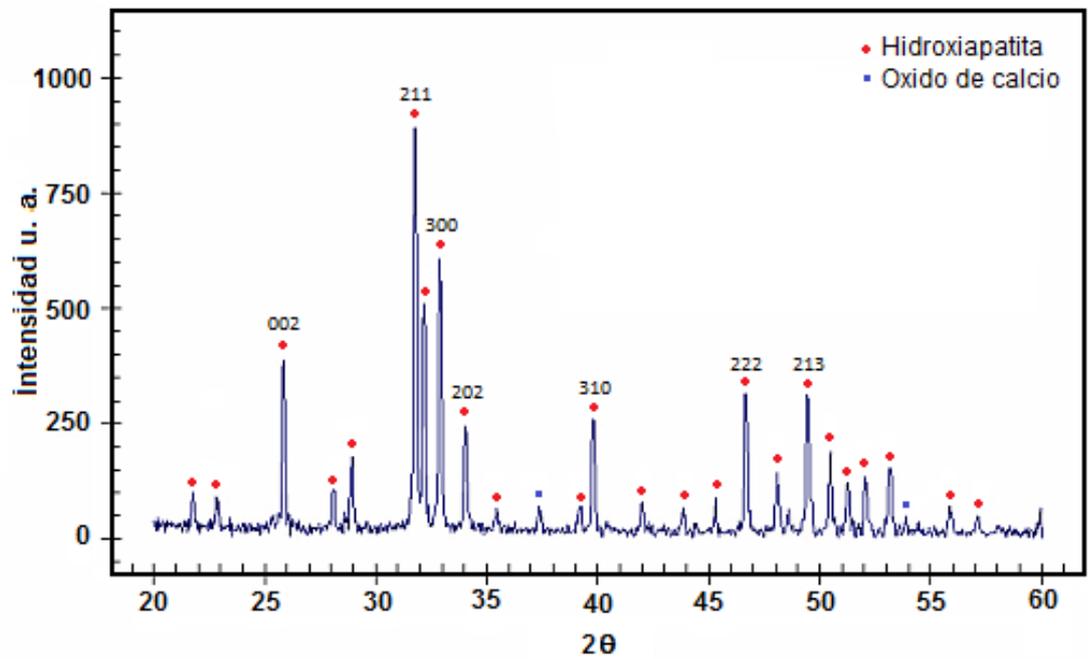


Figura 2.2 Patrón de difracción de hidroxiapatita estequiométrica [10].

La Fig. 2.3 muestra el espectro infrarrojo de absorción de la hidroxiapatita donde se observan las bandas correspondientes a los iones PO_4^{3-} , CO_3^{2-} y OH^- .

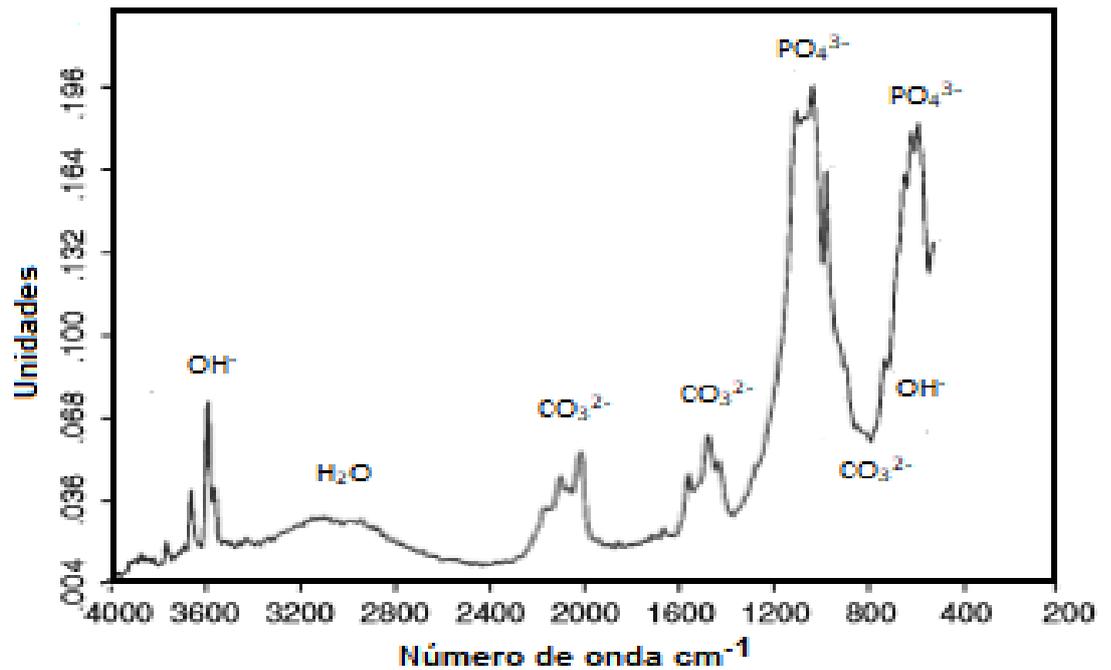


Figura 2.3 Espectro infrarrojo de absorción de la hidroxiapatita [10].

La estructura de la hidroxiapatita es muy hospitalaria al permitir la sustitución de todos sus iones. Las sustituciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- en la estructura generan cambios en las propiedades (parámetros de la red, morfología y solubilidad) sin generar cambios en el tipo de estructura.

Por ejemplo, la sustitución del ion F^- por el ion OH^- causa una contracción en el eje "a" sin generar cambios en el eje "c", esto genera incremento en la cristalinidad, incremento en el tamaño de cristal y mayor estabilidad a la estructura. La Tabla 2.2, muestra los parámetros de red de apatitas minerales, sintéticas y biológicas.

Tabla 2.2 Parámetros de red de apatitas minerales, sintéticas y biológicas [15].

Apatita	Máximo Sustituto	Parámetros de red	
		"a"	"c"
Mineral			
Hidroxiapatita (Holly Springs)	-	9.422	6.880
Fluorapatita (Durango, Mex)	F	9.375	6.880
Dahlita (Wyoming)	CO ₃	9.380	6.885
Stafellite (Staffel, Alemania)	CO ₃ , F	9.345	6.880
Fosforito marino (w. USA)	CO ₃ , F	9.322	6.882
Sintética (no acuosa)			
OH-apatita	-	9.441	6.882
F-apatita	F	9.375	6.880
Cl-apatita	Cl	9.646	6.771
CO ₃ apatita	CO ₃	9.544	6.859
Sintética (acuosa)			
OH-apatita (deficiente de Ca)	HPO ₄	9.438	6.882
F-apatita	F	9.382	6.880
(Cl,OH)-apatita	Cl	9.515	6.858
CO ₃ -OH-apatita	CO ₃	9.298	6.924
CO ₃ -F-apatita	CO ₃ , F	9.268	6.924
Sr-apatita	Sr	9.739	6.913
Pb-apatita	Pb	9.894	7.422
Ba-apatita	Ba	10.162	7.722
Biológica			
CO ₃ -OH-apatita (esmalte)	HPO ₄ , Cl, CO ₃	9.441	6.882
F-apatita (Esmalte de tiburón)	Mg, F, CO ₃	9.382	6.880

La Tabla 2.3 muestra los efectos cualitativos de la sustitución de los iones Ca²⁺, PO₄³⁻ y OH⁻, el signo (+) corresponde al aumento en el parámetro, el signo (-) representa reducción en el parámetro y (nc) significa que no hay cambio en el parámetro.

Tabla 2.3 Efectos de algunos sustitutos de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- sobre los parámetros de red [15].

Sustituto	Radio iónico (Å)	Parámetro de red		Cristalinidad
		"a"	"c"	
Calcio, Ca^{2+}	0.99	9.438	6.882	
Estroncio, Sr^{2+}	1.12	(+)	(+)	(nc)
Bario, Ba^{2+}	1.34	(+)	(+)	(-)
Plomo, Pb^{2+}	1.20	(+)	(+)	(-)
Potasio, K^+	1.33	(nc)	(nc)	(nc)
Sodio, Na^+	0.97	(nc)	(nc)	(nc)
Litio, Li^+	0.68	(nc)	(nc)	(nc)
Magnesio, Mg^{2+}	0.66	(-)	(-)	(-)
Cadmio, Cd^{2+}	0.97	(-)	(-)	(-)
Manganeso, Mn^{2+}	0.80	(-)	(-)	(-)
Zinc, Zn^{2+}	0.74	(+)	(+)	(-)
Aluminio, Al^{3+}	0.51	(+)	(+)	(-)
OH^-				
Flúor, F^-	1.36	(-)	(nc)	(+)
Cloro, Cl^-	1.81	(+)	(-)	(nc)
PO_4^{3-}				
Carbonato, CO_3^{2-}		(-)	(+)	(-)
HPO_4^{2-}		(+)	(nc)	(nc)

Las apatitas biológicas, que comprenden las fases minerales de tejidos calcificados (esmalte, dentina, hueso), difieren de la HA pura en estequiometría, composición, cristalinidad y otras propiedades mecánicas.

Las apatitas biológicas usualmente están deficientes de calcio y contienen al ion carbonato; por esta razón, se conocen como apatitas carbonatadas. Desde los años 80's se han llevado a cabo varios estudios clínicos en los que se estudia la respuesta de los implantes metálicos recubiertos con HA.

Los reportes indican que los implantes recubiertos con HA presentan una mejor osteointegración con respecto a los implantes no recubiertos.

En la Tabla 2.4, se muestra la comparación en composición, propiedades cristalográficas y propiedades mecánicas de esmalte, hueso y HA.

Tabla 2.4 Composición, propiedades cristalográficas, propiedades mecánicas de esmalte, hueso y HA [15].

	Esmalte	Hueso	HA
Composición (% peso)			
Calcio, Ca ²⁺	36.0	24.5	39.6
Fósforo, P	17.7	11.5	18.5
(Ca/P) molar	1.62	1.65	1.67
Sodio, Na ⁺	0.5	0.7	-
Potasio, K ⁺	0.08	0.03	-
Magnesio, Mg ²⁺	0.44	0.55	-
Carbonato CO ₃ ²⁺	3.2	5.8	-
Flúor, F ⁻	0.01	0.02	-
Cloro, Cl ⁻	0.30	0.10	-
Total inorgánico	97.0	65.0	100
Total orgánico	1.0	25.0	-
H ₂ O absorbida	1.5	9.7	-
Propiedades cristalográficas			
Parámetros de red			
Eje-a	9.441	9.419	9.422
Eje-c	6.882	6.880	6.880
Índice de cristalinidad	70-75	33-37	100
Tamaño de cristal	1300 x 300 A	250 X 25-50	-
Productos después del sinterizado(950°C)			
	HA + TCP	HA + CaO	HA
Propiedades mecánicas			
Módulo de elasticidad (106 MPa)	0.014	0.020	0.01
Resistencia a la tensión (MPa)	70	150	100

2.1.1 Recubrimientos por Plasma Spray

La técnica de plasma spray es la más comúnmente empleada para la obtención de recubrimientos de HA. En esta técnica, se genera un arco eléctrico entre dos electrodos y se hace pasar un gas a través del mismo.

El arco eléctrico convierte el gas en un plasma con una velocidad de hasta 800 m/s y temperatura de 20,000°K. El polvo cerámico es

agregado al plasma que se encarga de llevarlo hasta el sustrato [16]. La Figura 2.4 muestra un esquema de esta técnica.

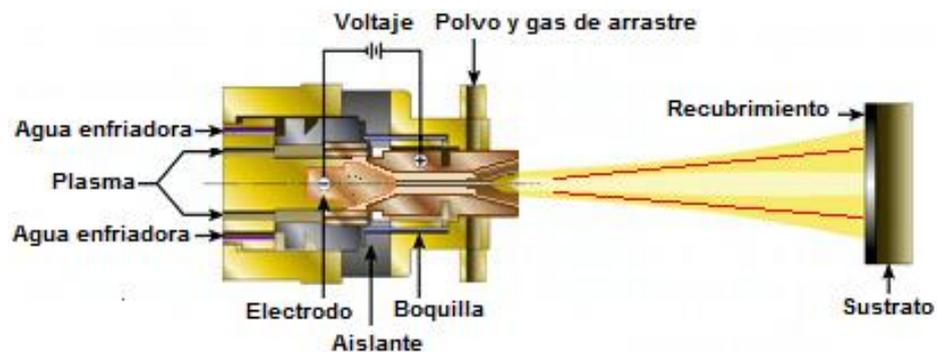


Figura 2.4 Esquema de la técnica plasma spray [17].

Esta técnica presenta ciertos inconvenientes que afectan la formación de los recubrimientos. Primeramente, esta técnica es difícil de montar y operar; por otro lado, es complicado recubrir prótesis metálicas con geometrías irregulares debido a que los espesores obtenidos no son tan uniformes y superan $50\ \mu\text{m}$. Adicionalmente, en ocasiones el polvo reacciona con el oxígeno y/o nitrógeno presente en el plasma [18].

También puede ocurrir la degradación de algunos componentes del recubrimiento debido a las corrientes y voltajes aplicados para la formación del plasma. Por lo anterior, es necesario explorar otros métodos de depósito para la formación de recubrimientos.

2.2 Materiales nanoestructurados

Los materiales nanoestructurados son aquellos materiales cuyo tamaño de cristal se encuentra entre 1 y 100 nm (al menos en una dirección) y contienen 10^6 átomos o menos en el clúster.

En la Figura 2.5, se muestra la comparación entre el radio de moléculas, nanopartículas y material voluminoso según el número de átomos.

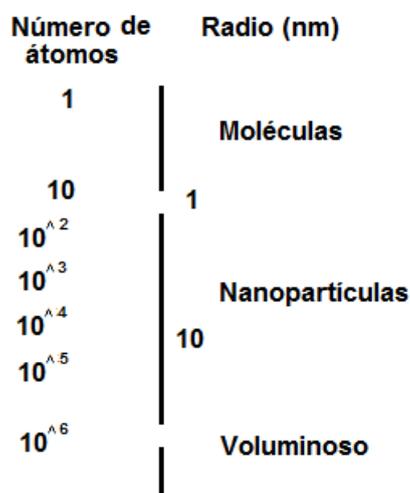


Figura 2.5 Radio de moléculas, nanopartículas y material voluminoso según el número de átomos en el clúster [19].

Las nanoestructuras pueden ser clasificadas por sus dimensiones. De esta manera, si se reduce una de las dimensiones a nanómetros y las otras dos se mantienen grandes, se obtiene la estructura conocida como pozo cuántico. Si se reducen dos dimensiones y una se mantiene grande, entonces tenemos un alambre cuántico. Finalmente, si las tres dimensiones se reducen a nanómetros, la estructura se llama punto cuántico.

Al reducir las dimensiones de un material, las propiedades físicas se mantienen iguales en un inicio; sin embargo, cuando se comienzan a alcanzar dimensiones nanométricas, ligeros cambios se comienzan a experimentar. Cuando las dimensiones caen por debajo de 100 nm, los cambios observados son más drásticos. Estos cambios se deben a que las longitudes de los materiales son similares a las longitudes críticas para una “nueva clase” de fenómenos físicos.

La Figura 2.6, muestra la generación progresiva de estructuras rectangulares y estructuras curvilíneas.

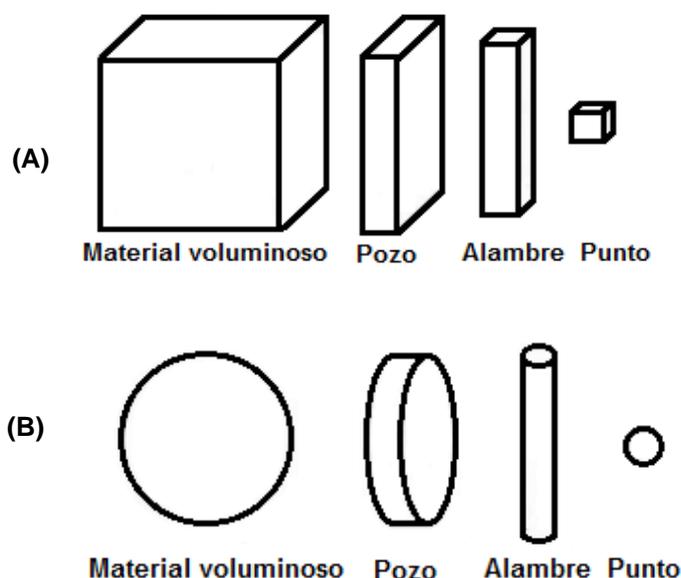


Figura 2.6 Generación progresiva. A) Estructuras rectangulares. B) Estructuras curvilíneas [19].

Cuando la dimensión de los materiales es menor que la longitud crítica de algún fenómeno, sus propiedades dependen de la dispersión en la superficie de la nanoestructura, por esta razón se busca controlar el tamaño de las nanopartículas. Las propiedades estructurales también cambian debido a que aumenta la energía libre superficial, lo que provoca cambios en el espaciado interatómico de su estructura. Las propiedades mecánicas dependen de la cantidad de defectos y cuando el tamaño de las partículas es menor disminuye la capacidad de las nanoestructuras para tener defectos. Las propiedades magnéticas dependen de la relación superficie/volumen la cual aumenta al disminuir el tamaño de las partículas, un gran número de átomos se encuentra en la superficie que es donde se presenta un ambiente local distinto, con un acoplamiento magnético diferente con los átomos vecinos. De esta manera surgen fenómenos en las nanoestructuras tales como supermagnetismo y super-paramagnetismo.

Las propiedades ópticas (color, desplazamiento de máximos de absorción y emisión hacia regiones de mayor energía) en semiconductores y metales también cambian. Se dan cambios en las propiedades electrónicas de los sistemas nanoestructurados que se deben principalmente a efectos mecánico-cuánticos.

También cambian considerablemente sus puntos de fusión, sus propiedades catalíticas, reactividad química, potencial de ionización, solubilidad, etc. [19].

2.3 Nanohidroxiapatita (nHA)

Debido a que los nanomateriales presentan mejoras en las propiedades o nuevas propiedades físicas en comparación a los micromateriales y, dado que la hidroxiapatita del hueso humano es nanométrica, los investigadores han decidido emplear nanohidroxiapatita para el recubrimiento de prótesis metálicas.

Al igual que la hidroxiapatita micrométrica, la hidroxiapatita nanométrica está compuesta por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y presenta una estructura hexagonal con parámetros de red $a = 9.43 \text{ \AA}$ y $c = 6.88 \text{ \AA}$. A diferencia de la hidroxiapatita micrométrica, la hidroxiapatita nanométrica presenta un tamaño de cristal inferior a los 100 nm. La nanohidroxiapatita ha sido obtenida por diversos métodos, algunos de estos son: separación de fase inducida térmicamente, depósito electroforético, tratamiento térmico, pulverización de magnetron por radiofrecuencia, y precipitación [20, 21, 22]. La literatura reporta recubrimientos de nanohidroxiapatita de 1.5 \mu m de espesor [23].

La nanohidroxiapatita ha presentado excelentes propiedades de citocompatibilidad con los osteoblastos; por otro lado, estudios *in*

vitro e *in vivo* han demostrado mejoras cuando las prótesis metálicas son recubiertas con hidroxiapatita nanocristalina.

Por ejemplo, un estudio *in vivo* demostró que prótesis de tantalum recubiertas con nanohidroxiapatita, tardaron únicamente 2 semanas para una completa oseointegración, mientras que aquellas recubiertas con hidroxiapatita de tamaño convencional requirieron de 8 semanas para completar este proceso [24].

2.4 Nanopartículas de péptido anfifílico (APnPs)

Las nanopartículas de péptido anfifílico, son vectores de carga genética no virales que pueden auto-ensamblarse en micelas esféricas o estructuras fibrosas con cubiertas hidrofílicas y centros hidrofóbicos con soluciones acuosas y son comúnmente empleados como transporte de medicamentos [25]. Las APnPs contienen el péptido ácido arginilglicilaspártico (RGD), que no solo promueve la adherencia de las células sino también otras funciones celulares como la proliferación celular. Recubrir biomateriales con péptidos RGD ofrece una buena estrategia para controlar la interfaz del material y así poder obtener un material bioactivo [26]. Estos materiales de auto-ensamble son muy hidrofílicos en el exterior y por ello pueden mejorar la mojabilidad de los materiales que recubren, mejorando así la adherencia de osteoblastos. La Figura 2.7, muestra la estructura de un péptido anfifílico.

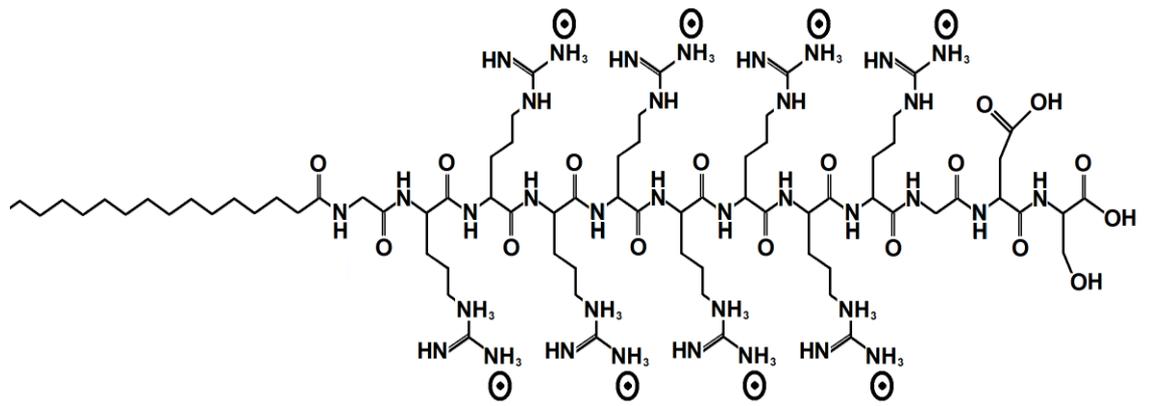


Figura 2.7 Estructura química del péptido anfifílico (APnPs) [27].

La Figura 2.8 muestra el tipo de ensamble que presentan las nanopartículas de péptido anfifílico.

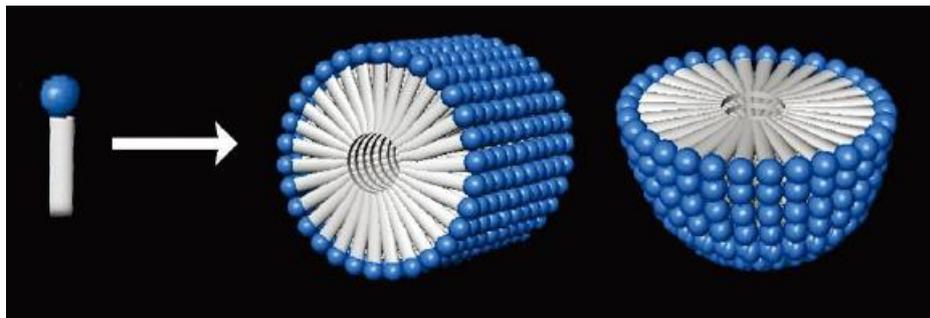


Figura 2.8 Ensamble de los péptidos anfifílicos [28].

Las esferas azules representan las colas hidrofílicas y los extremos blancos representan las partes hidrofóbicas.

2.5 Técnicas de síntesis

2.5.1 Precipitación química

En una reacción de precipitación química, los reactivos (compuestos iónicos) se disuelven para formar cationes y aniones. Uno de los cationes se une con el anión del otro compuesto para formar un

compuesto insoluble que finalmente precipita al fondo de la solución [29]. El precipitado puede ser extraído por diversos métodos, como decantado, centrifugado o evaporación de la solución.

Una solución es una mezcla homogénea de dos o más sustancias, en donde una de ellas (disolvente) es el medio en el cual otra sustancia (solute) se disuelve. La disolución de un sólido iónico se logra cuando se separan ciertos iones de otros de carga opuesta. El agua es un buen disolvente, pues cuenta con un extremo positivo y otro negativo.

Al disolver un compuesto iónico en agua, cada ion positivo queda rodeado por moléculas de agua con el extremo negativo orientado hacia el ion positivo, mientras que cada ion negativo queda rodeado por moléculas de agua con el extremo positivo orientado hacia el ion negativo. No todos los compuestos iónicos se disuelven completamente en agua. Muchos sólo se disuelven en grado bajo, mientras que otros son prácticamente insolubles.

Las reglas para predecir la solubilidad de los compuestos solubles e insolubles son las siguientes:

Compuestos solubles

- Casi todas las sales de Na^+ , K^+ , NH_4^+
- Sales de NO_3^- , ClO_3^- , ClO_4^- y CH_3CO_2^-
- Casi todas las sales de Cl^- , Br^- , I^- , con excepción de haluros de Ag^+ , Hg_2^{2+} , Pb^{2+}
- Compuestos que contienen F^- , con excepción de fluoruros de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+}
- Sales de SO_4^{2-} , con excepción de sulfatos de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+}

Compuestos insolubles

- Todas las sales de CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, CrO_4^{2-} , con excepción de las sales de NH_4^+ y los cationes de los metales alcalinos
- La mayoría de los sulfuros metálicos, con excepción de las sales de NH_4^+ y los cationes de los metales alcalinos
- La mayoría de los hidróxidos y óxidos metálicos, con excepción de las sales de NH_4^+ y los cationes de los metales alcalinos

2.5.2 Polimerización por radicales libres

La polimerización es la reacción química que consiste en la unión de monómeros (moléculas pequeñas) para la formación de polímeros.

Las reacciones de polimerización pueden clasificarse de dos maneras: sistema de adición-condensación y sistema crecimiento de cadena-crecimiento en etapas. El sistema de adición-condensación divide las polimerizaciones en dos tipos: polimerización por adición y polimerización por condensación.

La polimerización por adición es aquella en la que las moléculas enteras del monómero pasan a formar parte del polímero, mientras que la polimerización por condensación es aquella en la que parte de los monómeros se pierde en el proceso de polimerización. El sistema de crecimiento en etapas divide las polimerizaciones en dos tipos: polimerización por crecimiento de cadena y polimerización por crecimiento en etapas.

En una reacción por crecimiento en etapas, las cadenas en crecimiento pueden reaccionar entre sí para formar cadenas más largas; por otro lado, en una polimerización por crecimiento de cadena, sólo los monómeros pueden reaccionar con cadenas en crecimiento. La polimerización en cadena presenta reacciones de iniciación, propagación y terminación. La iniciación de una

polimerización en cadena puede ser inducida por calor, agentes químicos (iniciadores) o radiación (ultravioleta y rayos gamma).

La polimerización iniciada por un iniciador radical se conoce como polimerización de radicales libres, mientras que la polimerización iniciada por un catión y un anión se conoce como polimerización catiónica y aniónica respectivamente. La polimerización por radicales libres consiste en la síntesis de polímeros a partir de monómeros con doble enlace de carbono y radicales libres.

Como todas las reacciones en cadena, la polimerización por radicales libres tiene etapas de iniciación, propagación y terminación. La etapa de iniciación comienza con la separación de un iniciador radical común como el Azo-Bis-IsobutiroNitrilo (AIBN), que se muestra en la Figura 2.9

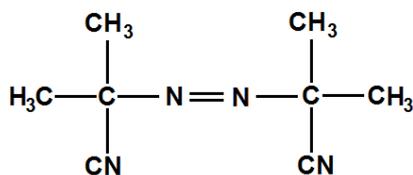


Figura 2.9 Azo-Bis-IsobutiroNitrilo (AIBN) [30].

Estas moléculas se separan cuando se rompe uno de sus enlaces para dar lugar a dos fragmentos llamados radicales libres, cada uno con un electrón desapareado. La Figura 2.10, muestra el proceso de descomposición del Azo-Bis-IsobutiroNitrilo en radicales libres.

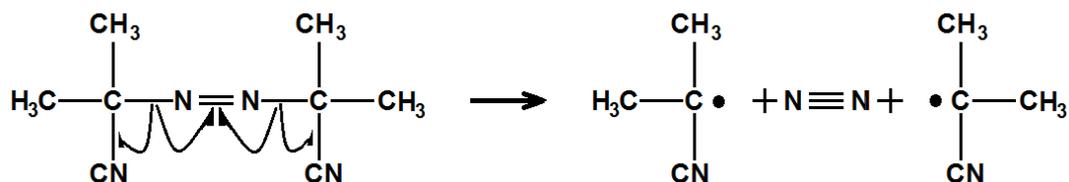


Figura 2.10 Descomposición del AIBN en radicales libres [30].

La iniciación por descomposición de un iniciador puede representarse por la ecuación (1):



Donde I = iniciador

R^{\bullet} = radical libre de bajo peso molecular

La velocidad de descomposición de los iniciadores depende del disolvente y de la temperatura de polimerización. Una vez que se forman los radicales libres, éstos tienden a atacar pares electrónicos de los dobles enlaces de los monómeros vinílicos.

Así, el electrón desapareado del radical libre se acerca al doble enlace del monómero para aparearse con uno de los electrones, formando un nuevo enlace químico entre el radical libre y uno de los carbonos del doble enlace del monómero.

El otro carbono del doble enlace se queda con un electrón desapareado. La Figura 2.11, muestra la reacción entre el radical libre formado a partir del peróxido del benzoilo y una molécula de etileno.

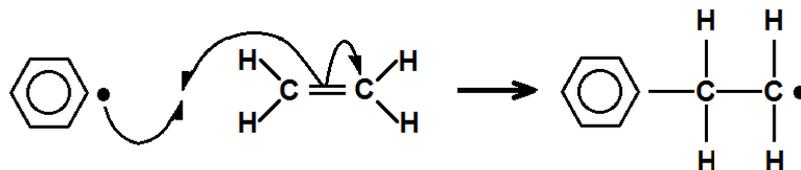


Figura 2.11 Reacción entre un radical libre y una molécula de etileno [30].

El resultado de la reacción es la formación de un nuevo radical libre (fin de la etapa de iniciación).

La reacción de propagación comienza cuando el nuevo radical libre reacciona con otro monómero para formar otro radical libre y ésta continúa hasta que el proceso de adicionar moléculas monoméricas a la cadena termina.

La Figura 2.12, muestra una reacción de propagación empleando el iniciador peróxido de benzoilo.

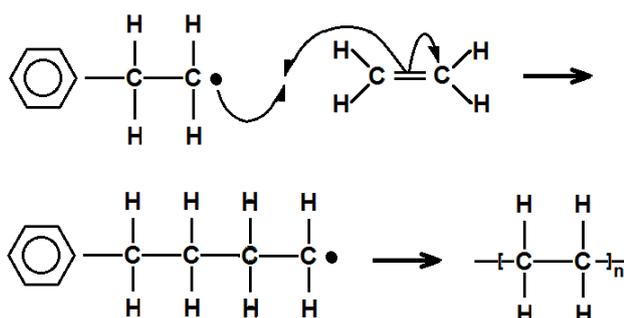


Figura 2.12 Reacción de propagación empleando el iniciador peróxido de benzoilo [30].

El proceso de terminación se produce cuando:

A. Se encuentran dos cadenas en crecimiento

En la Figura 2.13, se muestra la unión de dos cadenas en crecimiento.

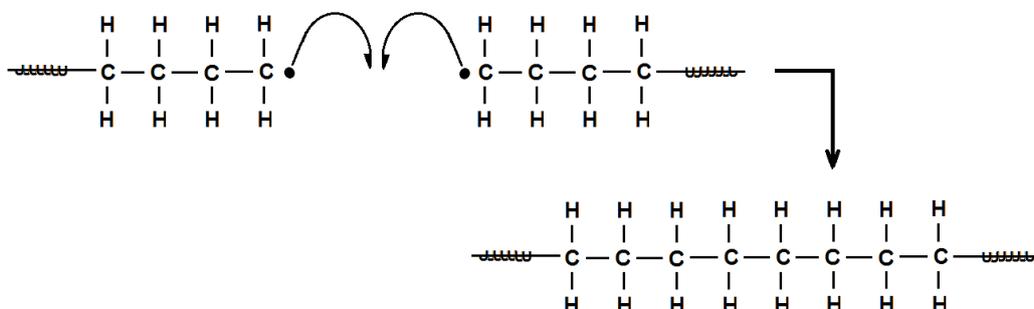


Figura 2.13 Unión de dos cadenas en crecimiento [30].

B. Se da la desproporción de dos radicales

En este caso dos cadenas en crecimiento se acercan y el electrón desapareado de una de ellas, en vez de unirse al electrón desapareado de la otra cadena, encuentra un compañero en el enlace carbono-hidrógeno del átomo de la otra cadena. La Figura 2.14, muestra la desproporción de dos radicales.

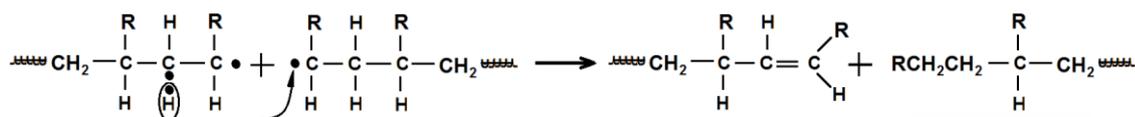


Figura 2.14 Desproporción de dos radicales [30].

C. Existe transferencia de cadena al polímero

En este caso reacciona un radical polimérico con una molécula u otro radical polimérico por transferencia de un átomo de hidrógeno.

En ocasiones, el electrón desapareado en el extremo de la cadena se aparea con un electrón de un enlace carbono-hidrógeno de otra cadena polimérica.

Esto deja un electrón desapareado en el medio de la cadena que no puede formar un doble enlace terminal, pero si puede reaccionar con una molécula de monómero. La Figura 2.15, muestra la transferencia de cadena al polímero [30].

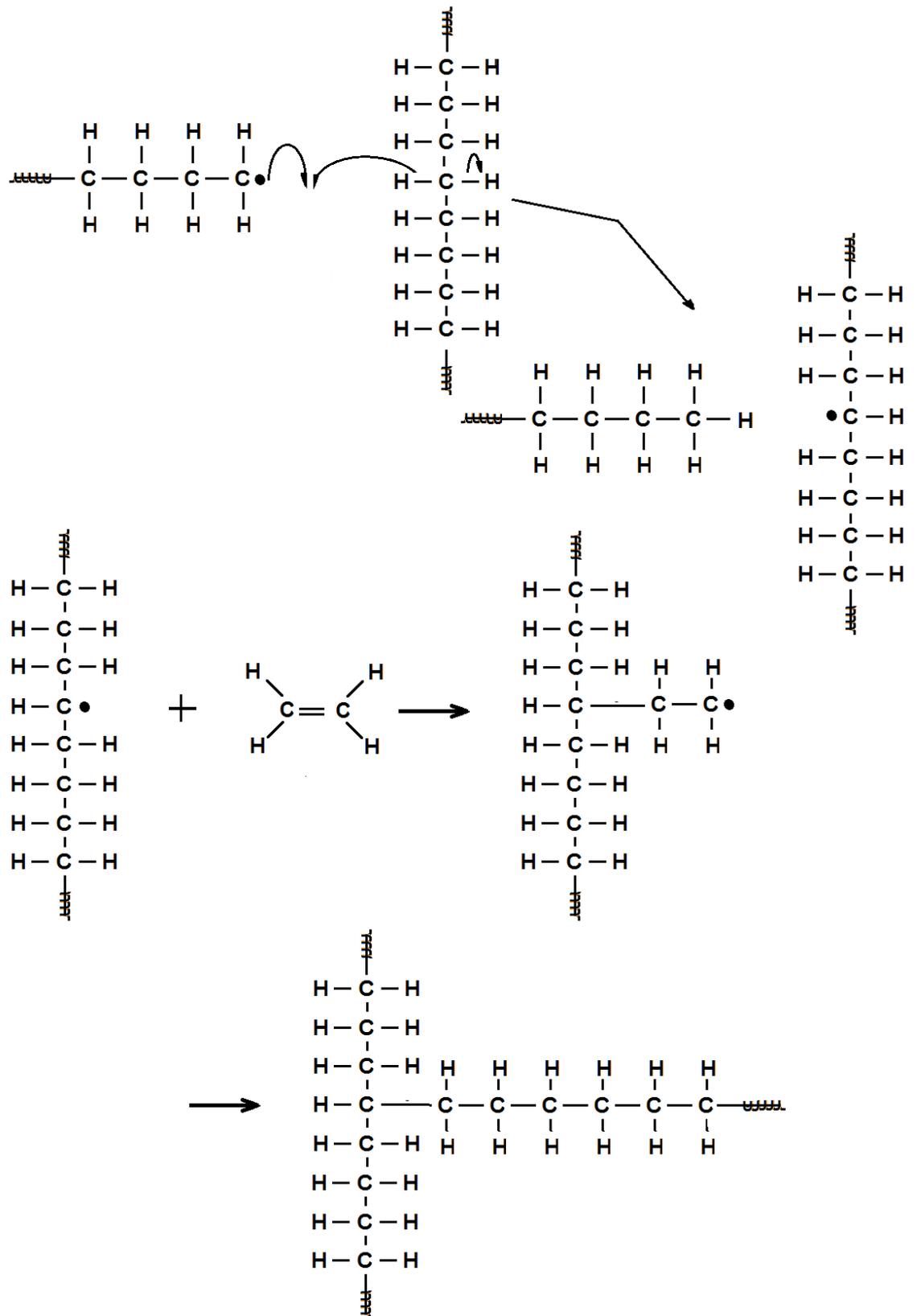


Figura 2.15 Transferencia de cadena al polímero [30].

2.5.3 Depósito por lanzamiento de gota

La técnica de lanzamiento de gota es una técnica de depósito usada para preparar películas delgadas en superficies pequeñas ($\sim 1 \text{ cm}^2$) y requiere una muy baja cantidad de solvente. En esta técnica, una solución en forma de gotas es depositada en el sustrato y posteriormente se deja secando bajo condiciones controladas (presión y temperatura) impidiendo que la misma se derrame. Una vez que las gotas están depositadas sobre el sustrato, el líquido se esparce sobre la superficie debido a las fuerzas interfaciales que atraen a la gota hacia la parte exterior del sustrato. Cuando varias gotas se depositan sobre la superficie del sustrato, los bordes de las gotas entran en contacto para mezclarse y formar una gota no circular. Las gotas no circulares tienen razones de depósito dispares, regiones altamente convexas, flujo de evaporación más alto y depósitos más densos. Las películas producidas por este método no son uniformes debido a las condiciones de secado inconsistentes y la falta de control. Estas películas son más gruesas en el centro y más delgadas en los bordes debido a que el grosor depende del volumen de dispersión y la concentración de partículas, condiciones que son fácilmente manipuladas. La mayoría de las ocasiones es deseable usar solventes que no son volátiles [31, 32]. La Figura 2.16 muestra un esquema de esta técnica.

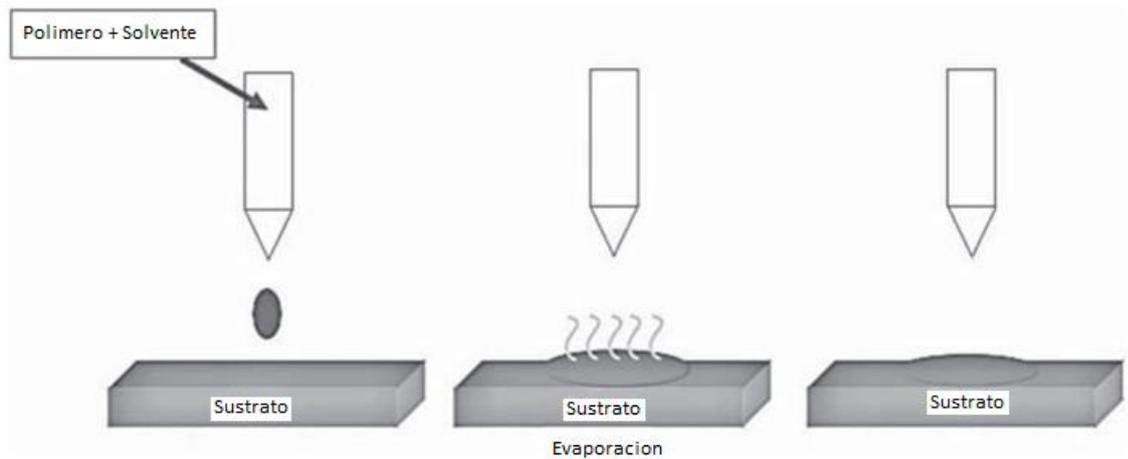


Figura 2.16 Técnica de lanzamiento de gota [31].

2.6 Técnicas de caracterización

Se utilizaron diversas técnicas de caracterización para obtener las propiedades estructurales, químicas, morfológicas y de biocompatibilidad de nuestros materiales.

2.6.1 Difracción de rayos-X (XRD)

Los rayos-X son radiación electromagnética con longitudes de onda entre 0.1 \AA y 100 \AA . La difracción de rayos-X es un fenómeno que permite revelar detalles de la estructura interna de los materiales; es decir, del ordenamiento que tienen los átomos que constituyen un determinado material. Si el ordenamiento es de largo alcance, decimos que se tiene un material cristalino; por el contrario, si sólo se tiene ordenamiento de corto alcance, tenemos un material amorfo. El difractómetro, es el instrumento experimental que utiliza dicho fenómeno para estudiar la estructura cristalina de los materiales. Este dispositivo está compuesto de un tubo al vacío en cuyo interior se encuentra un cátodo (filamento de tungsteno) y un ánodo (bloque de cobre) entre los que se aplica una diferencia de

potencial entre 30 kV y 50 kV. En la Figura 2.17, se muestra esquemáticamente el proceso de difracción de rayos-X.

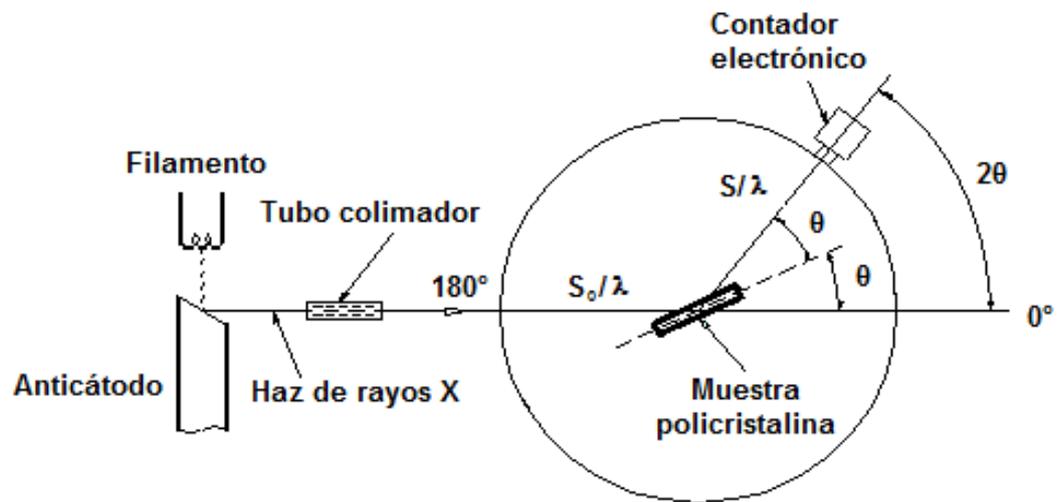


Figura 2.17 Proceso de difracción de rayos-X [33].

En este instrumento, los rayos-X son producidos en un dispositivo como el que se muestra en la Figura 2.18.

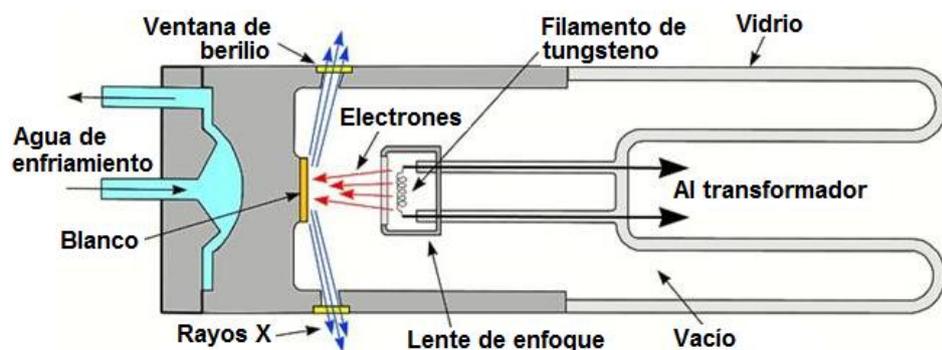


Figura 2.18 Esquema del tubo de rayos-X [34].

El filamento es calentado por una corriente de 3 A, que genera la emisión de electrones que son rápidamente atraídos hacia el bloque de cobre debido al alto voltaje aplicado. Estos electrones son enfocados con la ayuda de una copa metálica que tiene el mismo voltaje que el filamento y se encuentra alrededor del mismo. Algunos

electrones de alta energía cinética desaceleran rápidamente produciendo radiación electromagnética continua. Algunos otros colisionan con electrones de las capas más internas de los átomos.

Cuando un electrón proveniente del filamento golpea a un electrón de la capa interna del átomo de cobre, el átomo queda en un estado excitado debido al paso del electrón de la capa interna hacia un nivel más alto e incluso ionizando al átomo; posteriormente, un electrón de capa externa pasa a ocupar la vacancia dejada por el otro electrón, emitiendo radiación característica en el proceso, y dejando al átomo en un estado normal de energía. De este modo, el espectro de la radiación emitida está compuesto por radiación continua y radiación característica. Los experimentos de difracción de rayos-X requieren radiación lo más monocromática posible; por esta razón, se utiliza un filtro que absorbe la radiación continua y característica no deseada. Los rayos-X filtrados se hacen incidir sobre el material que se desea estudiar.

La Figura 2.19 muestra el proceso de difracción de rayos-X en un cristal.

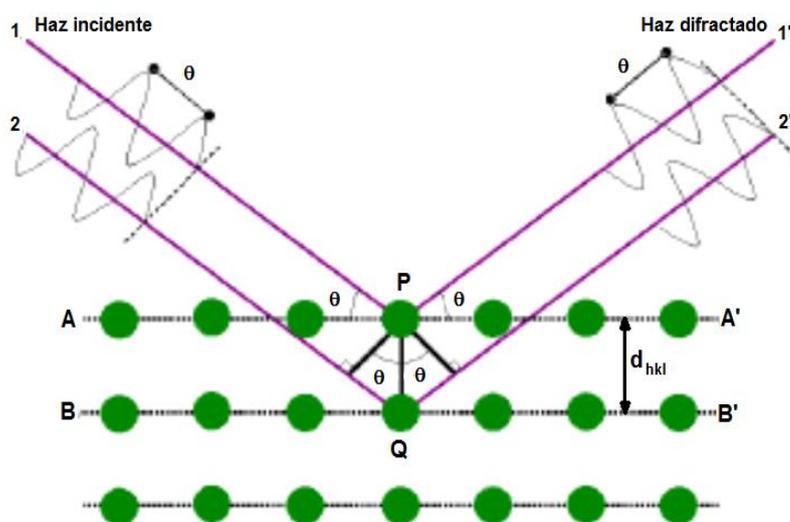


Figura 2.19 Proceso de difracción de rayos-X en un cristal [35].

Estos rayos interactúan con los electrones de los átomos y son desviados de sus trayectorias originales. La difracción ocurre cuando la diferencia de las trayectorias de las ondas es igual a un múltiplo de la longitud de onda. En este caso se satisface la ecuación (3) en la condición de Bragg:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3)$$

Donde d = distancia interplanar

λ = longitud de onda de la radiación incidente

n = número entero

Por lo tanto, se presenta interferencia constructiva y un incremento en la intensidad del haz difractado. Cuando los átomos del material bajo estudio presentan un arreglo periódico, su patrón de difracción estará formado por picos de interferencia reflejados en aquellos ángulos que cumplan la condición de Bragg. El patrón de difracción será característico de la estructura cristalina y del tipo de átomos que la formen [36].

2.6.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

(FTIR)

Un enlace covalente puede ser considerado como un resorte elástico conectado a dos pelotas (átomos). Entre más fuerte sea el resorte, más rápida será la vibración; de esta manera, la frecuencia de vibración indica la resistencia del resorte y puede ser relacionada con el tipo de enlace. En la Figura 2.20, se muestra un esquema de las vibraciones moleculares.



Figura 2.20 Esquema de las vibraciones moleculares [37].

Todas las moléculas tienen su propia frecuencia de vibración. Las vibraciones de las moléculas orgánicas típicas caen dentro de diferentes rangos de frecuencias. En seguida se mencionan los rangos de número de onda para diferentes tipos de enlaces de moléculas orgánicas:

3700-2500 cm^{-1} para la vibración de X-H (X es C, N, O o S)

2300-2000 cm^{-1} para la vibración de $\text{C}\equiv\text{X}$ (X es C o N)

1900-1500 cm^{-1} para la vibración de $\text{C}=\text{X}$ (X es C, N u O)

1300-800 cm^{-1} para la vibración de C-X (X es C, N u O)

Cuando la longitud de onda de los fotones es mayor que la de la luz visible, pero menor que la de las ondas de microondas, éstos reciben el nombre de radiación infrarroja (IR).

La longitud de onda de la radiación infrarroja va desde 700 nm a 1 mm. En la técnica de espectroscopia infrarroja se puede considerar que los enlaces característicos de las moléculas absorben cierta longitud de onda. En la Figura 2.21, se muestra que cuando la luz

infrarroja de longitud de onda continua pasa por la muestra, cada filtro absorbe una longitud de onda característica.

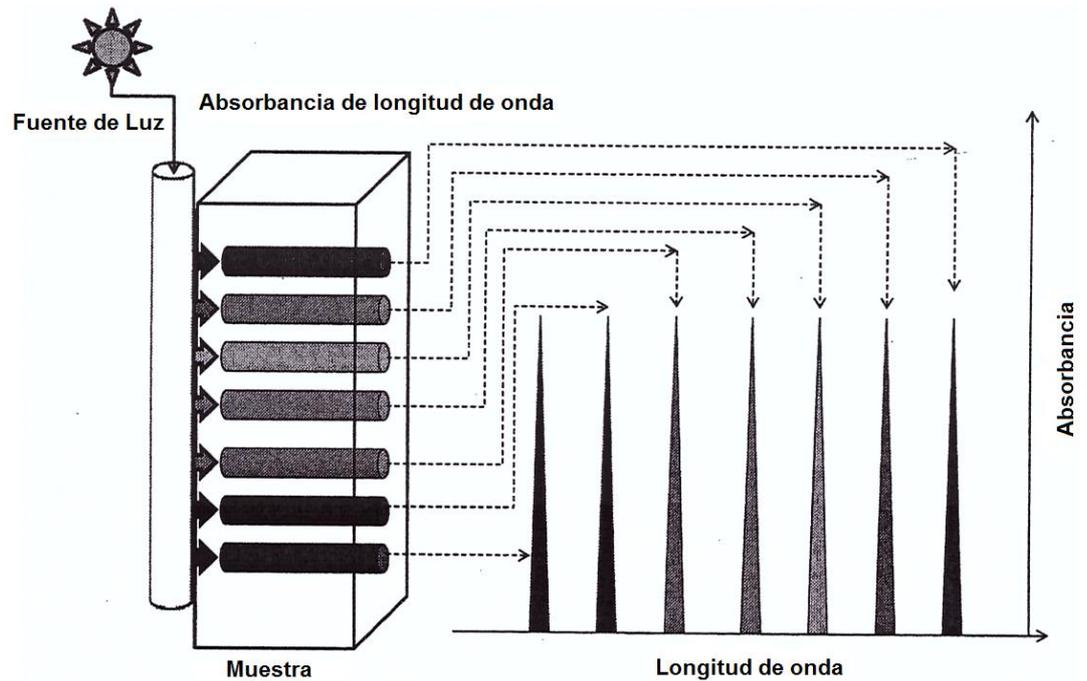


Figura 2.21 Luz infrarroja de longitud de onda continua pasa por la muestra, cada filtro absorbe una longitud de onda característica [37].

De esta manera, cuando un haz de infrarrojo de longitudes de onda continua pasa por una muestra, cada enlace absorbe una longitud de onda característica y en el espectro muestra un pico de absorción a dicha longitud de onda.

La espectroscopía infrarroja puede ser empleada para identificar un compuesto conocido en una muestra desconocida, estudiar la formación de nuevos enlaces químicos y hacer análisis cuantitativo para un compuesto de interés [37].

2.6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación de la superficie de sólidos en una escala micro a nanométrica. Este equipo utiliza un haz de electrones, en lugar de luz, para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. La Figura 2.22, muestra un esquema del microscopio electrónico de barrido.

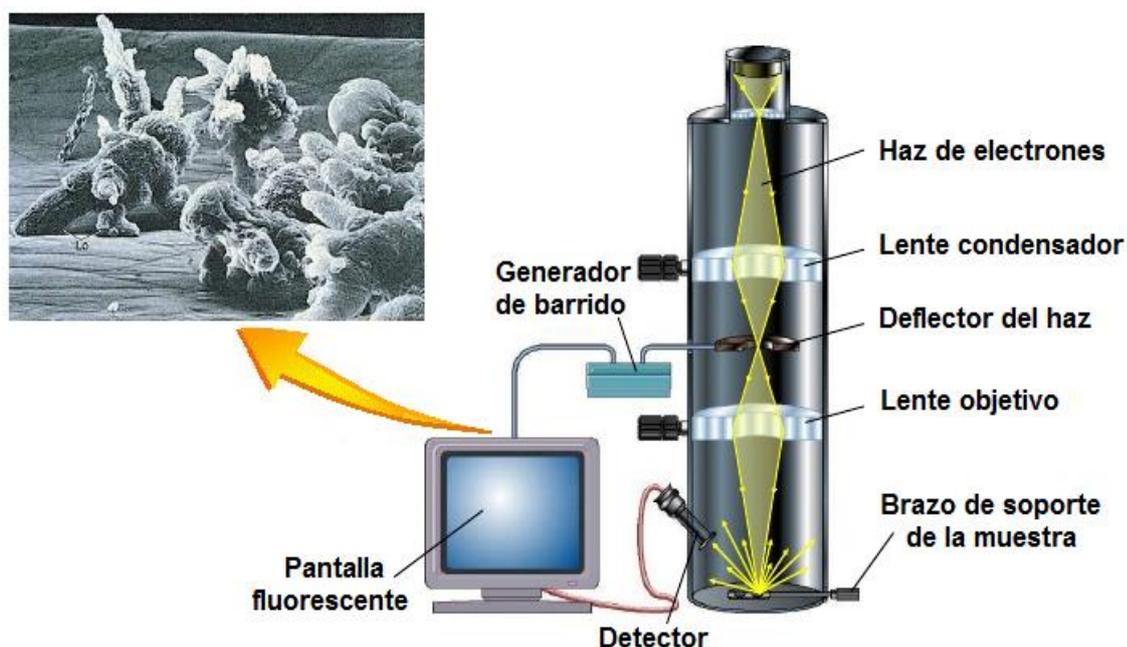


Figura 2.22 Esquema del microscopio electrónico de barrido [38].

El haz de electrones se genera mediante un cañón de electrones, que puede ser de emisión termoiónica o de emisión de campo. En el caso de emisión termoiónica, se tiene un filamento de tungsteno, que se mantiene a un potencial de 1 a 50 kV respecto al ánodo colocado en el cañón.

Alrededor de este filamento se encuentra el cilindro Wehnelt, que está cargado negativamente respecto al filamento.

Este campo eléctrico provoca que los electrones emitidos converjan sobre un pequeño diámetro. Los sistemas de lentes magnéticas, condensadoras y de enfoque, sirven para reducir el diámetro del haz de electrones a un tamaño final de 5 a 200 nm.

El barrido se lleva a cabo mediante los dos pares de bobinas localizadas entre las lentes del objetivo; de esta manera, uno de los pares desvía el haz en la dirección X y el otro lo desvía en la dirección Y. El soporte de muestra es capaz de sujetar muestras de varios centímetros, de moverse en las direcciones X, Y, y Z y de rotar alrededor de cada uno de los ejes; por esta razón, las superficies de las muestras se pueden observar desde casi cualquier perspectiva.

Las muestras que conducen electricidad son las más fáciles de estudiar, pues la circulación de electrones minimiza la generación de carga. Se han desarrollado diversos métodos para obtener imágenes de muestras no conductoras, siendo la más común el recubrimiento de la superficie de la muestra con una película metálica delgada.

Las interacciones de un sólido con un haz de electrones pueden dividirse en interacciones elásticas (se afectan las trayectorias de los electrones en el haz sin alterar sus energías) e interacciones inelásticas (se transfiere al sólido una parte o toda la energía de los electrones).

De esta manera, el sólido excitado emite electrones retro dispersados, electrones secundarios, electrones Auger, rayos-X y a veces fotones de longitud de onda larga. Los electrones retro dispersados son electrones que han experimentado numerosas colisiones y que terminan saliendo de la superficie.

Los electrones secundarios, que tienen energías entre 3 y 5 eV, se producen como resultado de interacciones entre los electrones de alta energía y los electrones de la banda de conducción del sólido. Estos electrones contribuyen a la formación de la imagen.

Un rayo-X característico se produce cuando un electrón incidente choca con un electrón de las capas internas de un átomo y produce la expulsión de dicho electrón quedando el átomo en estado excitado. En la Figura 2.23, se muestra la representación esquemática de la producción de rayos-X y emisión de electrones [38].

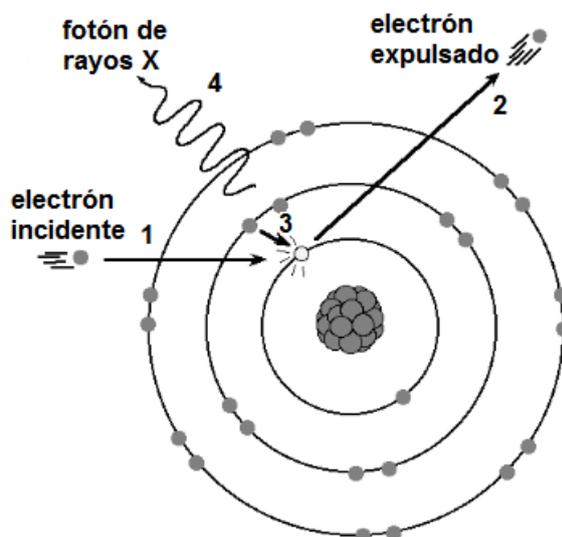


Figura 2.23 Producción de rayos-X y emisión de electrones [39].

2.6.4 Espectroscopia por dispersión de energía de rayos-X (EDS)

La espectroscopia por dispersión de energía de rayos-X es una técnica que permite cuantificar la composición elemental de una muestra bajo estudio, analizando los rayos-X característicos emitidos por los elementos que forman el material (T), durante el proceso de

colisión del haz de electrones en un microscopio electrónico de barrido [39].

2.6.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión ha sido ampliamente usado en la ciencia de los materiales y la biología debido a que los electrones que atraviesan la muestra contienen información relevante relacionada con la estructura cristalina y los estados de enlace. La Figura 2.24, muestra el esquema del microscopio electrónico de transmisión.

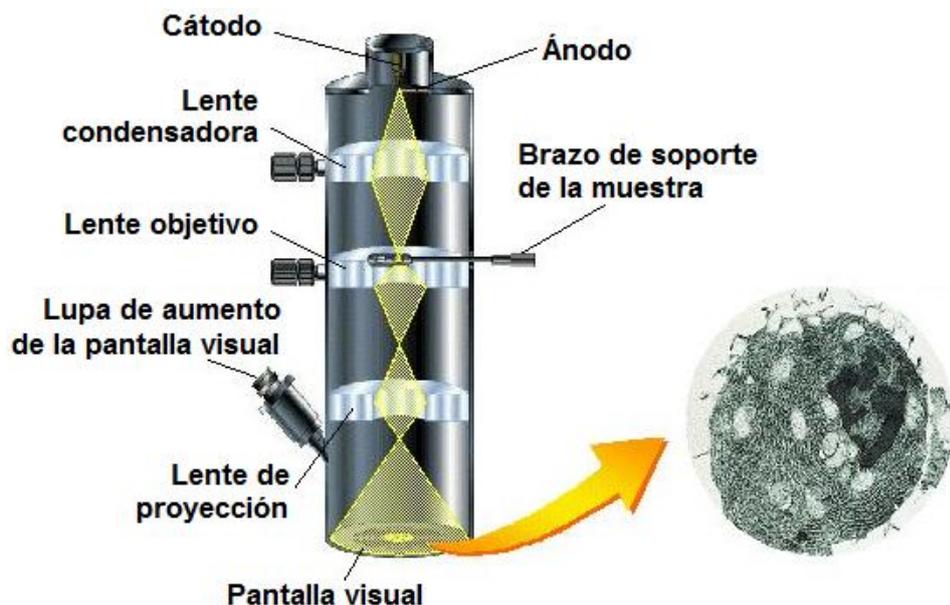


Figura 2.24 Esquema del microscopio electrónico de transmisión [40].

El microscopio electrónico de transmisión, opera bajo el mismo principio que el microscopio óptico, pero usa electrones en vez de luz. Este microscopio es capaz de obtener una resolución teórica de 0.3 nm.

La relación entre longitud de onda λ y voltaje de aceleración V de electrones se determina como en (4)

$$\lambda \approx \frac{1.23}{\sqrt{V}} (nm)$$

(4)

Si el TEM es operado a $V= 300$ kV, los electrones acelerados presentarán una longitud de onda de 0.02 \AA .

El TEM, al igual que el SEM, es capaz de generar el haz de electrones por medio de emisión termoiónica o emisión de campo. La Figura 2.25, muestra las señales generadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra.

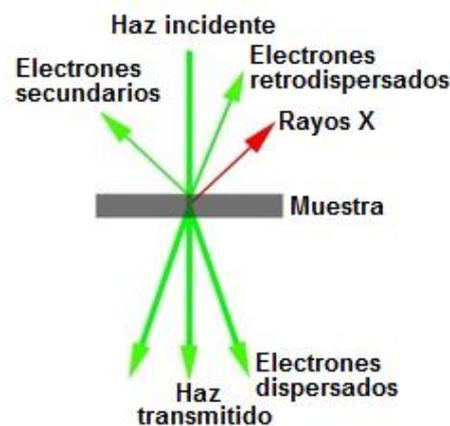


Figura 2.25 Interacción entre el haz de electrones y la muestra en el TEM [41].

Las lentes de proyección expanden el haz reflejado hacia la pantalla de fósforo u otro dispositivo de visualización. Los aumentos del TEM están dados por la razón de las distancias entre la muestra y el plano imagen del objetivo [40, 41].

2.6.6 Difracción de electrones (ED)

La difracción de electrones es una técnica que consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra y observar el patrón de interferencia resultante con el propósito de conocer la estructura cristalina de la muestra. Esta técnica es similar a la difracción de los rayos-X o a la difracción de neutrones. La difracción de electrones se realiza normalmente utilizando el microscopio electrónico de transmisión o el microscopio electrónico de barrido. En estos microscopios, los electrones son acelerados con un potencial electrostático con el propósito de obtener la energía deseada y disminuir su longitud de onda antes de que estos interactúen con la muestra.

La estructura periódica de un sólido cristalino actúa como una rejilla de difracción, dispersando los electrones de manera predecible. Es posible deducir la estructura del cristal que produce dicho patrón de difracción a partir del patrón de difracción observado. La difracción de electrones es útil para el estudio de sólidos cristalinos, sólidos amorfos y la geometría de las moléculas gaseosas [40, 41].

2.6.7 Ensayo de densidad celular de osteoblastos

El ensayo de densidad celular de osteoblastos es empleado para determinar la adherencia de osteoblastos (células por cm^2). En este ensayo se siembran osteoblastos fetales humanos (células que forman hueso, ATCC, CRL-11372, números de población 8-10) a $3500 \text{ células/cm}^2$ en las muestras; posteriormente, son cultivadas en el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco/BRL, Grand Island, NY), modificado del Basal Medium Eagle (BME) el cual contiene vitaminas y aminoácidos, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; HyClone, Logan, UT) y 1% de penicilina/estreptomina (P/S; Hyclone) bajo condiciones de cultivo

celular estándar (37 °C, 5% CO₂/95% aire ambiental) por 4 horas. Después de este lapso, las células que no se añaden son retiradas con solución salina de fosfato (PBS). Las células que se añaden son fijadas con 10% de solución formalina normal (NBF; Fisher Scientific), manchados con 4', 6-diamidino-2-fenilindol, di clorhidrato (DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA) y contadas en cinco campos de vista aleatorios para cada muestra empleando un microscopio fluorescente [-42].

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

La hidroxiapatita ha sido ampliamente utilizada para recubrir sustratos metálicos y así proveer mejor oseointegración respecto a los sustratos no recubiertos. Sin embargo, se ha mostrado que la hidroxiapatita nanocrystalina (nHA), incrementa aún más la osteointegración entre el implante y el hueso natural. Por otro lado, aunque las nanopartículas de péptido anfifílico (APnPs), han resultado ser un buen material como transportador de medicamentos, se desea saber si las APnPs también pueden funcionar como recubrimiento para implantes metálicos. Por este motivo surge la necesidad de obtener recubrimientos para implantes metálicos que contengan hidroxiapatita nanocrystalina y APnPs. Sin embargo, es difícil formar un material que esté compuesto únicamente por hidroxiapatita y APnPs, pues no es posible que las APnPs solidifiquen debido a la alta repulsión que existe entre ellas y que contengan a la hidroxiapatita en su interior. De esta manera, se necesita una base que pueda contener a la hidroxiapatita y a las APnPs. El hidrogel de poli-hidroxietilmetacrilato (pHEMA) es una buena opción pues es un material biocompatible. Por esta razón, se aborda el problema de estudiar la síntesis y características de recubrimientos de hidrogel de pHEMA con hidroxiapatita nanocrystalina y APnPs.

3.2 Objetivos

Objetivo general

- Obtener recubrimientos de hidrogel de pHEMA con hidroxiapatita nanocrystalina y APnPs sobre sustratos de Ti6Al4V.

Objetivos particulares:

- Obtener hidroxiapatita nanocristalina por el método de precipitación.
- Caracterizar la hidroxiapatita nanocristalina con XRD, FTIR, TEM, ED, SEM y EDS.
- Obtener recubrimientos de hidrogel de pHEMA con hidroxiapatita nanocristalina y APnPs.
- Caracterizar los recubrimientos de hidrogel de pHEMA con hidroxiapatita nanocristalina y APnPs mediante la técnica de adherencia de osteoblastos y SEM.

CAPÍTULO 4. DETALLES EXPERIMENTALES

Se utilizó el método de precipitación para sintetizar la hidroxiapatita nanocristalina debido a que es un método que se prepara en fase líquida y no requiere de altas temperaturas.

La caracterización de la hidroxiapatita nanocristalina se llevó a cabo mediante: XRD (Rigaku Smart Lab, Tokyo, Japan), FTIR, SEM (ZEISS AURIGA, Jena, Alemania), EDS (ZEISS AURIGA, Jena, Alemania), TEM (JEOL JEM-2010; JEOL, Tokyo, Japan) y ED (JEOL JEM-2010; JEOL, Tokyo, Japan). Por otro lado, se decidió formar los recubrimientos de hidrogeles de pHEMA con HA nanocristalina y APnPs por medio del método de polimerización de radicales libres.

Los recubrimientos fueron caracterizados por la técnica de adherencia de osteoblastos y SEM (Phillips/XL30-ESEM).

4.1 Síntesis de hidroxiapatita nanocristalina (nHA)

La síntesis de la hidroxiapatita nanocristalina $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, se realizó mediante el método de precipitación. Los precursores usados para la reacción fueron; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (JT Baker, Center Valley, PA, USA), NH_4OH (JT Baker, Center Valley, PA, USA) y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fermont, Monterrey, Nuevo León, México). Debido a que la HA es proactivamente insoluble en H_2O , éste es un excelente solvente para esta reacción [42]. Por otro lado, el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ es un buen candidato como fuente de iones PO_4^{3-} , pues este compuesto tiene una solubilidad de 1,310 g/L en H_2O a 20°C , tiene un punto de fusión de 155°C y contiene al ion NH_4^+ , que tiende a formar compuestos solubles [43, 44, 45].

El NH_4OH resulta ser una buena opción para la obtención de iones OH^- , pues contiene al ion NH_4^+ . Finalmente, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ resulta viable para la obtención de iones Ca^{2+} , pues éste tiene una solubilidad de 1,210 g/L en H_2O a 18°C , tiene un punto de fusión de 561°C y contiene al ion NO_3^{2-} , que tiende a formar compuestos solubles [43, 45, 46].

Se obtuvo la hidroxiapatita nanocristalina (nHA1), mediante una solución inicial de 410 mL de agua desionizada (dH_2O) y 2.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Se añadió NH_4OH (98 mL) lentamente a esta solución hasta alcanzar un pH de 9.30. Posteriormente, se preparó otra solución de 45 mL de agua desionizada con 7.30 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se añadió a la solución inicial a la velocidad de 1 gota/s.

La hidroxiapatita nanocristalina (nHA2), se obtuvo mediante una solución inicial de 410 mL de agua desionizada (dH_2O) y 8.6 g de NH_4HPO_4 . Se añadió NH_4OH (98 mL) lentamente a esta solución hasta alcanzar un pH de 9.30. Posteriormente, se preparó otra solución de 45 mL de agua desionizada con 22.10 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se añadió a la solución inicial a la velocidad de 1 gota/s.

La precipitación inició desde la adición del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y continuó por varios minutos a la temperatura de 25°C . Al finalizar la precipitación, la muestra nHA1 y la muestra nHA2 se centrifugaron separadamente a 5,000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, se retiró la solución del precipitado y se añadió dH_2O . Se volvió a centrifugar cada solución durante 5 minutos. Una vez que la nHA1 y nHA2 fueron completamente separadas del resto de la solución, cada muestra fue colocada en un crisol dentro de un horno de secado a 80°C durante 10 horas.

4.2 Síntesis de polihidroxietilmetacrilato (pHEMA)

La solución de polihidroxietilmetacrilato (pHEMA), se preparó con el método de polimerización de radicales libres. En este caso, los monómeros con doble enlace de carbono son moléculas de hidroxietilmetacrilato (HEMA) y el iniciador radical es el 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN). La Figura 4.1 muestra la molécula de hidroxietilmetacrilato.

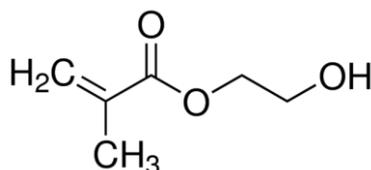


Figura 4.1 Hidroxietilmetacrilato (HEMA) [47].

Una vez que se obtienen los radicales libres por la separación del AIBN, cada uno de éstos se acerca a un par de electrones de una molécula de HEMA y toma uno de ellos para aparearse y formar un nuevo radical. El nuevo radical reacciona con otra molécula de HEMA para formar otro nuevo radical.

Este proceso se repite hasta que el radical se encuentra con otro radical en crecimiento para formar pHEMA. En la Figura 4.2, se muestra la molécula de polihidroxietilmetacrilato.

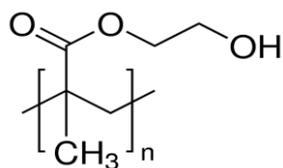


Figura 4.2 Polihidroxietilmetacrilato (pHEMA) [48].

Para obtener la solución denominada pHEMA, se colocaron en un recipiente de vidrio, 20 mL de HEMA, se añadieron 12 mL de H₂O y 200 mg de AIBN. Se agitó la solución en un vórtex durante 15 minutos y se sonificó 20 minutos.

4.3 Obtención de pHEMA+nHA1

En un recipiente de vidrio, se colocaron 20 mL de HEMA, 10 mL de H₂O, 200 mg de AIBN y 800 mg de nHA1. La solución se agitó en un vórtex durante 15 minutos y se sonificó 20 minutos.

4.4 Obtención de nanopartículas de péptido anfifílico (APnPs)

Las nanopartículas de péptido anfifílico (APnPs) fueron obtenidas por la compañía Biomatik. En la Figura 4.3, se muestra la estructura química de las APnPs.

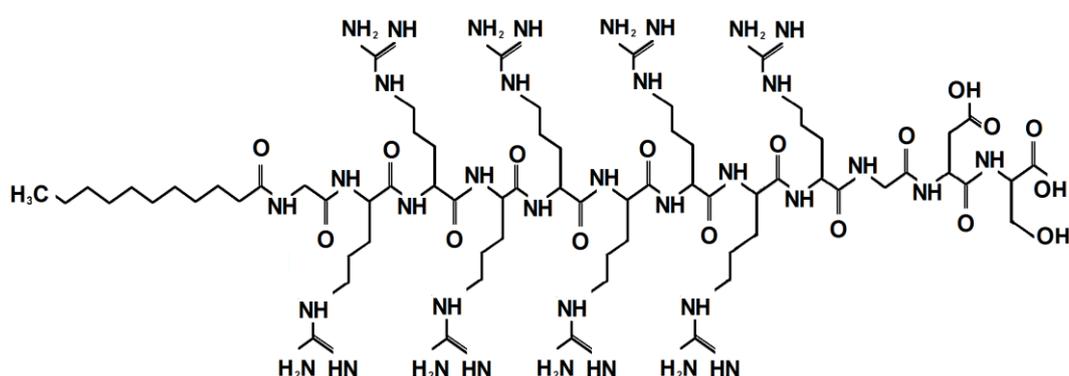


Figura 4.3 Estructura química del péptido anfifílico [49].

4.5 Obtención de pHEMA+APnPs

La solución pHEMA+APnPs se obtuvo colocando 20 mL de pHEMA, 10 mL de H₂O, 200 mg de AIBN y 20 mg de APnPs en un recipiente de vidrio. La solución se agitó en un vórtex durante 15 minutos y se sonificó por 20 minutos.

4.6 Obtención pHEMA+nHA1+APnPs

Se colocaron 20 mL de HEMA en un recipiente de vidrio, se añadieron 10 mL de H₂O, 200 mg de AIBN, 800 mg de nHA1 y 20 mg de APnPs. La solución obtenida se agitó en un vórtex durante 15 minutos y se sonificó por 20 minutos. En la Tabla 4.1, se muestra la nomenclatura de las soluciones y su composición.

Tabla 4.1 Nomenclatura de las soluciones obtenidas.

SOLUCION	HEMA (mL)	H ₂ O (mL)	AIBn (mg)	nHA1 (mg)	APnPs (mg)
pHEMA	20	10	200		
pHEMA+nHA1	20	10	200	800	
pHEMA+APnPs	20	10	200		20
pHEMA+nHA1+APnPs	20	10	200	800	20

4.7 Obtención de recubrimientos

Se depositaron 20 µL de cada una de las soluciones pHEMA, pHEMA+nHA1, pHEMA+APnPs y pHEMA+nHA1+APnPs sobre sustratos de Ti6Al4V que fueron precalentados a 180°C por 20 minutos para permitir que se llevara a cabo la polimerización. Los sustratos de Ti6Al4V recubiertos fueron sumergidos en agua desionizada para quitar todo el iniciador que no reaccionó, fueron esterilizados con 70% de etanol y secados con radiación UV

después de ser lavados con Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS), pH=7.2.

Se obtuvieron 4 sustratos de Ti6Al4V recubiertos con cada una de las cuatro soluciones para un total de 16 recubrimientos.

4.8 Caracterización de nHA1

La hidroxiapatita nanocristalina nHA1, fue caracterizada mediante difracción de rayos-X, utilizando el difractómetro de rayos-X Rigaku Smart Lab, para conocer sus fases cristalinas presentes. Se obtuvieron los enlaces mediante espectroscopia de infrarrojo y mediante microscopia electrónica de barrido, se determinó su morfología. Utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-2010, se obtuvo su estructura cristalina, el tamaño de cristales y las distancias interplanares. Se determinó la composición química mediante espectroscopía de energía dispersiva.

4.9 Caracterización de recubrimientos

4.9.1 Adherencia de Osteoblastos

La línea celular de osteoblastos fetal humana (Hfob, ATCC® CRL 11372™) fue empleada para evaluar la respuesta de los recubrimientos a los osteoblastos. Las células Hfob fueron cultivadas con Medio de Crecimiento de Osteoblastos (PromoCell, Alemania) suplementado con 1% de penicilina-estreptomina a 34°C y 5% de CO₂. En todos los experimentos se emplearon células con número de pasada entre 4 y 7.

Los sustratos de Ti6Al4V esterilizados y recubiertos fueron sumergidos en medio de cultivo celular por 20 minutos a 30°C.

Posteriormente, las células Hfob fueron sembradas en los sustratos a 5×10^4 células/cm².

Las células fueron incubadas por 3 días para permitir la adherencia y crecimiento en los sustratos.

El medio de cultivo celular fue reemplazado cada 48 horas. El kit de ensayo de viabilidad celular (MTS), Promega, Madison, WI, USA, fue empleado para determinar densidades celulares. Al final de la incubación, los sustratos con células fueron lavados y se les agregó 1 ml de medio celular mezclado con 200 μ L de reactivo MTS.

Después de que las mezclas fueron incubadas por 3 horas, la absorbancia del cultivo flotante en cada muestra fue tomada y medida a una longitud de onda de 490 nm utilizando un espectrofotómetro (SpectraMax M3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Se graficó una curva estándar expresando la correlación lineal entre diferentes densidades celulares y densidades ópticas ($R^2 > 0.95$) para estimar el número de células en cada pozo.

El número de células fue determinado con esta curva estándar del valor OD490. Cada recubrimiento se llevó a cabo por triplicado. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar del promedio, S.E.M, y una prueba t de student fue usada para evaluar las diferencias entre promedios considerando $p < 0.005$ como estadísticamente significativa.

4.9.2 Morfología

Se empleó el microscopio electrónico de barrido (Phillips/XL30-ESEM) para analizar la morfología de los recubrimientos.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan los resultados para la hidroxiapatita nanocristalina y recubrimientos de hidrogeles de pHEMA con hidroxiapatita nanocristalina y APnPs.

5.1 Caracterización de nHA1

5.1.1 Difracción de rayos-X

Se utilizó la técnica de difracción de rayos-X para el análisis de la hidroxiapatita nanocristalina, para determinar las fases cristalinas presentes en las muestras, sus distancias interplanares, el tipo de impurezas presentes y las distorsiones sufridas por la celda unitaria. La Figura 5.1a, muestra los patrones de difracción de rayos-X, obtenidos para la muestra nHA1, la muestra nHA2, así como el patrón de la HA correspondiente a la International Center for Diffraction Data (ICDD). En la Figura 5.1b, se muestra el patrón de difracción de nHA1, incluyendo los índices de Miller de los planos en los que ocurre difracción. Se observa que todos los picos obtenidos en los patrones de difracción de la muestra nHA1 y la muestra nHA2, están contenidos en el patrón de HA de la ICDD. Por esta razón, se concluye que ambas muestras contienen HA estequiométrica. Algunos picos presentan se encuentran desplazados con respecto a aquellos correspondientes al patrón de la ICDD; por ejemplo, el pico 211. Este comportamiento se asocia con la presencia de impurezas en las muestras obtenidas, pudiendo ser estas impurezas CO_3^{2-} .

Los picos de difracción obtenidos son más anchos que los correspondientes al patrón obtenido por la ICDD, esto significa que el tamaño de cristal es menor en las muestras sintetizadas en este estudio.

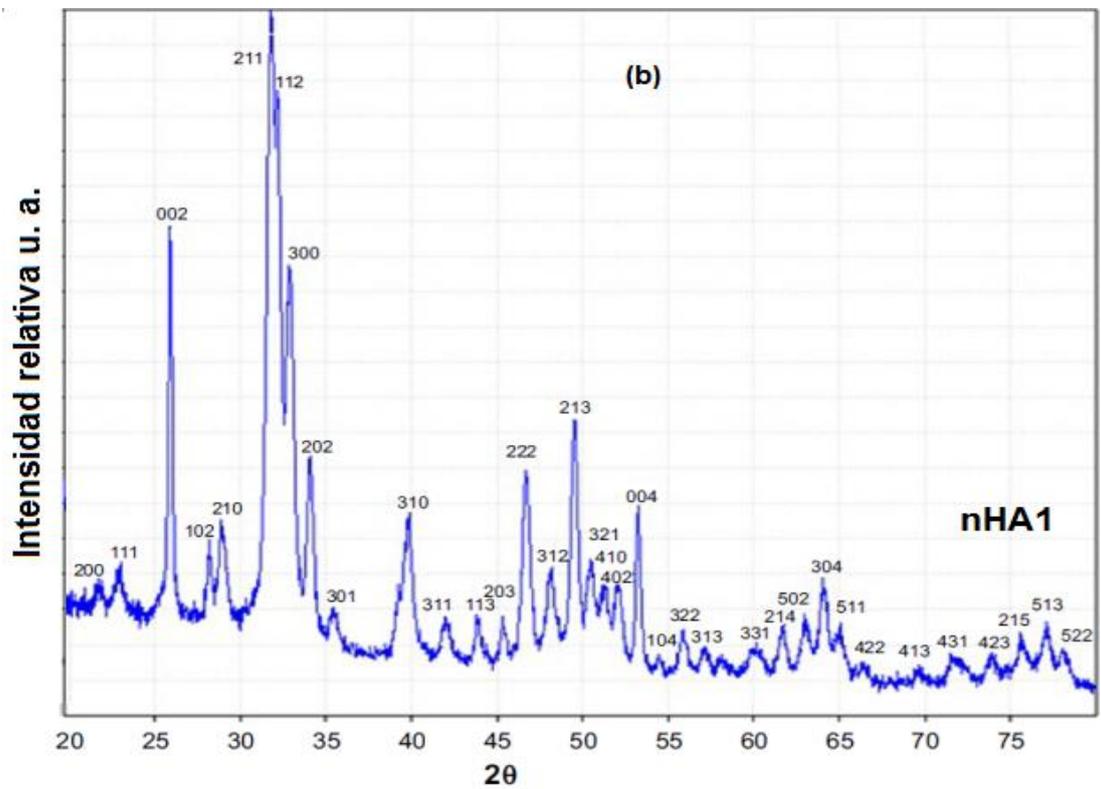
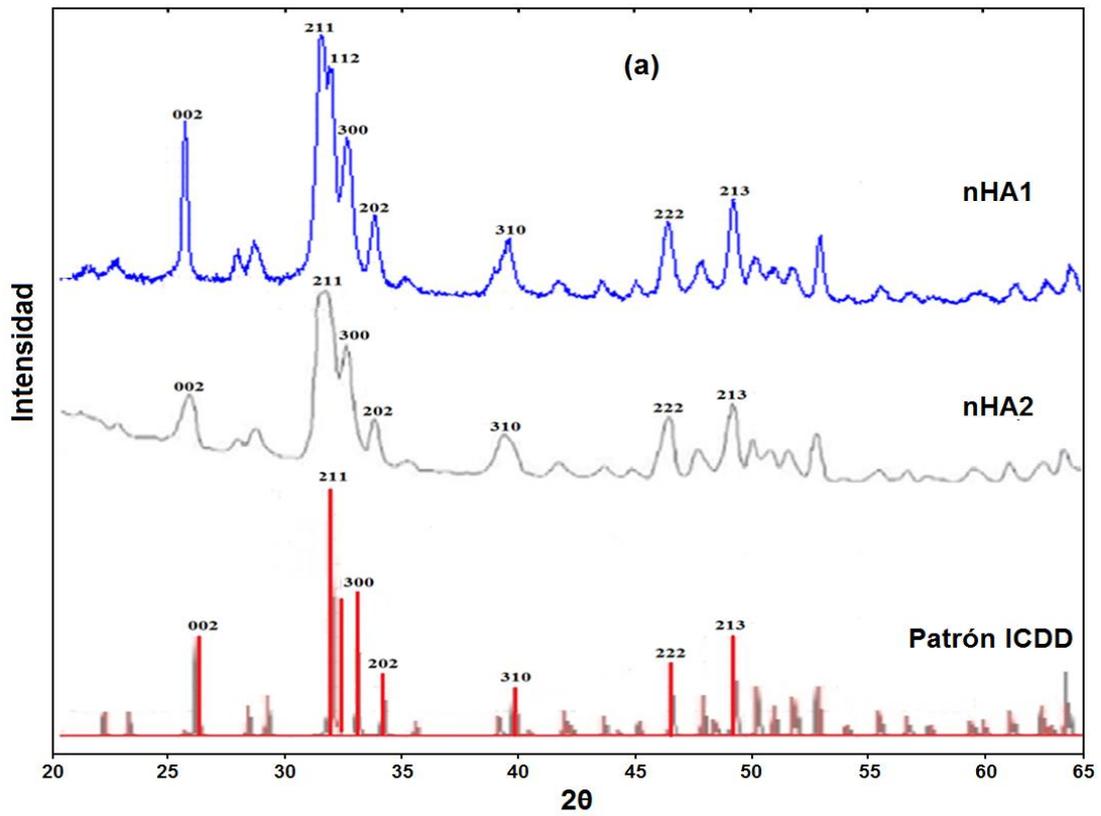


Figura 5.1 a) Patrones de difracción de nHA1, nHA2 y patrón ICDD. b) Índices de Miller de los planos en los que ocurre difracción en nHA1.

5.1.2 Espectroscopia infrarroja

Mediante espectroscopia infrarroja se determinaron los grupos funcionales en las muestras nHA1 y nHA2. Los enlaces fueron identificados por comparación con el espectro infrarrojo de la HA mostrado previamente en la Figura 2.3. La Figura 5.2, muestra los espectros de infrarrojo obtenidos para nHA1 y nHA2. Se identificaron absorbancias correspondientes a los enlaces P-O y O-H presentes en la HA. Así mismo, se identificaron picos de absorbancia correspondientes al enlace C-O del CO_3^{2-} , que pudo haberse formado por la interacción del CO_2 del medio ambiente con los compuestos presentes en la reacción.

Esta impureza es causante de los desplazamientos de algunos picos observados en el patrón de difracción de rayos-X. Se determina entonces que las muestras contienen también CO_3^{2-} .

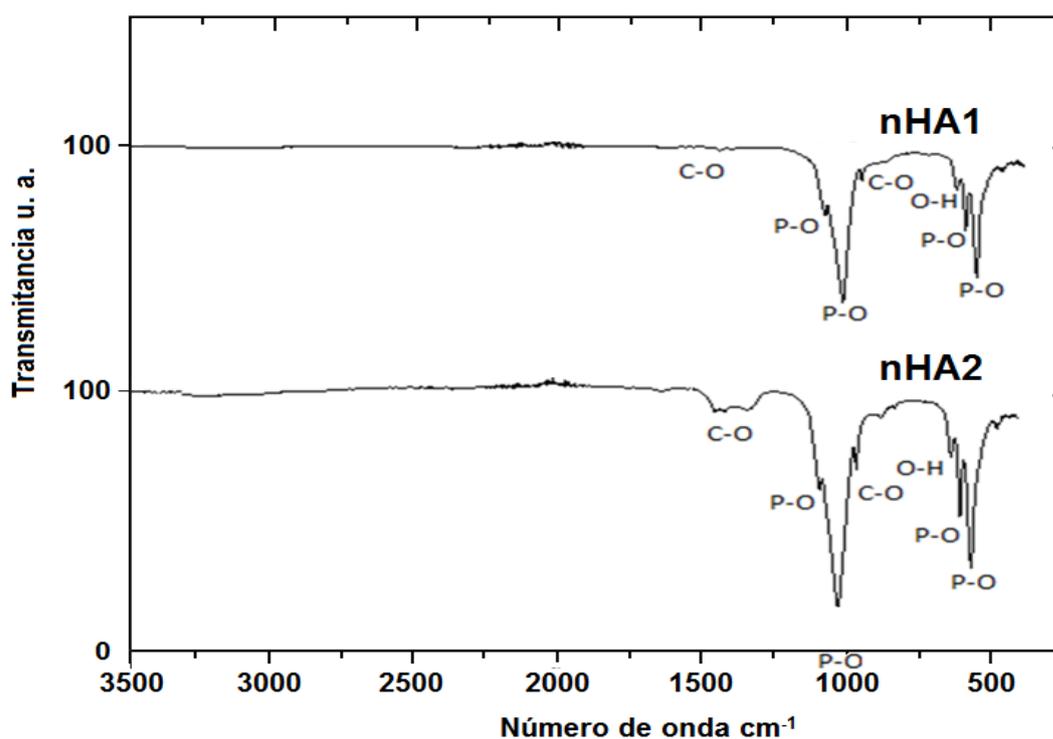


Figura 5.2 Espectroscopia IR de nHA1 y nHA2.

5.1.3 Microscopía electrónica de barrido

La morfología de nHA1, se determinó mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 5.3, se muestran conglomerados de nanobarras menores de 100 nm de longitud.

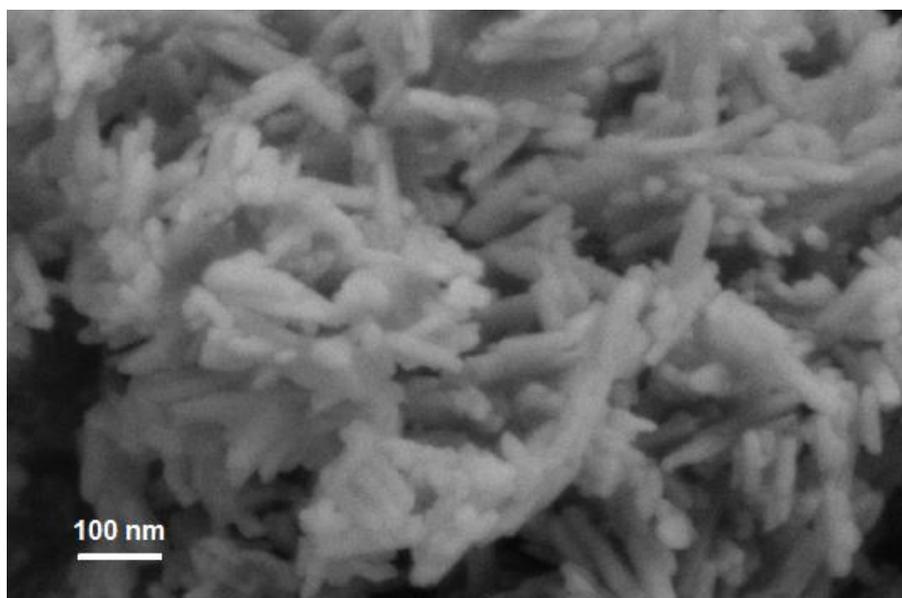


Figura 5.3 Morfología de nHA1.

5.1.4 Espectroscopía de energía dispersiva

Se utilizó la técnica de espectroscopia de energía dispersiva para determinar la composición química de nHA1 y nHA2. La Tabla 5.1 muestra los porcentajes atómicos de los elementos O, Ca, P, C y B contenidos en nHA1 y nHA2.

Tabla 5.1 Porcentajes atómicos de nHA1 y nHA2.

Elemento	nHA1 (% atómico)	nHA2 (%atómico)
O	57.50	52.87
Ca	17.86	15.02
P	9.26	7.41
C	4.53	12.36
B	10.86	12.34

Las muestras contienen oxígeno, calcio, fósforo, carbono y boro. Todos estos elementos están contenidos en la hidroxiapatita, excepto el boro. Los compuestos y el medio donde se llevó a cabo la síntesis no contenían este elemento; por esta razón, se cree que los detectores identificaron algunos rayos-X característicos del carbono como rayos-X característicos de boro.

5.1.5 Microscopía electrónica de transmisión

El tamaño del cristal y la distribución de los planos atómicos en la nHA1, se determinaron mediante TEM. La Figura 5.4, muestra cristales en forma de nanobarras con un ancho aproximado de 20 nm y longitud de 40 nm.

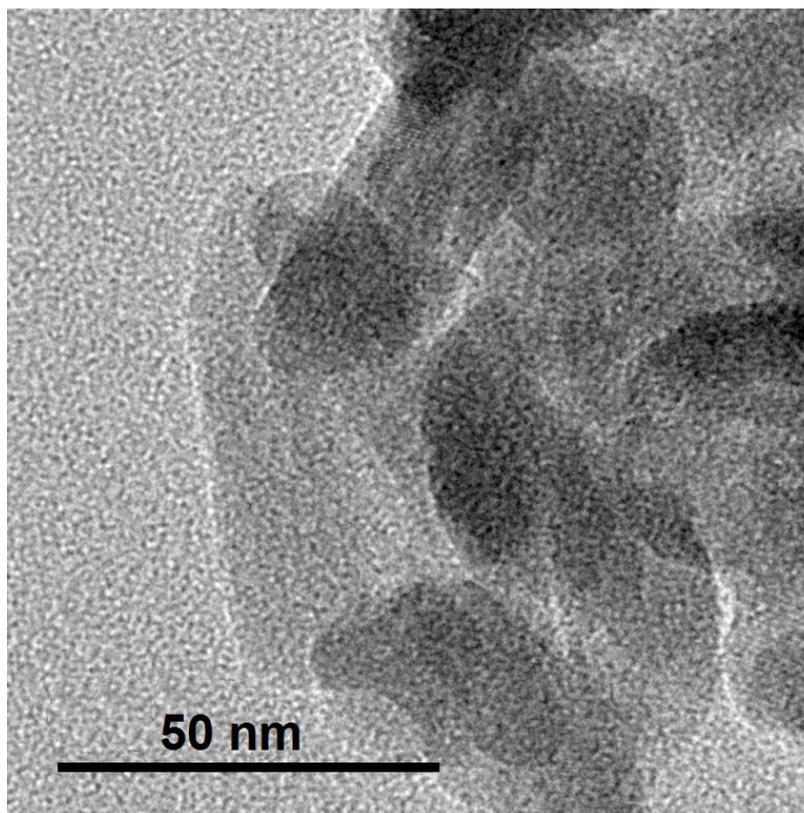


Figura 5.4 Nano barras de 20 nm de ancho y 40 nm de longitud en nHA1.

En la Figura 5.5a) se muestra la dirección preferencial de los planos atómicos (200), donde la línea azul paralela a los planos indica la dirección de los mismos, mientras que la línea azul perpendicular a los planos muestra la

distancia entre los mismos. La Figura 5.5b) muestra la distribución de planos atómicos a mayor resolución.

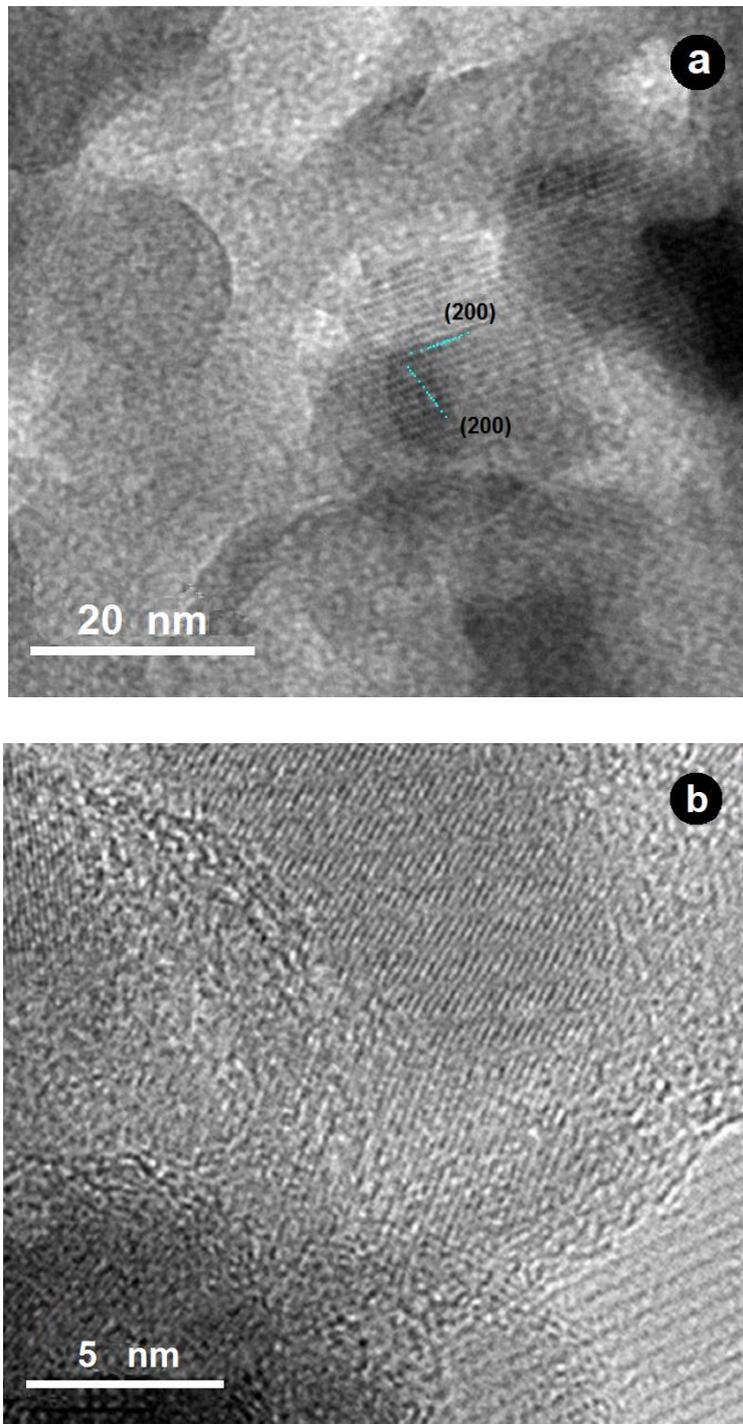


Figura 5.5 a) Dirección preferencial (200). b) Distribución de los planos atómicos a mayor resolución.

5.1.6 Difracción de electrones

La estructura cristalina y las distancias interplanares, se determinaron mediante difracción de electrones. La Figura 5.6 muestra el patrón de difracción de electrones correspondiente a la muestra nHA1. Se obtiene un patrón de anillos porque la muestra es policristalina.

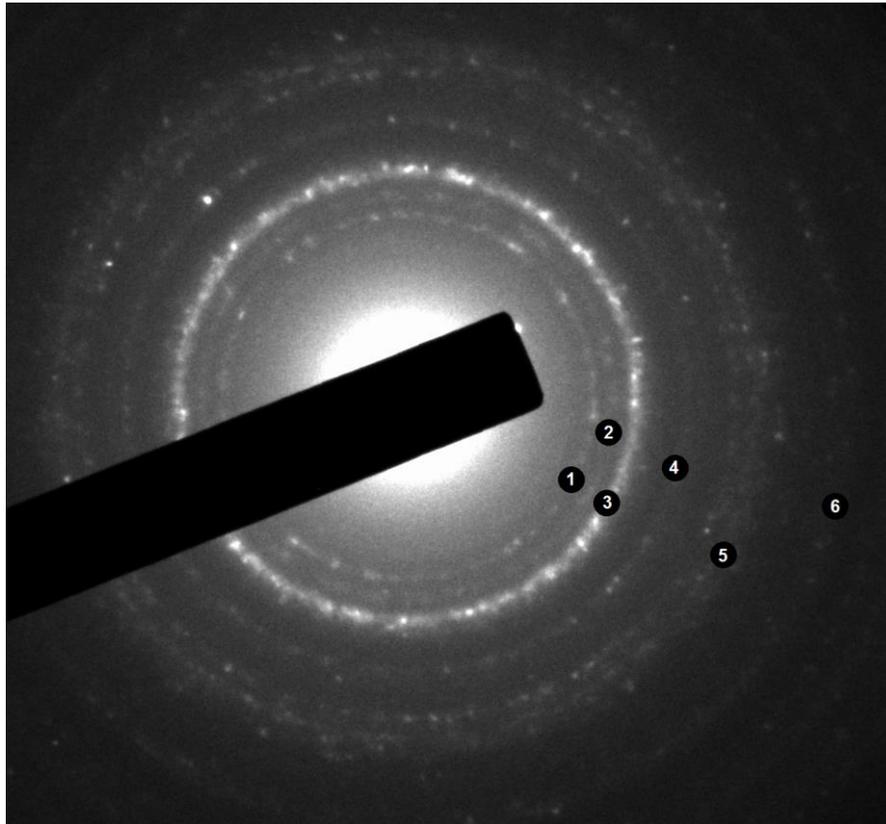


Figura 5.6 Difracción de electrones de nHA1.

En la Tabla 5.2, se muestra la indexación del patrón de difracción de electrones correspondiente a la muestra nHA1. Las distancias interplanares se obtuvieron a partir de la distancia del centro del patrón de difracción a cada uno de los anillos correspondientes.

Tabla 5.2 Indexación del patrón de difracción de nHA1.

Anillo	d		Error (%)	hkl
	ICDD por XRD (Å°)	por TEM (Å°)		
1	3.170	3.187	0.53628	102
2	2.814	2.855	1.45700	211
3	2.631	2.538	3.53478	202
4	2.065	2.099	1.64649	113
5	1.722	1.710	0.69686	004
6	1.335	1.335	0.96439	512

5.2 Caracterización de recubrimientos

5.2.1 Adherencia de osteoblastos

La Tabla 5.3 muestra los resultados obtenidos de las pruebas de adherencia de osteoblastos.

Tabla 5.3 Resultados obtenidos de las pruebas de adherencia de osteoblastos.

	pHEMA	pHEMA+APnPs	pHEMA+nHA1	pHEMA+nHA1+APnPs
Promedio (células/cm ²)	65300	53244.44	59422.22	75788.89
Desviación estándar	833.1111	3518.242	1926.489	1694.727
T de student vs pHEMA	-	0.017095	0.017142	0.002385
T de student vs Phema+APnP	0.017095	-	0.057323	0.002228
T de student vs Phema+HA	0.017141	0.057324	-	0.000450

Utilizamos 3 muestras para cada condición y $p < 0.005$. En la Figura 5.7, se muestra una gráfica con el promedio de las células por cm² y sus respectivas desviaciones estándar.

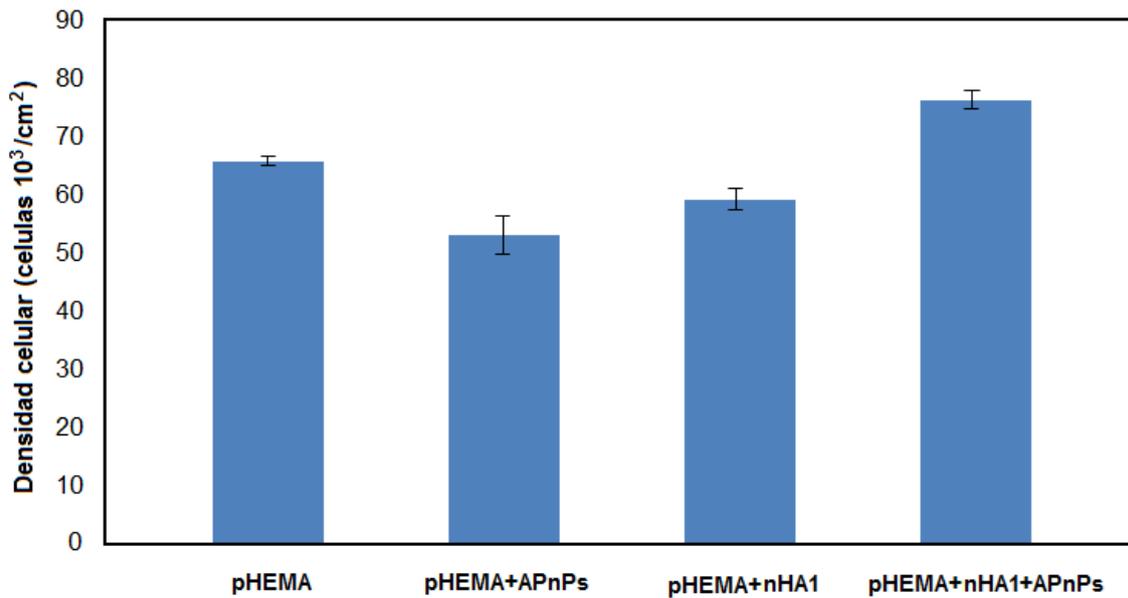


Figura 5.7 Densidad de osteoblastos en recubrimientos con pHEMA, APnPs y nHA1. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Los recubrimientos con pHEMA+nHA1+APnPs incrementaron la adherencia celular de manera estadísticamente significativa (El valor de p de la prueba t de student es menor que 0.005). Estos resultados mostraron la primera evidencia de una mayor adherencia de osteoblastos en recubrimientos de pHEMA+nHA1+APnPs comparado con recubrimientos de pHEMA, pHEMA+nHA1 y pHEMA+APnPs.

Esta investigación mostró por primera vez que la adición de nano HA y APnPs a un hidrogel como el pHEMA incrementa de manera significativa la adherencia de osteoblastos. Es importante señalar que la adición individual de ambos componentes (ya sea nHA o APnPs) no incrementó la adherencia de osteoblastos. Esto indica que hay interacciones entre la nano HA y las APnPs que necesitan ser estudiadas con mayor profundidad. Aunque no se determinó en esta investigación, es plausible que las APnPs fueron incrustadas en el pHEMA; esto provocó que las APnPs no pudieran interaccionar con los osteoblastos para promover la adherencia de estos. Además, a diferencia de otros estudios, es posible que sólo una baja concentración de nanopartículas de HA fue expuesta para promover la adherencia de osteoblastos. Sin embargo, de manera colectiva las nanopartículas de HA pudieron haber sido

recubiertas con las APnPs, promoviendo así la exposición superficial del RGD (y la bioactividad) en las APnPs, hecho que promueve la adherencia de osteoblastos.

Los mecanismos que producen una mayor adherencia de osteoblastos necesitan ser elucidados con el fin de optimizar los resultados. Es posible que mecanismos adicionales alteren la energía de superficie, la cual puede cambiar la absorción inicial de proteínas, y alterar la adherencia de osteoblastos. Este mecanismo ha sido elucidado cuando se añaden nanopartículas a hidrogeles, lo cual incrementa la hidrofilia y consecuentemente la absorción vitronectina, comúnmente asociada con mayor adherencia de osteoblastos.

Es claro que la adición de nano HA y APnPs al pHEMA es una forma sencilla de promover la adherencia de osteoblastos en un material inyectable.

5.2.2 Morfología

La morfología de los recubrimientos se obtuvo mediante microscopía electrónica de barrido. En general se observan áreas uniformes y algunas pequeñas partículas sin cambios morfológicos en función de los componentes de los recubrimientos. Por otro lado, se observa que todos los recubrimientos cubren sus respectivos sustratos.

La Figura 5.8, muestra la morfología del recubrimiento con pHEMA a baja y alta resolución por SEM.

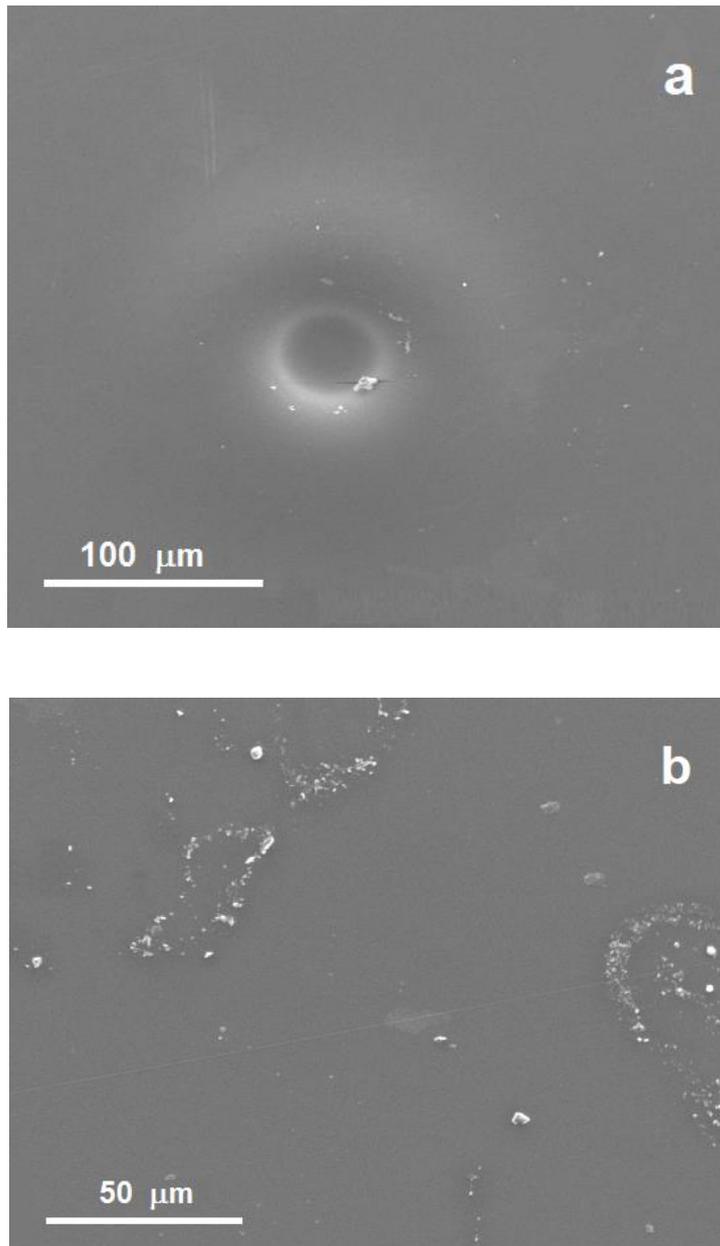


Figura 5.8 Morfología del recubrimiento con pHEMA. a) Baja y b) Alta resolución por SEM.

En la Figura 5.9, se muestra la morfología del recubrimiento pHEMA+APnPs a baja y alta resolución por SEM.

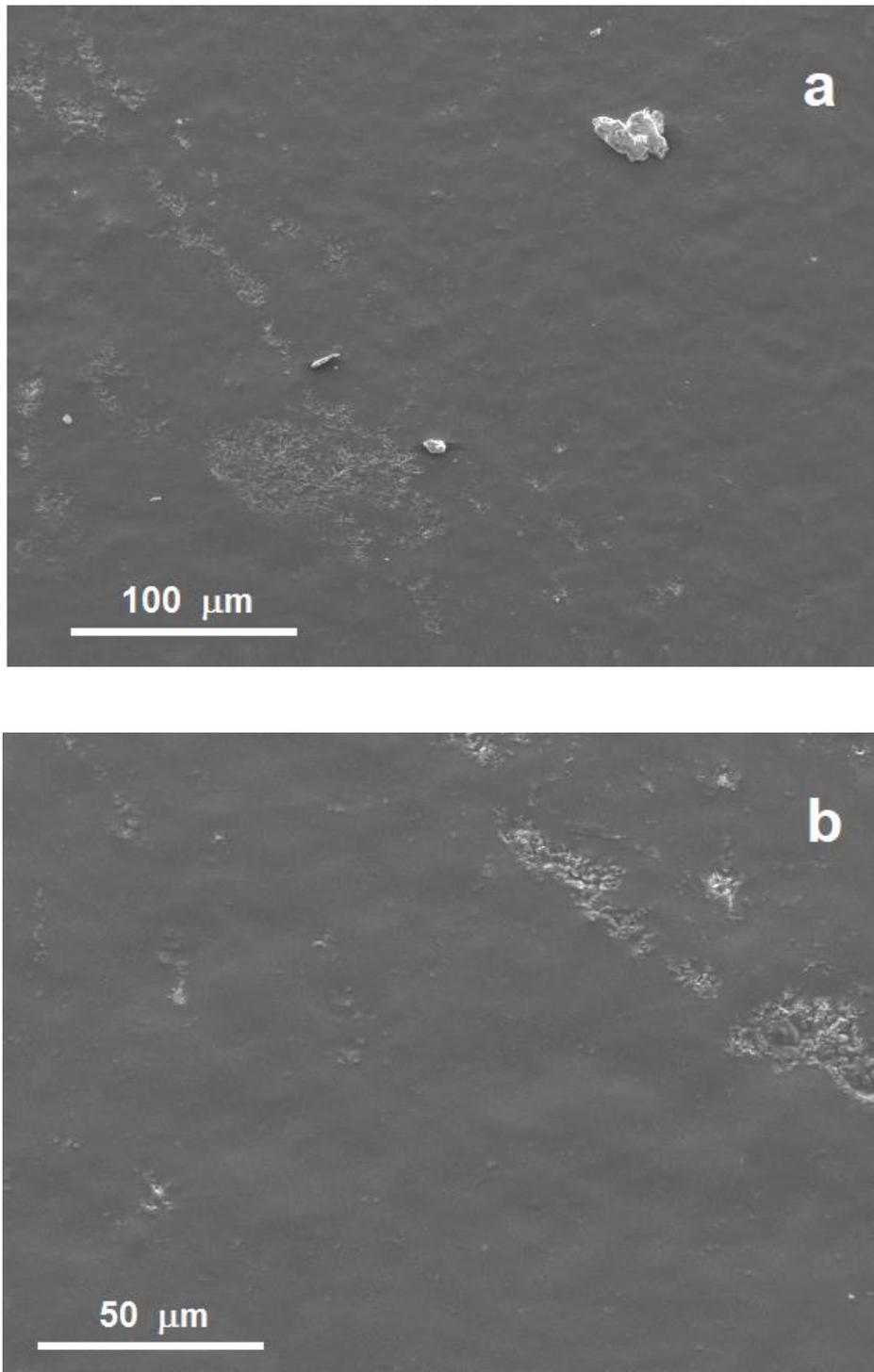


Figura 5.9 Morfología del recubrimiento con pHEMA+APnPs. a) Baja y b) Alta resolución por SEM.

La Figura 5.10, muestra la morfología del recubrimiento con pHEMA+nHA1 a baja y alta resolución por SEM.

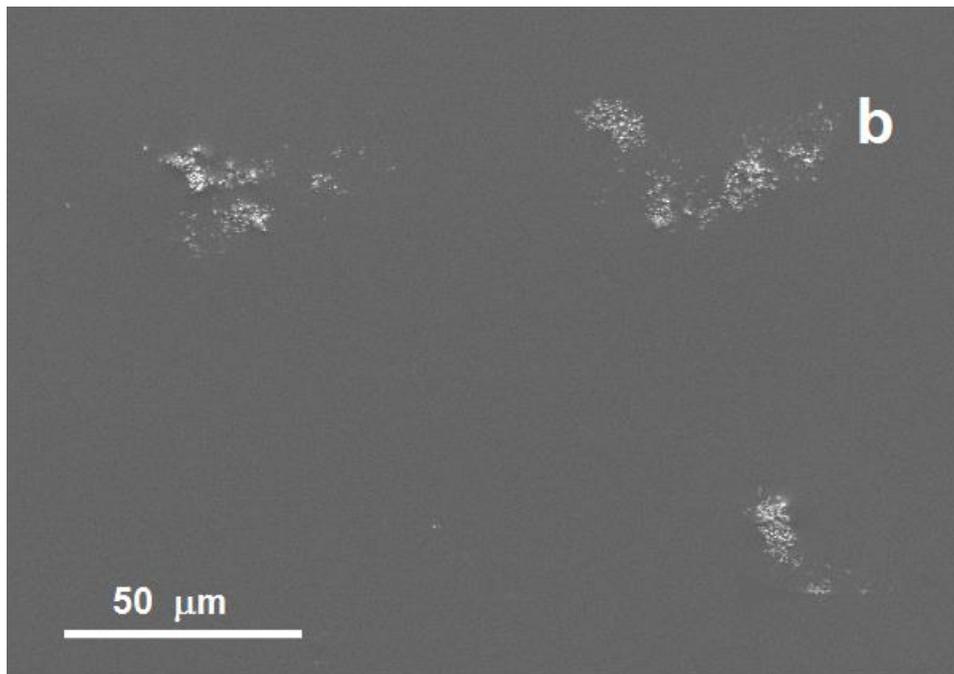
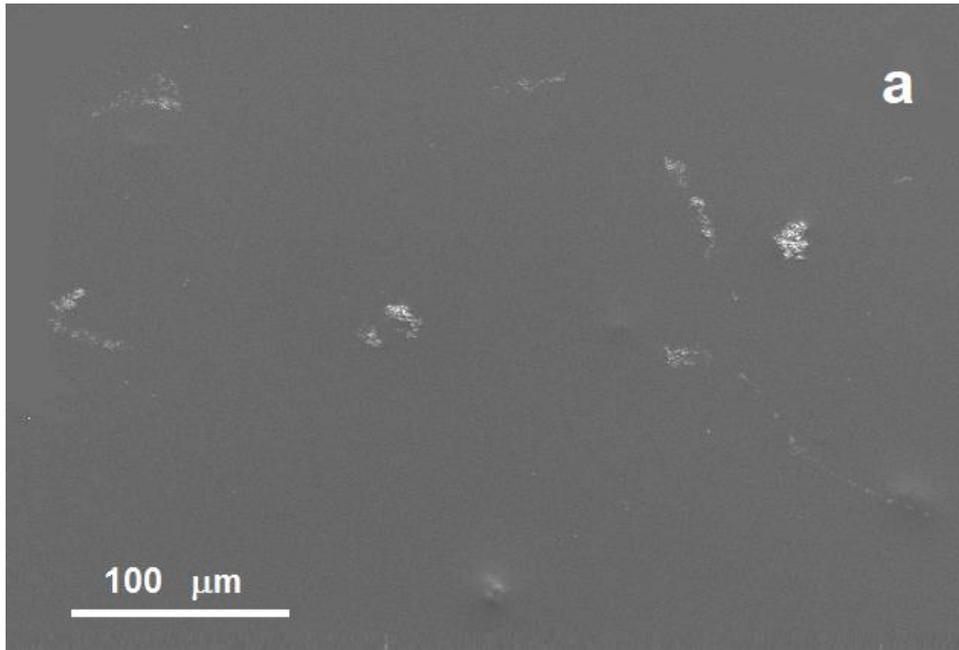


Figura 5.10 Morfología del recubrimiento con pHEMA+nHA1. a) Baja y b) Alta resolución por SEM.

En la Figura 5.11, se muestra la morfología del recubrimiento con pHEMA+nHA1+APnPs a baja y alta resolución por SEM.

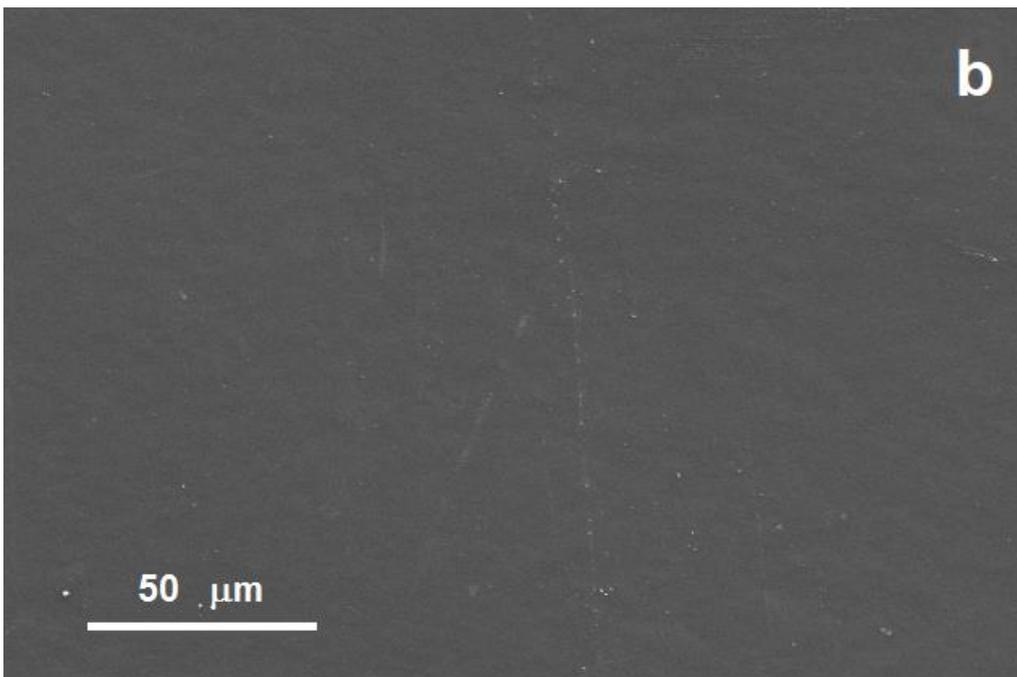
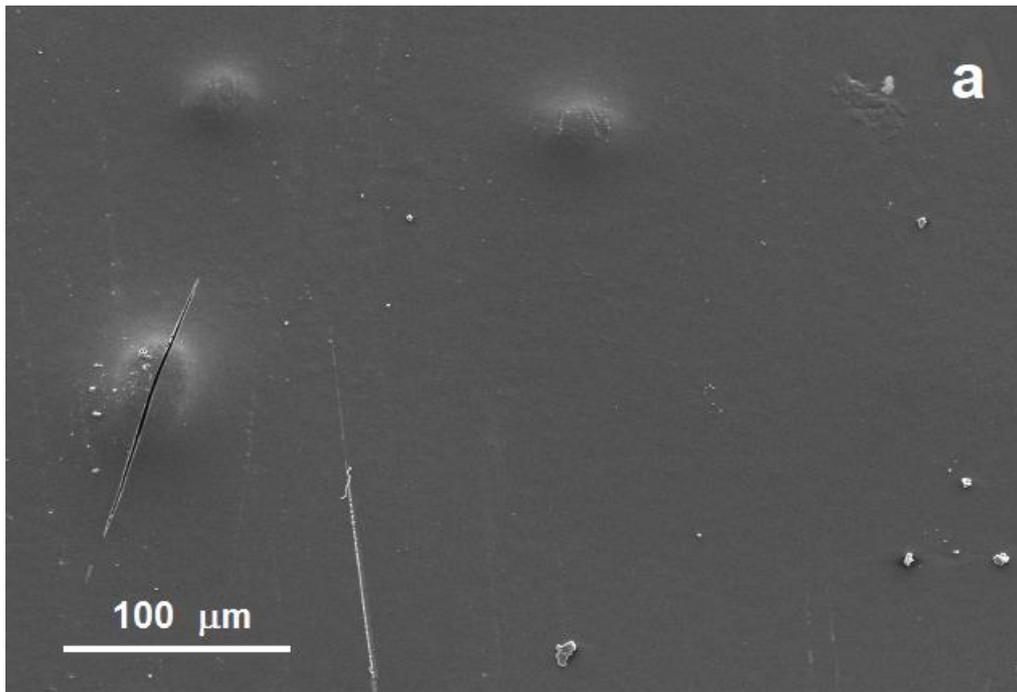


Figura 5.11 Morfología del recubrimiento con pHEMA+nHA1+APNPs. aA) Baja y b) Alta resolución por SEM.

6. CONCLUSIONES

Se sintetizó hidroxiapatita nanocrystalina por el método de precipitación. Los precursores $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ fueron empleados en la reacción. La caracterización por difracción de rayos-X muestra que se obtuvo hidroxiapatita nanocrystalina con ciertas impurezas. Los resultados de espectroscopía infrarroja demuestran que las impurezas corresponden a CO_3^{2-} . Por otro lado, la microscopía electrónica de barrido muestra que se obtuvieron nanobarras con una longitud menor a 100 nm. La técnica de espectroscopia de energía dispersiva indica que se obtuvo hidroxiapatita con carbono.

La caracterización por microscopía electrónica de transmisión muestra que se obtuvieron nanobarras con 40 nm de longitud y 20 nm de espesor. Finalmente, la difracción de electrones sirvió para demostrar que se obtuvo hidroxiapatita nanocrystalina.

Se obtuvieron las siguientes 4 soluciones, 1. HEMA con el iniciador radical AIBN, 2. HEMA con el iniciador radical AIBN + nHA, 3. HEMA con el iniciador radical AIBN + APnPs y finalmente 4. HEMA con el iniciador radical AIBN + nHA + APnPs. Se recubrieron 4 sustratos de Ti6Al4V con cada una de las 4 soluciones para obtener un total de 16 sustratos recubiertos. De esta manera se obtuvieron 4 recubrimientos con pHEMA, 4 recubrimientos con pHEMA+nHA1, 4 recubrimientos con pHEMA+APnPs y 4 recubrimientos con pHEMA+nHA1+APnPs.

Se midió la adherencia de osteoblastos de 3 recubrimientos obtenidos bajo cada condición. Los recubrimientos compuestos por pHEMA+nHA1+APnPs tuvieron mayor adherencia de osteoblastos que los recubrimientos obtenidos bajo las otras 3 condiciones.

De esta manera, se demostró por primera vez que añadir APnPs a recubrimientos de nHA incrementa la adherencia de osteoblastos. La adición

de manera individual de los componentes nHA o APnPs no incrementó la adherencia de osteoblastos.

Esto indica que hay interacciones entre la HA nanocristalina y las APnPs que necesitan ser estudiadas con mayor profundidad. Por microscopía electrónica de barrido se analizaron los recubrimientos obtenidos bajo cada condición. Esta técnica mostró que los recubrimientos cubrieron todo el sustrato y no presentaron cambios en morfología al cambiar composición.

La obtención de un recubrimiento biomimético de pHEMA+nHA+APnPs es una propuesta prometedora para incrementar la densidad de osteoblastos y probablemente incrementar la vida útil de un implante.

Se sugiere llevar a cabo pruebas *in vivo* con los recubrimientos obtenidos para tener una mejor perspectiva de los resultados obtenidos.

7. PERSPECTIVAS

Se sugiere llevar a cabo lo siguiente en trabajos futuros:

- Variar el porcentaje en peso de nHA y APnPs
- Emplear otros métodos de síntesis
- Aplicar otros tratamientos de superficie a los sustratos
- Hacer otras pruebas de caracterización como adherencia del recubrimiento al sustrato

BIBLIOGRAFIA

1. Ratner, B. D., Hoffman, Hoffman A. D., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science*. San Diego, CA: Elsevier Press.
2. Macchi R. L. (2007). *Materiales Dentales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana.
3. Craig R. G., Powers J. M., & Wataha J. C. (2000). *Dental Materials*. Detroit, MI: Mosby.
4. Ratner, B. D., Hoffman, Hoffman A. D., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science*. San Diego, CA: Elsevier Press.
5. Tadashi K. (2008). *Bioceramics and Their Clinical Applications*. Cambridge, England. Woodhead Publishing Limited.
6. Basu, B., Katti, D. S., & Kumar, A. (2009). *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Publications.
7. Yaszemski, M. J., Trantolo, D. J., Lewandrowski, K., Hasirci V., Altobelli D. E., & Wise D. L. (2004). *Biomaterials in Orthopedics*. Boca Raton, FL: Marcel Dekker.
8. J. J. Pérez, (comunicación privada, Julio 1 del 2010) discutió la poca oseointegración de los implantes metálicos.
9. Zhang L., Chen Y., Rodriguez J., Fenniri H., & Webster T. J. (2008). Biomimetic helical rosette nanotubes and nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium for improving orthopedic implants. *International Journal of Nanomedicine*, 3(3), 323 - 333. <https://doi.org/10.2147/IJN.S2709>
10. Ratner, B. D., Hoffman, Hoffman A. D., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science*. San Diego, CA: Elsevier Press.
11. LeGeros R. Z. (1991). *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. New York, NY: Karger.
12. Fernandez J., Guilemany J. M., & Gaona M. (2005). La proyección térmica en la obtención de recubrimientos biocompatibles: ventajas de la proyección térmica por alta velocidad (HVOF) sobre la proyección térmica por plasma atmosférico (APS), *Biomecánica*, 13(1), 16-39.
13. Rios-Pimentel F. F. (2011). *Síntesis y Caracterización de Recubrimientos Basados en Calcio sobre Sustratos Metálicos* (Master's dissertation).

Mexico City, Mexico: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria del Instituto Politécnico Nacional.

14. Brunton, P. A., Davies, R. P. W., Burke, J. L., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, J., & Kirkman, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides – a clinical safety trial. *British Dental Journal*, 215(4). <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.741>
15. Kokubo T. (2008). *Bioceramics and Their Clinical Applications*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Materials.
16. Fernandez J., Guilemany J. M., & Gaona M. (2005). La proyección térmica en la obtención de recubrimientos biocompatibles: ventajas de la proyección térmica por alta velocidad (HVOF) sobre la proyección térmica por plasma atmosférico (APS), *Biomecánica*, 13(1), 16-39.
17. Oerlikon Metco. Técnica de Plasma Spray. Disponible en <https://www.oerlikon.com/metco/en/products-services/coating-equipment/thermal-spray/processes/atmospheric-plasma/>
18. Gogotsi, Y. (2006). *Nanomaterials Handbook*. Oxfordshire, United Kingdom: Taylor & Francis.
19. Poole C. P., & Owens F. J. (2007). *Introducción a la Nanotecnología*. Barcelona, España: Editorial Reverté.
20. Fenniri H., Mathivanan P., Vidale K. L., Sherman D. M., Hallenga K., Wood K. V., & Stowell J. G. (2001). Helical Rosette Nanotubes: Design, Self-Assembly, and Characterization. *Journal American of Chemical Society*, 123(16), 3854-3855. <https://doi.org/10.1021/ja005886l>
21. Wei G., & Ma P. X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 25(19), 4749-4757. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.005>
22. Tang, S., Tian B., Guo, Y-J., Zhu Z-A., & Guo Y-P. (2014). Chitosan/carbonated hydroxyapatite composite coatings: Fabrication, structure and biocompatibility. *Surface & Coatings Technology*, 251(25), 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.04.028>
23. Yang, H., Yan X., Ling M., Xiong Z., Ou C., & Lu W. (2015). In Vitro Corrosion and Cytocompatibility Properties of Nano-Whisker Hydroxyapatite

- Coating on Magnesium Alloy for Bone Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 6113-6123. <https://doi.org/10.3390/ijms16036113>
24. Surmeneva M.A., & Surmenev R.A. (2015). Microstructure characterization and corrosion behavior of a nano-hydroxyapatite coating deposited on AZ31 magnesium alloy using radio frequency magnetron sputtering, *Vacuum*, 117, 60-62. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2015.04.004>
 25. Chen J-X., Wang H. Y., Quan C-Y., Xu X-D., Zhang X-Z., & Zhuo R-X. (2010). Amphiphilic cationic lipopeptides with RGD sequences as gene vectors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(14), 3142-3148. <https://doi.org/10.1039/c003538f>
 26. Chang R. (2014). *Selective inhibition of Osteosarcoma Cell Functions Induced By Curcumin-Loaded Self-assembled Arginine-Rich-RGD Nanospheres* (Master's dissertation). Boston, MA: Northeastern University.
 27. Biomatik. Síntesis de Péptidos. Disponible en https://www.biomatik.com/content/service_docs/peptide_synthesis_FAQs
 28. Qiu F., Chen Yongzhu, Tang Chengkang, & Zhao Xiaojun. (2018). Amphiphilic peptides as novel nanomaterials: design, self-assembly and application. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 5003-5022. <https://doi.org/10.2147/ijn.s166403>
 29. Kotz J. C., Treichel P. M., & Weaver G. C. (2005). *Química y Reactividad Química*. Stamford, CT: Thomson.
 30. Universidad de Oviedo. Síntesis de polímeros. Disponible en <http://www6.uniovi.es/usr/fblanco/Tema1.Anexo2.SintesisPOLIMEROS.pdf>
 31. Drop Casting Method. Disponible en https://ebrary.net/204410/engineering/solvent_casting_technique
 32. Kumar A. K. S., Zhang Y., Li D. (2020). A Mini-Review: How Reliable Is the Drop Casting Technique? *Electrochem Commun. C*, 121.
 33. Universidad Politécnica de Valencia. Determinación de las estructuras cristalinas. Disponible en <http://personales.upv.es/~avicente/curso/unidad3/determinacion.html>
 34. USGS. Difracción de Rayos-X. Disponible en <http://pubs.usgs.gov/of/2001/of01-041/htmldocs/xrpd.htm>

35. Instituto Geológico Minero y Metalúrgico. Difracción de Rayos X. Disponible en https://www.ingemmet.gob.pe/web/lab/tecnicas_rx
36. Zhang S., Li L., & Kumar A. (2008). *Materials Characterization Techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press.
37. Universidad del País Vasco. Espectroscopia Infrarroja. Disponible en <http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>
38. Enciclopedia Cubana. Microscopio electrónico de barrido. Disponible en https://www.ecured.cu/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido
39. Blogger. La espectroscopia de rayos-X. Disponible en <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.mx/2009/08/la-espectroscopia-de-rayos-x.html>
40. Partes de Cosas & Términos. Partes del microscopio electrónico. Disponible en https://www.partesdel.com/microscopio_electronico.html
41. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Microscopia Electrónica. Disponible en https://www2.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr_electr.htm
42. Budavari, S. (1989). *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Royal Society of Chemistry.
43. Perry R. H. (1999). *Manual del Ingeniero Químico*. New York City, NY: McGrawHill.
44. Sigma Aldrich. Hidrogeno Fosfato de Amonio. Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/379980?lang=es®ion=MX>
45. Chemical Industry Association. (1991). *Chemical Safety Sheets working with hazardous chemicals*. Norwell, MA: Samson Chemical Publishers & Kluwer Academic Publishers.
46. Sigma Aldrich. Nitrato de Calcio Tetrahidratado. Disponible: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/c1396?lang=es®ion=MX>
47. Sigma Aldrich. Hidroxietil Metacrilato. Disponible: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/2hydroxyethylmethacrylate1301486877911?lang=es®ion=MX>

48. Sigma Aldrich. Poli Hidroxietil Metacrilato. Disponible:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/poly2hydroxyethylmethacrylate123452524916511?lang=es®ion=MX>
49. Chang R. (2014). *Selective inhibition of Osteosarcoma Cell Functions Induced By Curcumin-Loaded Self-assembled Arginine-Rich-RGD Nanospheres* (Master's dissertation). Boston, MA: Northeastern University.

PRODUCTOS DEL TRABAJO

Asistencia a congresos

- International Congress on Applications of Nanotechnology 2014 and the 6th Annual Meeting of the Nanoscience and Micro-Nanotechnology Network of the National Polytechnic Institute, September 29th- October 2nd, CDMX, 2014.
- VII International Congress on Surfaces, Materials and Vacuum, October 6 - 10, Ensenada, Baja California, Mexico, 2014.
- XII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, September 23rd to 27th, San Luis Potosí, México, 2019
- LXII Congreso Nacional de Física, 6-11 Octubre, Tabasco, México, 2019

Memorias Resúmenes

- Hydroxide coatings nanocrystalline calcium phosphate on titanium orthopedic implants, F. F. Ríos, M. M. Méndez-González, M. García-Rocha, G. Méndez G, ICANANO2014.
- Comportamiento Estructural del Hidróxido de Fosfato de Calcio Nanocristalino, F. F. Ríos Pimentel, M. M. Méndez-González, M. García Rocha, NANO CINVESTAV 2014.
- Structural behavior of nanocrystalline calcium phosphate hydroxide, M. M. Mendez- Gonzalez, F. F. Ríos Pimentel, M. Garcia Rocha, VII International Congress on Surfaces, Materials and Vacuum, 2014.
- Morphology and adhesion of osteoblasts of poly-hydroxyethyl metacrylate hydrogel coatings with nanocrystalline hydroxyapatite and nanophilic peptide nanoparticles deposited on Ti6Al4V, F. F. Ríos Pimentel, S. Sánchez Mendez, M. M. Mendez- Gonzalez, XII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, 2019.
- Morfología y adherencia de osteoblastos de recubrimientos de hidrogel poli-hidroxietilmetacrilato con hidroxapatita nanocristalina y nano partículas peptídicas anfífilas, depositados sobre Ti6Al4V, F. F. Ríos Pimentel, U. U. Mérida Toledo, S. Sánchez Méndez, M. M. Méndez-González, LXII Congreso Nacional de Física, 2019.

- Caracterización morfológica de nano partículas de péptido anfífilico, F. F. Ríos Pimentel, M. García Rocha, M. M. Méndez-González, LXIII Congreso Nacional de Física, 2020.
- Morphological characterization of amphiphilic peptide nanoparticles, F. F. Ríos Pimentel, A. García Borquez, M. M. Méndez-González, XIII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, Virtual Conference, 2020
- Adhesion of osteoblasts on nanocrystalline hydroxyapatite coatings for orthopedic implants, XV International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, 2023
- Adherencia de osteoblastos en recubrimientos de hidroxiapatita nanocrystalina para implantes ortopédicos, LXVI Congreso Nacional de Física, 2023.

Ponencias en Posters

- Hydroxide coatings nanocrystalline calcium phosphate on titanium orthopedic implants, ICANANO2014.
- Structural behavior of nanocrystalline calcium phosphate hydroxide, VII International Congress on Surfaces, Materials and Vacuum, 2014.
- Morphology and adhesion of osteoblasts of poly-hydroxyethyl metacrylate hydrogel coatings with nanocrystalline hydroxyapatite and nanophilic peptide nanoparticles deposited on Ti6Al4V, XII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, 2019.
- Morfología y adherencia de osteoblastos de recubrimientos de hidrogel poli-hidroxietilmetacrilato con hidroxiapatita nanocrystalina y nano partículas peptídicas anfífilicas, depositados sobre Ti6Al4V, LXII Congreso Nacional de Física, 2019.
- Caracterización morfológica de nano partículas de péptido anfífilico, LXIII Congreso Nacional de Física, 2020.

- Morphological characterization of amphiphilic peptide nanoparticles, XIII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, Virtual Conference, 2020
- Adhesion of osteoblasts on nanocrystalline hydroxyapatite coatings for orthopedic implants, XV International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, 2023 (en prensa)
- Adherencia de osteoblastos en recubrimientos de hidroxiapatita nanocrystalina para implantes ortopédicos, LXVI Congreso Nacional de Física, 2023 (en prensa)
- Nanocrystalline hydroxyapatite coatings and amphiphilic peptide nanoparticles for bone implants, F. F. Ríos Pimentel, M. García Rocha, M. M. Méndez-González, **Bio-inspired and bio-integrated materials in accelerating technologies**, 2023 (en prensa).

Memorias Extenso

- Hidroxiapatita nanocrystalina depositada sobre Ti6Al4V para implantes óseos, M. M. Méndez-González, F. F. Ríos Pimente, M. García Rocha, **Reunión Nacional Académica de Física y Matemáticas**, Año: 25, No. 25, ISSN: 2594-1011, pp.314-317, 2020.
- Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita nanocrystalina y nano partículas peptídicas anfífilicas, para implantes óseos, F. F. Ríos Pimentel, M. García Rocha, M. M. Méndez-González, **Reunión Nacional Académica de Física y Matemáticas**, Año: 28, No. 28, ISSN: 2594-1011, 2023 (en prensa).

Estancias

- Estancia en Northeastern Univeristy del 1 de marzo del 2015 al 30 de abril del 2015.

Publicación en Revistas Indexadas

- Greater Osteoblasts Adhesion Due to the Addition of Amphiphilic Peptide Nanoparticles to Nano Hydroxyapatite Coatings, **International Journal of Nanomedicine**, 2019:14, Pages 3265-3272.

- A Short Review: Hydroxyapatite Coatings for Metallic Implants, ***Heat Treatment and Surface Engineering***, (Por publicar en Heat Treatment and Surface Engineering, open access journal).

Greater osteoblast densities due to the addition of amphiphilic peptide nanoparticles to nano hydroxyapatite coatings

This article was published in the following Dove Medical Press journal:
International Journal of Nanomedicine

Fernando F Rios-Pimentel¹
Run Chang²
Thomas J Webster²
Magdalena M
Méndez-González³
Miguel García-Rocha⁴

¹Nanociencias y Nanotecnología, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México; ²Department of Chemical Engineering, Northeastern University, Boston, MA, USA; ³Departamento de Física, ESFM-IPN, Ciudad de México, México; ⁴Departamento de Física, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México

Background: In vitro and in vivo studies have shown that metallic implants coated with nano hydroxyapatite (HA) reduce the time needed for complete osseointegration compared to metallic implants coated with conventional or micron-sized HA. Moreover, due to their biologically inspired nanometer dimensions, amphiphilic peptide nanoparticles (APNPs) can also promote osteoblast attachment and enhance other cell functions if used as a coating material. Coatings made of HA and APNPs could improve osteoblast functions, but have never been tested.

Purpose: The objective of this study was to prepare coatings of nanocrystalline HA and APNPs on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) coatings in order to improve osteoblast (bone-forming cells) adhesion and cell density.

Methods: HA was synthesized by a wet chemical process. Coatings were synthesized with different conditions and components.

Results: X-ray diffraction infrared spectroscopy, transmission electron microscopy, and electron diffraction showed that nanocrystalline HA was synthesized with an expected nano size and shape distribution but with low impurities. PHEMA hydrogels with HA and APNPs increased osteoblast densities after 3 days compared to controls.

Conclusion: Since cell proliferation is a prerequisite function for bone formation, these results imply that the current materials should be tested for a wide range of orthopedic applications.

Keywords: orthopedic applications, XRD, FTIR, TEM, SEM, cell studies

Introduction

Although metallic implants, especially titanium and its alloys, have high tensile and compressive strength, high corrosion resistance, and high biocompatibility, they do not tend to promote the regeneration of bone at their surfaces and they do not show an ability to support osseointegration over the long term.¹⁻⁷ These metallic implants show high failure rates after 10–15 years of implantation. For instance, in the United States, 11% of hip replacements and 8% of knee replacements required revision in 2003.⁸ For this reason, researchers have developed strategies for the modification of the surfaces of metallic implants in order to promote osseointegration.^{1-4,9} An alternative to improve osseointegration and to reduce the wear of bone implants is to apply a surface coating with materials that are similar to those found in natural bone. Calcium phosphates seem to be good candidates for this purpose, as 65% of the mineral phase of bone is composed of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})$ (hydroxyapatite [HA]), a calcium phosphate; however, only some calcium phosphates are useful for this purpose, since its solubility increases when its Ca/P ratio is reduced.¹⁰⁻¹²

Correspondence: Thomas J Webster
Department of Chemical Engineering,
Northeastern University, 313
Snell Engineering Center, Boston,
MA 02115, USA
Tel +1 617 373 6585
Email th.webster@neu.edu

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress |    
<https://doi.org/10.31463/ijnm.v11i02.3>

International Journal of Nanomedicine 2019;14:3265–3272

3265

 © 2019 Rios-Pimentel et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v4.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). By accessing the work you hereby accept the terms. Non-commercial use of this work is permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

A short review: hydroxyapatite coatings for metallic implants

Fernando F. Rios-Pimentel^a, Magdalena M. Méndez-González^b and Miguel García-Rocha^c

^aPrograma de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México; ^bDepartamento de Física, ESFM-IPN, Ciudad de México, México; ^cDepartamento de Física, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México

ABSTRACT

The number of orthopedic surgeries will continue increasing over the next decades. The most common causes of orthopedic implant failure after implantation are infections, inflammatory response, corrosion, mismatch in elastic modulus, stress shielding and excessive wear. To address the problems associated with implants, different modifications related to geometry, materials and surface have been developed. Among the different methods, coating is an effective method to improve the performance of implant materials. Hydroxyapatite is the best option to coat metallic implants and it has been used in clinical practice for more than 30 years. In this article, a comprehensive review of recent studies has been carried out to summarize the impact of hydroxyapatite on metallic implants. The antibacterial characteristics, biodegradability, biocompatibility, corrosion behavior and mechanical properties for performance evaluation are briefly summarized. Different effective coating techniques and additives have been summarized. The results are useful to produce the coating with optimized properties.

ARTICLE HISTORY

Received 9 December 2022
Revised 13 February 2023
Accepted 7 April 2023

KEYWORDS

Orthopedic implants;
coatings; hydroxyapatite;
biocompatibility

Introduction

Today, every country in the world is experiencing growth in both the size and the proportion of older persons in the population. By 2030, people aged 60 and over will increase from 1 billion in 2020 to 1.4 billion and they will represent 16% of the world's population. By 2050, the world's population of people aged 60 years and older will double (2.1 billion). Between 2020 and 2050, the number of persons aged 80 years or older is expected to triple to reach 426 million [1,2]. The aging of the population and the fact that patients in their middle years are increasingly choosing for orthopedic implants due to lifestyle-related concerns such as early burnout and lack of exercise are increasing the number of orthopedic surgeries. In the United States, the size of the orthopedic implant market in 2021 was \$45.30 billion and is estimated to reach \$64.18 billion by 2028, with joint reconstruction representing the largest share among other product types, such as orthobiologics, spinal, trauma and dental implants [3]. These implants are required to be inert to living tissues, not carcinogenic, not toxic, not dense, strong, elastic, ductile, tough, corrosion resistant and must promote osteointegration [4–6]. Many materials including metals, alloys, ceramics, polymers and composites are used in orthopedic applications [7]. Among these materials, metallic materials have shown better mechanical properties (strength, elastic modulus ductility and toughness). The

most common metals used in orthopedic applications are stainless steel, titanium alloys and cobalt-chromium alloys due to their cost-effectiveness, excellent durability and favorable mechanical properties; on the other hand, biodegradable metals, such as magnesium, iron and zinc are used for temporary applications [8–13]. Although metallic implants, especially titanium alloys have great mechanical properties, they do not show good wear and corrosion resistance, as well as an ability to support osseointegration over the long term [14]. For this reason, it is necessary to develop novel orthopedic implants for bone and joint replacement or to support damaged bones [15–17]. One approach to overcome this issue is to coat the surface of the metallic implants with functional materials that alter surface morphology and topography, energy, charge and chemistry [18]. A good coating should have sufficient adhesion strength, high hardness, excellent osseointegration, good osteoconduction, low number of cracks and no inclusions. Calcium phosphates are perfect candidates for this purpose, since 65% of the mineral phase of bone is composed of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (hydroxyapatite [HA]), a calcium phosphate; nevertheless, it is important to consider that only some calcium phosphates are useful for this purpose, for its solubility increases when its Ca/P ratio is lowered. Crystalline HA, which has a hexagonal crystal structure, spatial group P63/m, cell parameters $a = b = 9.42 \text{ \AA}$ and $c = 6.88 \text{ \AA}$, is considered the best option to

CONTACT Fernando F. Rios-Pimentel  frios@cinvestav.mx  Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, Ciudad de México 07360, México

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.