

Universidad Nacional De Colombia Sede Manizales
Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales
Departamento De Física Y Química



**Análisis electroquímico de los recubrimientos de hidroxiapatita
ovina crecidos por ruta hidrotérmica sobre capas de TiO_2 obtenidas
por oxidación electrolítica por plasma**

MEMORIA DE TESIS DE MAESTRÍA

Ingeniera Física. Natalia Alzate Acevedo

Manizales, Colombia

2023

**Análisis electroquímico de los recubrimientos de hidroxiapatita
ovina crecidos por ruta hidrotérmica sobre capas de TiO_2 obtenidas
por oxidación electrolítica por plasma**

Memoria de Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para
optar al título de Magíster en Ciencias-Física.

Ingeniera Física. Natalia Alzate Acevedo

Directora: Doc. Elisabeth Restrepo Parra

Codirector: M. Ing. Darwin Augusto Torres Cerón

LABORATORIO FÍSICA DE PLASMA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física y
Química
Manizales, Colombia

2023

CONTENIDO

Agradecimientos.....	11
RESUMEN.....	13
CAPÍTULO 1:.....	14
1. PRELIMINARES.....	14
1.1 Introducción.....	14
1.2 Antecedentes.....	17
1.3 Planteamiento del problema.....	20
1.4 Pregunta de investigación.....	21
1.5 Objetivo General.....	22
1.6 Justificación.....	23
CAPÍTULO 2:.....	25
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	25
2.1 Hidroxiapatita.....	25
2.2 Dióxido de titanio.....	27
2.3 Oxidación electrolítica por plasma.....	27
2.4 Ruta hidrotermal.....	29
2.5 Bioactividad.....	30
2.7 Tafel – Resistencia a la polarización.....	32
CAPÍTULO 3:.....	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	33
3.1 Obtención de Hidroxiapatita a partir de Origen Biogénico.....	33
3.2 Síntesis de recubrimientos de Hidroxiapatita de hueso ovino.....	35
CAPÍTULO 4:.....	40
4 Resultados y Discusión.....	40
4.1 Caracterización de polvo de hueso e HAp calcinada a 600 °C, 800 °C y 1000 °C...41	
4.2 Caracterización de la modificación superficial por OEP - TiO ₂ /HAp.....	53
4.3 Evaluación electroquímica.....	64
5. CONCLUSIONES.....	76
5.1 PRODUCTOS DE LA TESIS.....	77

- Artículo publicado: Influence of the calcination temperature on the crystallographic, compositional, and morphological properties of natural hydroxyapatite obtained from sheep bones, Scientia et Technia, 2021. 78
- 5.2 RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS..... 78
- 6. REFERENCIAS 79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina de la Hidroxiapatita.....	26
Figura 2. Posibles sustituciones del grupo carbonato en la hidroxiapatita.	26
Figura 3. Montaje oxidación electrolítica por plasma.....	28
Figura 4. Montaje equipo para ruta hidrotermal.	29
Figura 5. Ejemplo de diagrama de Nyquist.....	31
Figura 6. Curva de resistencia a la polarización.....	32
Figura 7. Metodología obtención de hidroxiapatita a partir de fuente natural.	34
Figura 8. Proceso de oxidación electrolítica por plasma.	36
Figura 9. Metodología recubrimiento por ruta hidrotermal.	37
Figura 10. Gráfica ATG del polvo de hueso ovino.	42
Figura 11. Espectros FTIR de las diferentes hidroxiapatitas a) Rango de 4000 a 1250 cm^{-1} , b) Rango de 1250 a 400 cm^{-1}	44
Figura 12. Difractogramas de las HAp calcinadas a 600°C, 800°C, 1000°C y comercial.	47
Figura 13. a) Ajuste Lorentz para muestra calcinada a 800 °C y b) relación entre el FWHM y la temperatura de calcinación de HAp (600 °C, 800 °C y 1000 °C) y comercial.	48
Figura 14. Micrografías MEB del polvo de hueso ovino a) Magnificación 10 μm , b) Magnificación 2 μm y c) espectro EDX elemental del PHO.....	50
Figura 15. HAp calcinada a 600°C a) Micrografías MEB, b) Espectro EDX elemental.....	51
Figura 16. HAp calcinada a 800°C a) Micrografías MEB, b) Espectro EDX elemental.....	51
Figura 17. HAp calcinada a 1000°C a) Micrografías MEB, b) Espectro EDX elemental.....	52
Figura 18. Esquema de la disposición de los iones de calcio y fosforo en la superficie del sustrato de Ti.	54

Figura 19. a) Difractograma de blanco de Ti y de las láminas de Ti con tratamiento de OEP, HApT600, HApT800, HApT1000, HAp comercial. b) Plano (101) de anatasa para las muestras de HApT600, HApT800, HApT1000 e HAp comercial.	56
Figura 20. Difractogramas de las láminas de Ti con tratamiento de OEP e HT a) HApT600°C, b) HApT800°C, c) HApT1000°C, d) HApComercial.	57
Figura 21. Esquema del recubrimiento bioactivo después del tratamiento OEP e HT.	58
Figura 22. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HAp600°C, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.....	59
Figura 23. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HAp800°C, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.....	59
Figura 24. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HAp1000°C, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.....	60
Figura 25. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HApComercial, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.....	60
Figura 26. Cambio del sustrato debido a los tratamientos.....	61
Figura 27. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HAp600°C)...	61
Figura 28. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HAp800°C)...	62
Figura 29. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HAp1000°C).	62
Figura 30. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HApComercial).	63
Figura 31. Gráfica Nyquits del análisis de las muestras tratadas con OEP.	65
Figura 32. Gráfica Nyquits del análisis de las muestras tratadas con HT.	66
Figura 33. Circuito equivalente (a) muestras tratadas por OEP y (b) muestras tratadas por OEP e hidrotermal.	67
Figura 34. Representación gráfica del comportamiento de los circuitos equivalentes.	67
Figura 35. Curvas de polarización de muestras tratadas con OEP.	68
Figura 36. Curvas de muestras tratadas con OEP e Hidrotermal.	69
Figura 37. Correlación del valor de resistencia a la polarización en función de las diferentes hidroxiapatitas.....	72
Figura 38. Correlación del valor de velocidad de corrosión en función de las diferentes hidroxiapatitas.....	72
Figura 39. Relación de Ca/P para las diferentes hidroxiapatitas.....	72
Figura 40. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HAp600)..	73

Figura 41. Figura 40. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HAp800).....	73
Figura 42. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HAp1000).	74
Figura 43. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HApComercial).	74
Figura 44. Disposición de los planos de hidroxiapatita.....	75

ÍNDICES DE TABLA

Tabla 1. Reactivos necesarios para el fluido biológico simulado	38
Tabla 2. Parámetros de red y cristalinidad de muestras de 600, 800, 1000 y comercial.....	49
Tabla 3. Relación Ca/P de las hidroxiapatitas calcinadas (600 °C, 800 °C y 1000 °C) y la comercial.....	53
Tabla 4. Relación de la HAp con las variables electroquímicas.....	70

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HAp Hidroxiapatita

BHAp Biohidroxiapatita

HT Hidrotermal

OEP Oxidación electrolítica por plasma

Ti Titanio

TiO₂ Óxido de titanio

MEB Microscopía electrónica de barrido

EDX Energía Dispersiva de Rayos X

DRX Difracción de rayos X

FTIR Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

EIS Espectroscopía de impedancia electroquímica

ATG Análisis termogravimétrico

FBS Fluido Biológico Simulado

ICOR Corriente de corrosión

ECOR Potencial de corrosión

VEL COR Velocidad de corrosión

Mpy Milipulgadas por año

mV Milivoltios

nA NanoAmperios

μA MicroAmperios

NaOH Hidróxido de sodio

kV Kilovoltios

cm² Centímetros cuadrados

CaO Óxido de Calcio

Kg Kilogramo

W Watts

H Hora

°C Grados centígrados

mL Mililitros

Ag Plata

AgCl Cloruro de plata

Mm Milímetros

RPM Revoluciones por minutos

Hz Hertz

V Voltaje

H₂O Agua

Min Minutos

mg miligramos

CaCO₃ Óxido de calcio

Na₃PO₄ Fosfato de sodio

ASME American Society of Mechanical Engineers.

A mi familia, porque no pude haber tenido una mejor; siempre han sido mi sostén y fuerza, por ellos todos los días trato de ser una mejor persona y profesional, porque de mi parte solo merecen el amor más profundo, como ellos lo han tenido hacia a mí.

A mi compañero de vida por siempre sostener mi mano en los momentos más difíciles y amarme.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia por todo el amor el que brindan a diario, su motivación en cada punto de este proceso y por confiar en cada paso que doy en mi vida profesional.
- A la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por ser mi alma mater.
- A la profesora Elisabeth Restrepo Parra, por su apoyo en mi formación profesional.
- Al Magister Darwin Augusto Torres Cerón, por su contribución en el planteamiento y desarrollo experimental de esta investigación.
- A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su contribución a través de las Becas “Joven becario” para estudiantes de Posgrado.
- A Minciencias por la Beca Jóvenes investigadores e innovadores en el marco de la reactivación económica 2021 convocatoria 907.
- A los ingenieros Daniel Alejandro Pineda Hernández, Nini Valentina Naranjo Castaño y la Licenciada Yury Paola García por su cariño, apoyo y motivación en toda la investigación.
- A la ingeniera física Valentina Restrepo Ramírez por su amistad y apoyo en el desarrollo de este trabajo.
- A los estudiantes de ingeniería Manuela Soto González, Lesly Dayana Cañas López y Santiago Ocampo Palacios por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.
- Al laboratorio de aguas de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo en la caracterización del proyecto de investigación.
- A todos mis compañeros y colegas del Laboratorio de Física del Plasma por sus recomendaciones en el desarrollo de la investigación.
- A todas aquellas personas que contribuyeron de alguna manera a la realización de este trabajo.
- Al “Programa De Investigación Reconstrucción Del Tejido Social En Zonas De Posconflicto en Colombia”, código SIGP: 57579 con la investigación “Competencias Empresariales y de Innovación para el Desarrollo Económico y la Inclusión Productiva de las regiones afectadas por el Conflicto Colombiano” código SIGP: 58907. Financiada por la convocatoria Colombia Científica, contrato No CCH083 de 2021.

Title: Electrochemical analysis of ovine hydroxyapatite coatings grown by hydrothermal route on TiO₂ layers obtained by plasma electrolytic oxidation.

Título: Análisis electroquímico de los recubrimientos de hidroxiapatita ovina crecidos por ruta hidrotermal sobre capas de TiO₂ obtenidas por oxidación electrolítica por plasma

ABSTRACT

The performance of biomaterials with applications in implants depends both on their elemental composition and on the formation of the surface, so it is important, in addition to the material to be used, the ideal composition that the surface should have when in contact with microorganisms. Bioceramics materials such as hydroxyapatite have great interest in biomedicine because their chemical composition is very similar to the mineral part of bone tissues, so that in contact with living systems, they have a favorable biological response, but do not have adequate mechanical properties when working as an implant. Due to this those materials such as Ti and Ti alloys are used for the scaffolding of these implants. Despite this, the bioactive response in living systems is not optimal. For this reason, in this work we developed the surface modification of pure Ti substrates through Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) and hydrothermal treatment (HT), with the application of ovine hydroxyapatite and its subsequent evaluation by electrochemical techniques in an electrolytic solution of simulated biological fluid. For this purpose, a first HAP seed deposition was carried out by means of PEO, followed by the application of HT process which allowed an ordered growth of different hydroxyapatites (T600 °C, T800 °C, T1000 °C and commercial) on the TiO₂ surface. The samples were characterized by DRX, SEM-EDX, where it was observed the ordering and formation of the hydroxyapatite of the seeds previously deposited PEO, from the DRX patterns was observed that the samples that had the hydrothermal process showed a crystalline hydroxyapatite. Finally, electrochemical evaluations were performed, where the results showed an improvement of the samples that were treated with PEO comparing to those that were treated combining the PEO and HT techniques. Additionally, the T800 °C sample showed a significant improvement compared to the other three samples in terms of corrosion rate and polarization resistance.

RESUMEN

El desempeño de los biomateriales con aplicaciones en implantes depende tanto de su composición elemental, como de la formación de la superficie, por lo que es importante además del material a emplear, establecer la composición ideal que debe tener la superficie, al entrar en contacto con microorganismos. Ante esto, las biocerámicas como la Hidroxiapatita son de gran interés en la industria biomédica, debido a que su composición química es muy similar a la parte mineral de los tejidos óseos, por lo que en contacto con sistemas vivos tiene una respuesta biológica favorable; aunque no tiene las propiedades mecánicas adecuadas al momento de funcionar como un implante.

Es a partir de esto, que se emplean materiales como titanio y sus aleaciones, para el andamiaje de estos implantes. Sin embargo, a pesar de esto la respuesta bioactiva en sistemas vivos no es la óptima. Es por esto, que este trabajo investigativo desarrolló la modificación superficial de sustratos de Ti puro a través de OEP (Oxidación electrolítica por plasma) e hidrotermal, con la aplicación de hidroxiapatita ovina y su posterior evaluación por técnicas electroquímicas en una solución electrolítica de fluido biológico simulado. Para ello, se realizó una primera deposición de semillas de HAp por medio de OEP y la formación de TiO_2 , y posteriormente se procedió a la aplicación de proceso HT con el que se realizó un crecimiento ordenado de las diferentes hidroxiapatitas (T600 °C, T800 °C, 1000 °C y comercial) sobre la superficie de TiO_2 . Las muestras fueron caracterizadas por DRX, MEB-EDX, donde se observó el ordenamiento y formación de la hidroxiapatita de las semillas depositadas previamente OEP, de los difractogramas, al igual que se observó que las muestras con el que se llevó a cabo el proceso hidrotermal muestran una hidroxiapatita cristalina. Finalmente, se hizo evaluaciones electroquímicas, donde los resultados arrojaron una mejora de las muestras que sólo fueron tratadas con OEP a las que fueron tratadas combinando las técnicas de OEP e HT. Adicionalmente la muestra T800 °C mostró una mejora significativa en comparación con las otras tres muestras en cuanto a la velocidad de corrosión y la resistencia a la polarización.

Key words: Biohydroxyapatite, meat waste, electrolytic oxidation by plasma, hydrothermal route.

Palabras Claves: Biohidroxiapatita, residuos cárnicos, Oxidación electrolítica por plasma, ruta hidrotermal

CAPÍTULO 1:

1. PRELIMINARES

En este capítulo se recopila información de diferentes estudios científicos previos a esta investigación sobre el tema de interés. A partir de esto se traza la justificación, pregunta de investigación y los objetivos a desarrollar a lo largo de todo el trabajo.

1.1 Introducción

Los tejidos óseos están sometidos a constante estrés mecánico, razón por la cual se presentan fracturas y fisuras en los huesos, esta situación se ve incrementada con la edad y enfermedades como la osteoporosis, entre otras [1]. En Colombia al año se reportan aproximadamente 72.000 fracturas de diferente índole, donde el grupo poblacional más afectado son las personas mayores de 50 años. Solo para mujeres mayores de 60 años se producen más de 8.000 fracturas de cadera al año; este tipo de fractura en mayores de 70 años presenta una mortalidad del 36% durante las primeras semanas de ocurrida [2].

Es debido a esto que uno de los principales problemas que enfrenta la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos son las afectaciones óseas. Algunas de las soluciones que se emplean en la actualidad para afrontar este tipo de retos en salud pública [1], son la aplicación de diferentes tipos de injertos: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos [3], [4]; además del uso de biomateriales a partir de cerámicos, metales y polímeros, para procesos de sustitución ósea: rellenos óseos, cirugías maxilofaciales, entre otros. No obstante, a pesar de esto, las soluciones que se encuentran en el mercado no son las ideales en cuanto a la regeneración del tejido óseo, estabilidad mecánica, biocompatibilidad, reabsorción y biodegradabilidad, estabilidad química, peso y la relación de estas características con el costo, ya que estas soluciones en su mayoría se abordan desde los metales [3], [5].

Para humanos y animales vertebrados, los tejidos duros asociados a la estructura ósea y dientes corresponden a la fase mineral inorgánica de estos, aproximadamente un 65-69% del peso total [6]. Esta fase mineral natural es conocida como Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) o fosfatos tricálcicos, los cuales pertenecen al grupo de las apatitas y aunque se encuentra de forma natural en los huesos también puede ser obtenida de otras fases minerales existentes en la naturaleza y también de forma sintética [7]–[9].

Desde esta perspectiva, los biomateriales usados en ingeniería de materiales y/o biomedicina deben cumplir con características específicas: ser bioactivos, biodegradables, poder ser reabsorbidos por el cuerpo humano y biocompatibles con sistemas vivos. De forma que, la hidroxiapatita entra a ser una excelente opción, ya que cumple con todas estas características biológicas mencionadas y además es osteoactiva [3]. Sin embargo, a pesar de esto, las propiedades mecánicas que presenta la HAp son bajas en comparación con otros materiales [5]. Los materiales utilizados para recuperación ósea deben poseer también propiedades mecánicas adecuadas, para soportar los esfuerzos constantes a los que se someten los huesos día a día. Ante esto, los metales como titanio, aleaciones de titanio, aceros inoxidable, cobalto, etc., tienen buena resistencia a la fatiga, compresión, tracción y tenacidad, haciendo de estos una opción viable y ampliamente utilizada en la medicina actual [10], [11].

De allí que, el titanio (Ti) y sus aleaciones sean por predilección de los materiales más empleados para la generación de implantes ortopédicos y dentales, esto a causa de las propiedades que presentan, dentro de las cuales se destaca una buena relación resistencia/peso y resistencia a la corrosión. Esta alta resistencia a la corrosión es debido la formación pasiva de la capa de óxido en la superficie del Ti, que confiere una estabilidad química superior. No obstante, este tipo de óxido nativo del Ti, reporta una baja unión biológica con los tejidos circundantes y hospederos [10], [12]; y aunque, son muy utilizados, siguen teniendo limitaciones como: restos por desgaste, adherencia bacteriana e interacciones limitadas con el entorno biológico, puesto que son químicamente inertes, evitando así, que se promueva el crecimiento del nuevo hueso; y finalmente ocasiona la formación de una cápsula fibrosa alrededor de las prótesis [7], [12].

Es por esto, que, con los adelantos presentados en este campo de estudio, se pretende analizar de manera preliminar la importancia de recubrimientos bioactivos sobre superficies metálicas con aplicaciones en la elaboración de las prótesis, donde se busca que

los metales bioinertes no sean tóxicos para el cuerpo humano y que presenten las propiedades mecánicas adecuadas para respaldar, soportar y cumplir las características fisicoquímicas del hueso donde se realiza la inclusión [13]. Por este motivo, han surgido investigaciones recientes en el campo de los recubrimientos para prótesis metálicas, con la finalidad de conseguir una prótesis que recoja todas las características importantes a la hora de ser implantada. Asimismo, se halla la necesidad de investigar los diferentes tipos de recubrimiento como los físicos, químicos, electroquímicos y mixtos que conllevan a establecer su funcionalidad, efectividad y uso.

De este modo, las técnicas más conocidas para recubrimientos de hidroxiapatitas son: sol-gel, Spray-plasma, magnetrón sputtering RF, deposición electroforética, pulverización por plasma, oxidación electrolítica por plasma (OEP), etc [10], [13]–[16]. Esta última, la OEP es un híbrido entre la electrólisis convencional y arco de plasma, popular porque produce una capa bioactiva y microporosa altamente adherida a los implantes [14]. Otras características que también presenta son su simplicidad, bajo costo, capacidad de formar compuestos complejos sin obtener desechos peligrosos y producción de recubrimientos uniformes sobre superficies [10]. Adicionalmente, estos procesos han sido mejorados combinando técnicas de modificación superficial de materiales como el método Hidrotermal, ya que, permite que los iones disueltos puedan interactuar y formar una fase de hidroxiapatita cristalina; en efecto esto, produce una mejora de la respuesta celular de las muestras tratadas, debido a la presencia de iones de Ca y P en las primeras etapas de adhesión celular, estimulación mecánica de las células debido a los pilares de HAp y mayor resistencia a la corrosión [12].

Es debido a lo expuesto anteriormente que, en este estudio, se realizó el análisis de electroquímico de recubrimientos bioactivos sobre placas de Ti. Para esto se hizo el crecimiento de capas de TiO_2 usando un electrolito de sulfato de sodio (Na_3PO_4) con adición de hidroxiapatita, para realizar la deposición inicial de semillas y posteriormente se realizó un tratamiento hidrotermal (HT) a fin de promover el crecimiento ordenado de la hidroxiapatita. Y a partir de esto hacer una evaluación de las propiedades bioactivas del recubrimiento en fluido biológico simulado (FBS) a través de técnicas electroquímicas.

1.2 Antecedentes

La hidroxiapatita es un biomaterial de gran importancia en el área de la salud, debido a que sus fases químicas y minerales son semejantes al hueso natural, es por esto por lo que ha sido ampliamente explorado su uso en la odontología y ortopedia, siendo su aplicación en recubrimiento, uno de los más estudiados [17], [18]. En este sentido, los recubrimientos de hidroxiapatita comenzaron a desarrollarse en la década del 80 sobre sustratos metálicos, luego se comercializaron mediante diversas aplicaciones en el campo de los biomateriales [3], [19]. Sin embargo, hoy en día, persisten problemas relacionados con la uniformidad del recubrimiento, la estabilidad a largo plazo de la unión del recubrimiento al sustrato metálico y los costos del proceso. Por lo que, actualmente, se realizan innumerables investigaciones para desarrollar un sistema que combine las ventajas mecánicas de los metales y la afinidad biológica de las cerámicas de hidroxiapatita, obtenidos por diferentes vías y depositados sobre superficies metálicas, tratando de superar los inconvenientes que se puedan presentar [12], [16].

El registro del uso de polvos de hidroxiapatita empleados en cirugías data de 1920. A mediados de la década de 1970, que el profesor Friedrich Osborn trató mandíbulas fracturadas utilizando una fijación externa para obtener la inmovilización de las fracturas y usó cerámica granular de hidroxiapatita para asegurar la unión [20]. Después de esto, se pudo observar que el hueso huésped penetraba en la biocerámica de hidroxiapatita, donde esta participó de todas las actividades fisiológicas [21]. Pero solo fue hasta 1985, que se implantó la primera prótesis de cadera recubierta de hidroxiapatita Furlong [21], simultáneamente R.G.T. Geesink, K De Groot y C.P.A.T. Klein realizaron un estudio de implantes protésicos recubiertos con hidroxiapatita y tuvieron como conclusión que los implantes de titanio recubiertos de HAp estudiados en animales no produce efectos nocivos, entonces por lo tanto podría usarse en humanos [22]. En el avance de conseguir superficies que cuenten con las propiedades adecuadas, y que los recubrimientos utilizados generen buena adhesión, sean de bajo costo, fácil aplicación; se ha abierto el camino a trabajar con diferentes técnicas como lo son las físicas, químicas y asistidas por

plasma. Dentro de las principales se encuentran plasma-espray, magnetrón sputtering RF, oxidaciones electrolíticas por plasma; además técnicas de inmersión como sol-gel, deposición electroforética e hidrotermal. No obstante, las técnicas de inmersión presentaron inconvenientes, debido a la mala adhesión del recubrimiento sobre el sustrato, formación de recubrimiento no uniforme y baja cristalinidad [10].

Otro apartado de relevancia dentro de este tipo de estudios fue la procedencia de los sustratos, siendo el titanio y sus aleaciones materiales de preferencia para la ejecución de implantes ortopédicos debido a las propiedades. Dentro de estas se encuentran resistencia a la corrosión, una alta relación resistencia/peso y estabilidad química superior. A pesar de esto, los materiales derivados del titanio no tienen una buena adhesión a los tejidos óseos, puesto que no tienen características bioactivas, por lo que para mejorar esta característica se usan revestimientos de fosfato cálcicos [10]. Es por esto por lo que actualmente se trabaja en la modificación de superficies de Ti, para formar estructuras que tengan una mejor aplicación en biomedicina, donde los materiales cumplan con las propiedades mecánicas y los requerimientos biológicos. En relación con esta idea, el trabajo desarrollado por Chung *et al.*, [14] realizaron la evaluación del rendimiento de la osteointegración (in vitro e in vivo) de titanio modificado por oxidación electrolítica por plasma a partir de lo cual se obtuvo muestras con diferentes recubrimientos como anatasa, rutilo, hidroxiapatita (HAp), hidroxiapatita que contiene estroncio y fase dual HAp-TiO₂. Los resultados muestran que el recubrimiento de doble fase HAp-TiO₂ tienen mejor adhesión celular y concuerdan significativamente la prueba experimental in vitro con la in vivo. Esta respuesta se debe a que los recubrimientos que contienen HAp se benefician de su bioactividad [14].

En este mismo sentido, Carvalho *et al.*, [13] caracterizaron recubrimientos de hidroxiapatita sobre un sustrato de una aleación de Ti modificada a través de aspersion térmica por plasma, de lo que obtuvieron buenos niveles de porosidad, recristalización de la hidroxiapatita desde el proceso de Espray – plasma. Además de una buena calidad del recubrimiento, en donde el tratamiento térmico posterior comprobó ser eficaz a la hora de aumentar la cristalinidad. Por otra parte, Adelek *et al.*, [10] realizaron un trabajo donde se evaluaron las propiedades de los recubrimientos cerámicos de hidroxiapatita producidos por oxidación electrolítica por plasma en una solución de electrolito de Na₃PO₄, de lo que se pudo observar una relación inversa entre la porosidad y la concentración de

hidroxiapatita de las suspensiones al hacer OEP, por lo que la morfología del recubrimiento, la estructura y adhesión se vieron modificadas por las concentraciones de hidroxiapatita.

Adicionalmente, enfocado a este tipo de investigación se ha realizado trabajos combinando técnicas de recubrimientos que funcionen de forma complementaria como la oxidación electrolítica por plasma e hidrotermal. Esto se refleja en el trabajo desarrollado por Fazel *et al.*, [12], donde se analizaron la influencia que puede tener el tratamiento hidrotermal en aleaciones de titanio, previamente funcionalizado por OEP con HAp. Los resultados presentados en esta investigación muestran una formación de nanocristales de HAp distribuidos homogéneamente a través de la capa porosa de OEP. La resistencia a la corrosión de las muestras con tratamiento hidrotermal con un tiempo mayor de exposición fue significativamente menor que la de los otros grupos expuesto un menor tiempo, esto puede atribuirse a la formación de defectos después de hacer crecer nanocristales de HAp a pilares más grandes y gruesos. Todos estos trabajos utilizaron hidroxiapatita de tipo sintético, con precursores químicos para obtenerla in situ o realizando la adición del compuesto directamente [12].

Finalmente, Florea *et al.*, [7] mencionaron que a pesar de que los científicos han alcanzado resultados prometedores en los últimos años, hacen faltan más investigación para que este tipo de alternativas estén disponibles clínicamente, pues se necesita estudios de experimentación de pruebas in vivos y ensayos clínicos, además de un recubrimiento que pueda ser llevado a escala industrial, diseño adecuado y costo factible, a fin de conducir a una nueva generación de implantes ortopédicos y dentales. En función de lo planteado, surge la necesidad de realizar un trabajo donde se aplique una técnica combinada de recubrimiento como los son OEP e HT, debido a los beneficios que podría presentar en cuanto modificación de superficies con hidroxiapatita, sobre un sustrato de Ti puro. Además de realizar una comparación entre HAp natural y comercial, a través de una evaluación electroquímica en fluido biológico simulado, con el fin de dar un aproximado de la respuesta de los recubrimientos utilizando las diferentes muestras; al igual que verificar si la hidroxiapatita natural puede usarse como la hidroxiapatita sintética en este tipo de aplicación.

1.3 Planteamiento del problema

Las afectaciones y enfermedades óseas que sufre la población se ven incrementada con la edad y, se refleja en estadísticas de fracturas por accidentes o asociadas a enfermedades como la osteoporosis [1]. Solamente en Colombia, al año se reportan 40.000 fracturas de vertebras, 20.000 fracturas de cadera y 12.000 de muñeca [22]. Estas se consideran las fracturas más comunes, lo que en consecuencia genera un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y sus familias, e igualmente se refleja un aumento en el costo de la salud pública. Se estima que, al superar los 50 años, 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres tienen riesgo de sufrir una fractura por osteoporosis en su vida. Además, anualmente se presentan entre 8.000 y 10.000 fracturas de cadera solamente en mujeres de más de 60 años, debido al aumento en el factor de riesgo por osteoporosis y, se conoce que el 36% de las personas mayores de 70 años que padecen una fractura de cadera, mueren en las primeras 6 semanas [2]. Por lo que se han desarrollado diferentes dispositivos que permitan con los años mantener la calidad de vida de las personas [16].

Los reemplazos protéticos más utilizados, para rodilla, cadera y hombro, son en general metales como aceros inoxidable, aleaciones de cobalto, titanio y aleaciones de titanio, etc.; ya que, estas zonas son sometidas a grandes cargas y esfuerzos, en consecuencia, que el primer requerimiento es la resistencia mecánica, además de buenas propiedades de tracción – compresión, tenacidad y ductilidad. En este sentido lo principal sería que las prótesis biológicamente fueran inertes, o sea, que no liberaran sustancias tóxicas al tejido implantado [16]. Estos materiales en su mayoría no tienen ningún tipo de interacción con el tejido, es por esta razón que se busca una mejora de este tipo de materiales en la parte biológica, que sea biocompatible y que permita el desarrollo del tejido óseo en contacto con la prótesis [16].

A partir de la revisión bibliográfica se puede inferir que a pesar de que hay avances en el desarrollo de recubrimiento bioactivos de titanio y aleaciones de titanio, se observa un vacío respecto a las técnicas complementarias de recubrimientos, donde se utilice un material bioactivo como la hidroxiapatita obtenida a partir de una fuente natural. Es por

ello, que esta investigación surge como una posibilidad que conlleva a la identificación de las propiedades de estos recubrimientos, para complementar los estudios previos.

1.4 Pregunta de investigación

Dicho lo anterior, para el desarrollo de esta tesis se pensó en la hipótesis de mejorar el comportamiento bioactivo de recubrimientos realizando una combinación de técnicas de deposición de la hidroxiapatita como biomaterial sobre sustrato de titanio y su posterior evaluación por métodos electroquímicos en presencia de un fluido biológico simulado. Además, se propuso un análisis de los recubrimientos hechos con hidroxiapatita natural e hidroxiapatita sintética, a partir de lo cual se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué influencia electroquímica tiene la incorporación de hidroxiapatita natural obtenida a diferentes temperaturas, en recubrimientos sintetizados mediante la combinación de técnicas de OEP e HT?

Con el fin de dar respuesta a la pregunta anterior, se formuló el objetivo general y los objetivos específicos, lo cuales dieron pie a la construcción de la metodología que fue empleada en este trabajo.

1.5 Objetivo General

Evaluar por métodos electroquímicos los recubrimientos de hidroxiapatita crecidos por ruta hidrotermal sobre semillas de TiO_2 obtenidas por OEP, a partir de HAp producida variando la temperatura de calcinación.

1.5.1 Objetivos Específicos

- Obtener HAp natural a partir de hueso ovino realizando variaciones de temperatura de calcinación.
- Sintetizar recubrimientos de HAp de hueso ovino por ruta hidrotermal sobre semillas de TiO_2 obtenidas por OEP
- Determinar parámetros morfológicos, estructurales y composicionales de las muestras obtenidas.
- Evaluar por métodos electroquímicos los recubrimientos de hidroxiapatita crecidos por ruta hidrotermal sobre semillas de TiO_2 obtenidas por OEP, a partir de HAp producida variando temperatura de calcinación.

1.6 Justificación

Las problemáticas más renuentes que afronta el sector de la salud son específicamente alrededor de las enfermedades y afectaciones óseas, donde en la mayoría de los casos pueden presentarse por la baja absorción de calcio y/u otros minerales fundamentales [1], [2]. Es debido a esto que, se despertó un interés particular por los fosfatos de calcio como biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos, dado que este tipo de materiales deben cumplir con características como: bioactivos, biodegradables, poder ser adsorbidos por el cuerpo humano y biocompatible. Dicho en otras palabras, que estos materiales sean compatibles con las reacciones fisiológicas del hueso huésped y, este tipo de biocerámica cumple con todas estas características mencionadas, excepto con las necesidades asociadas al estrés mecánico.

Los materiales utilizados para recuperación ósea deben poseer también buenas propiedades mecánicas, para soportar los esfuerzos constantes a los que se someten los huesos. En donde, los metales como titanio, aleaciones de titanio, aceros inoxidable, cobalto, etc., presentan una buena resistencia a la fatiga, a la compresión, a la tracción y tenacidad, haciendo de estos metales una opción viable [10], [11]. Sin embargo, pese a que estos materiales son muy utilizados, son químicamente inertes; lo que no permite que interacción con el sistema vivo, ni crecimiento de nuevo hueso. De ahí, que se busque establecer una sinergia entre las propiedades biológicas y mecánicas de las prótesis, por lo que, en este campo de estudio, se observa que se realizan recubrimientos de HAp a los metales que no fueran tóxicos para el cuerpo humano y que tuvieran las propiedades mecánicas adecuadas [12].

La fase mineral de hueso se asocia equivocadamente a la hidroxiapatita estequiométrica, que se conocen por su baja concentración de calcio, mientras que por el contrario esta es más parecida a la hidroxiapatita obtenida de fuentes naturales que presenta excesos de calcio, además de otras trazas de elementos como: sodio, magnesio, potasio y mayor cantidad de grupo carbonato, que son importantes dentro del proceso de regeneración ósea; puesto que la nucleación y el crecimiento de los fosfatos de calcio inmersos en sistemas biológicos siempre ocurren en ambientes ricos en iones, donde se ve una influencia directa en la cinética de cristalización, y en consecuencia, en la estabilidad final de la regeneración. Es por esto, que la tendencia en la actualidad es la obtención de

biocerámicas que contengan una composición química similar a la del hueso [23], para su aplicación en medicina regenerativa, en especial para su aplicación en recubrimiento de prótesis biomédicas, en aras de que los pacientes puedan tener una mejor calidad de vida [23].

CAPÍTULO 2:

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita es una bioceramica de estructura hexagonal que se encuentra naturalmente en los huesos y en el esmalte dental, y adicional se puede encontrar en exoesqueletos como el de la estrella de mar *Mellita sp*, en los corales marinos, en los esqueletos de los vertebrados, etc., pero esta también se puede obtener de formas sintéticas [3], [4]. La HAp está compuesta principalmente de calcio y fosfato, no obstante, la BHAp contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, estos elementos tienen un papel importante en la función regenerado de tejidos óseos [21], [22]. La HAp pura o estequiométrica guarda una relación de Ca/P de 1,667, pero las naturales presentan siempre excesos de calcio muy por encima de este valor [5], [8]. Sin embargo, a pesar de la similitud química con el hueso mineralizado del tejido humano, las propiedades biológicas de la hidroxiapatita sintética difieren significativamente de las del hueso natural. De hecho, la fase mineral del hueso tiene una composición compleja que además de fosfato cálcico comprende iones carbonato, magnesio, sodio, iones hidrogenofosfato y varios otros oligoelementos [4].

Una de las características más destacadas es la posibilidad de participar en sustituciones de manera parcial o completa con cualquiera de sus tres iones constitutivos por iones adsorbidos en la superficie del cristal, incluidos los aniónicos (por ejemplo, F, Cl, SiO_4 y CO_3^{2-}) y / o sustituciones catiónicas (por ejemplo, Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}) [24]. Ya que, la nucleación y el crecimiento de los fosfatos de calcio en sistemas biológicos se producen en un entorno rico en iones. Adicional a esto, las hidroxiapatitas sintéticas, que se obtienen a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos, presentan una pobre resistencia mecánica, poca solubilidad, lo cual no es deseable para utilizarla como biomaterial de sustitución ósea [4].

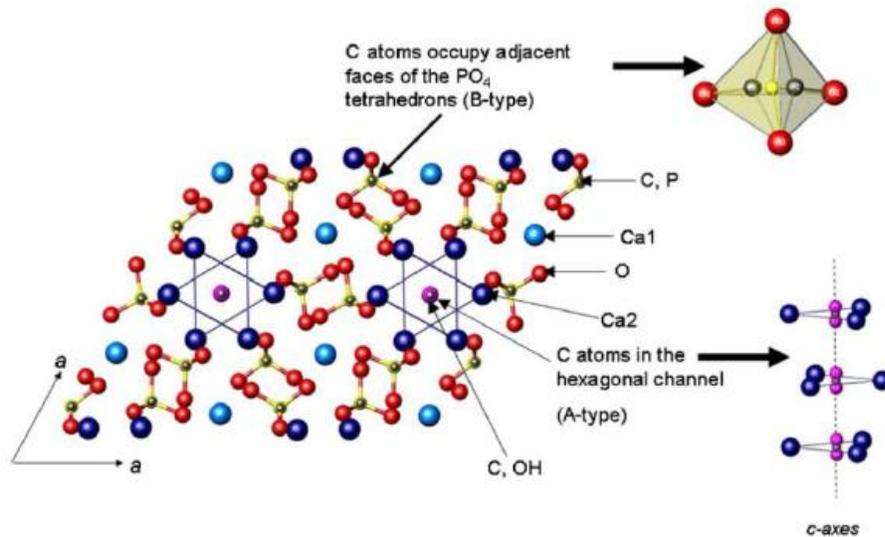


Figura 1. Estructura cristalina de la Hidroxiapatita.

Fuente [25]. Muestra las posibles posiciones de los elementos y grupos funcionales CO_3^{2-} en la dirección C.O-
 Rojos; Ca1- Azul claro; Ca2- Azul oscuro; P Amarillo; OH- Rosa, C- verde.

La HAp presenta varias sustituciones de Ca por K, Mg, Sr, Na y carbonato por fosfato o hidroxilos. Las sustituciones más frecuentes son las del grupo carbonato, y se pueden clasificar de la siguiente forma: Tipo A, iones CO_3^{2-} que pueden ocupar posiciones de OH-, Tipo B, iones CO_3^{2-} que pueden ocupar posiciones de PO_4^{3-} y finalmente, Tipo AB, donde los iones CO_3^{2-} pueden ocupar posiciones de OH- y PO_4^{3-} . Muchas de estas sustituciones juegan roles significativos en las propiedades estructurales y mecánicas del mineral del hueso [4], [19].

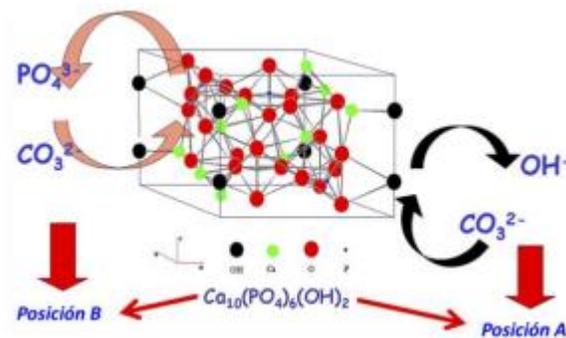


Figura 2. Posibles sustituciones del grupo carbonato en la hidroxiapatita.

Fuente [19]. Sustituciones estructurales tipo a ($\text{PO}_4^{3-} \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$) y tipo b ($\text{OH}^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$).

2.2 Dióxido de titanio

La buena resistencia a la corrosión que presentan las aleaciones de titanio es debido a la formación de películas de óxido superficial que es muy estable, con buena adhesión y protectoras [26]. Está se presenta mayormente en tres formas cristalinas: anatasa, rutilo y brookita. Inducir la formación de una película de óxido estable, hace que se supere las limitaciones de resistencia a la corrosión de las aleaciones de titanio en condiciones normales. Es debido a esto que se presentan una gran cantidad de aplicaciones, de las cuales destacan la actividad fotocatalítica, aplicación en implantes biomédicos, dispositivos fotovoltaicos, aplicaciones en cosméticas, entre muchos otros [27]. En especial es muy recurrente su uso para aplicaciones biomédicas por las propiedades como la resistencia a la corrosión, bioinerte, módulo de elasticidad, resistencia a la fatiga, las cuales hacen que sea un material por predilección escogido contra los aceros y sus aleaciones [28].

2.3 Oxidación electrolítica por plasma

La oxidación electrolítica por plasma (OEP) es un híbrido entre electrólisis convencional y arco de plasma, y es también conocida como oxidación por microarco, Este método se caracteriza por la posibilidad de alcanzar una conversión rápida y sencilla de la superficie metálica, a una temperatura aparente cercana al ambiente [27]. Es un método atractivo debido a la eficiencia económica, el respeto al medio ambiente, la resistencia a la corrosión, la alta dureza, la buena resistencia al desgaste y la excelente fuerza de unión con el sustrato son las otras características de estos recubrimientos [12], [14], como se observa en la figura 2. La OEP se basa en la oxidación anódica convencional de metales o aleaciones en soluciones acuosas con una descarga de plasma, la descarga local conduce a reacciones de alta temperatura, presión y plasma-químicas, mediante los cuales se da la formación del recubrimiento [26].

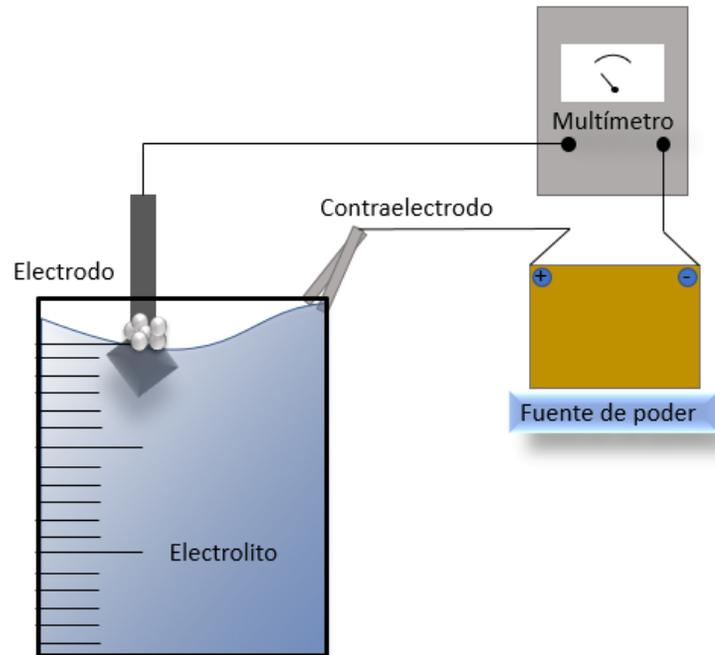


Figura 3. Montaje oxidación electrolítica por plasma.

Fuente: propia

La fuente de alimentación externa está conectada a los dos electrodos que proporcionan la energía necesaria para el proceso de recubrimiento, con una diferencia de potencial suficiente para generar la descarga. El compuesto electrolítico se disocia en aniones y cationes, los aniones derivan hacia el electrodo de trabajo (por ejemplo, Ti, Al, Zr y Mg) mientras los cationes migran hacia el cátodo. En el ánodo, la oxidación de la superficie comienza formando una capa aislante sobre el electrodo de trabajo que provoca una pequeña caída en la corriente aplicada. Con el alto voltaje aplicado, el campo eléctrico entre los electrodos genera una descarga de microarco de plasma en la superficie anódica, convirtiéndola en una fina capa de óxido, sin alterar las propiedades generales del material del sustrato. Además, la composición de la película de óxido puede controlarse ajustando los componentes en el electrolito y la concentración del electrolito [26].

2.4 Ruta hidrotermal

El método solvotermal, es un método que tiene como variable la presión. En este tipo de ruta se realizan diferentes procesos, donde un líquido que se encuentra en un recipiente cerrado puede ser calentado por encima de su punto de ebullición, logrando así una presión superior a la atmosférica. En muchos casos se utiliza agua como solvente, de ahí que se le conozca como síntesis hidrotermal [29], como se observa en la figura 4.

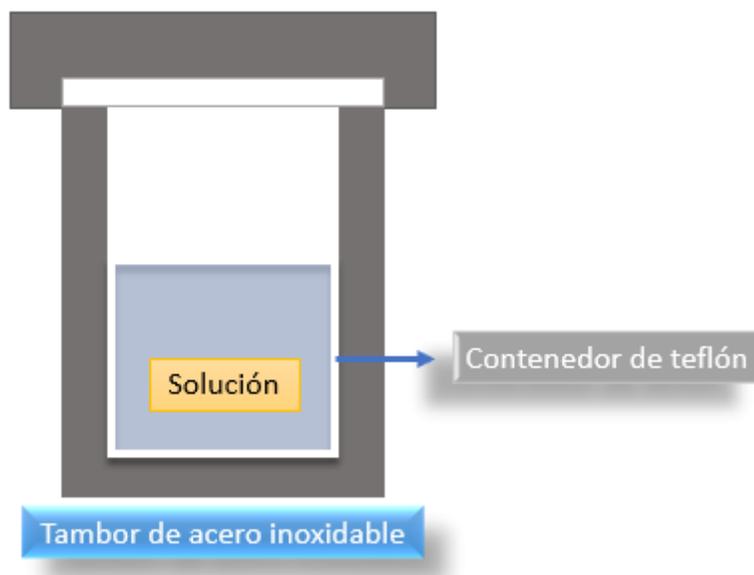


Figura 4. Montaje equipo para ruta hidrotermal.

Fuente: propia

El método hidrotermal ha sido ampliamente aplicado en ciencia y tecnología, con lo que se ha dado el desarrollo de varias técnicas como síntesis hidrotermal, crecimiento hidrotermal, deshidratación hidrotermal, tratamiento hidrotermal, extracción hidrotermal, sinterización hidrotermal, entre otros. En este proceso las reacciones se llevan a cabo a presiones y temperaturas mayores que las condiciones ambientales (25 °C y 1 atm), y tiene como objetivo la disolución de componentes del sistema, para así hacer reaccionar especies de baja solubilidad en condiciones habituales, tales como: sílice, titanatos, cerámicos, sulfuros, entre otros. Algunos de los parámetros importantes en esta síntesis son el orden de adición de los reactivos durante el proceso, tiempo, concentración

de los reactivos, estequiometría, tipo de disolvente utilizado, pH de la solución y temperatura [20], [21], [30].

2.5 Bioactividad

La capacidad que tiene un material de interactuar químicamente con los tejidos (blandos y duros) de un sistema vivo, se le conoce como bioactividad. En ciencia se realizan ensayos de bioactividad in vitro y se considera una herramienta eficaz para observar la posible bioactividad de materiales en organismos vivos, para esto se utiliza un fluido biológico simulado (FBS), el cual posee una composición aproximada a la del plasma sanguíneo [31].

2.6 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

Es un método electroquímico utilizado en estudios de corrosión, donde se usa una señal de corriente alterna, y permite deducir el comportamiento de la interfaz metal – solución, donde se ofrece una visión de los fenómenos corrosivos. En el proceso se aplica una pequeña señal de potencia a un electrodo o metal de corrosión y se mide su respuesta en valores de corriente en un barrido de frecuencias [32]. La evaluación de la estabilidad química de los metales en electrolitos, se pueden considerar como metales activos y no activos. Cuando los metales activos se ven sometidos a este tipo de procesos pueden sufrir corrosión formando una escama que puede ser porosa o protectora, mientras que los no activos, pueden tener una gran estabilidad química, ya que presentan poca activación a la reacción con soluciones ricas en iones. En otras palabras, se puede considerar que la transferencia de carga a través de la capacitancia de la doble capa no puede darse fácilmente debido a la gran resistencia a la misma; así, la transferencia de carga electroquímica puede ser el factor limitante para los sistemas no activos metal-sal fundida. Por otro lado, la reacción de transferencia de carga de metales activos puede ocurrir fácilmente durante la corrosión por sales fundidas, y puede no ser la reacción limitante; en cambio, el transporte de iones en la capa y la difusión de oxidantes en el fundido puede volverse la velocidad limitante del proceso, el cual dependerá, además, de la protección de la capa formada sobre la superficie metálica. Cuando se forman capas porosas sobre la superficie metálica, la corrosión puede ocurrir relativamente a alta

velocidad y en este caso, la transferencia de carga anódica y catódica es rápida y no es la velocidad limitante [33], [34].

La impedancia (Z) se puede expresar de una parte real (Z_{real}) que se traza en el eje X y una parte imaginaria (Z_{imag}) que se traza en el eje Y, lo que forma un gráfico conocido como Nyquist que presenta una forma de semicírculo [32]. Cada punto del gráfico es un valor de impedancia en un punto de frecuencia; las impedancias que se presentan del lado derecho se conducen con bajas frecuencias, mientras que, en la parte izquierda se generan con frecuencias más altas como se observa en la figura 5.

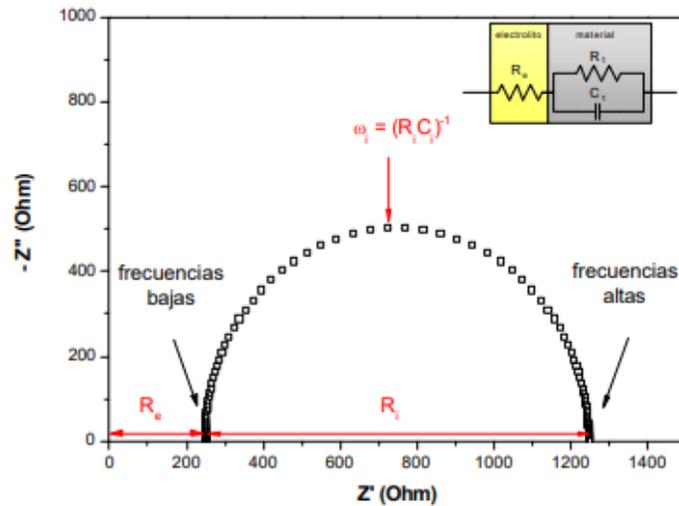


Figura 5. Ejemplo de diagrama de Nyquist.

Fuente [32]. R_e - resistencia del electrolito, R_i - resistencia eléctrica del material, w - impedancia de warburg.

En este tipo de experimentos se tiene un sistema de 3 electrodos, con un voltaje aplicado fijo, donde interactúan la resistencia del electrolito (R_e), la resistencia eléctrica del material (R_i) y la impedancia de warburg (w). la impedancia se mide aplicando una onda de potencial al electrodo de trabajo y registrando la corriente resultante, el espectro se obtiene midiendo los parámetros de impedancia (Z), fase (ϕ), e impedancia imaginaria (Z_{imag}) para ondas potenciales con diferentes frecuencias [32].

2.7 Tafel – Resistencia a la polarización

Cuando el potencial de un metal se hace actuar como un electrodo en una celda electroquímica, se conoce como resistencia a la polarización. Con un electrodo polarizado, puede hacer que la corriente fluya a través de reacciones electroquímicas que ocurre en la superficie del electrodo. La cantidad de corriente está controlada por la cinética de las reacciones y la difusión de los reactivos hacia y desde el electrodo [33].

En celdas donde un electrodo sufre corrosión uniforme en circuito abierto, el potencial de circuito abierto está controlado por el equilibrio entre dos reacciones electroquímicas diferentes. Una de las reacciones genera corriente catódica y la otra corriente anódica. El potencial de circuito abierto termina en el potencial donde las corrientes catódica y anódica son iguales. Se le conoce como un potencial mixto. El valor de la corriente para cualquiera de las reacciones se conoce como corriente de corrosión. El control de potencial mixto también ocurre en celdas donde el electrodo no se corroe. Si bien esta sección analiza las reacciones de corrosión, la modificación de la terminología la hace aplicable también en casos sin corrosión [33], [34].

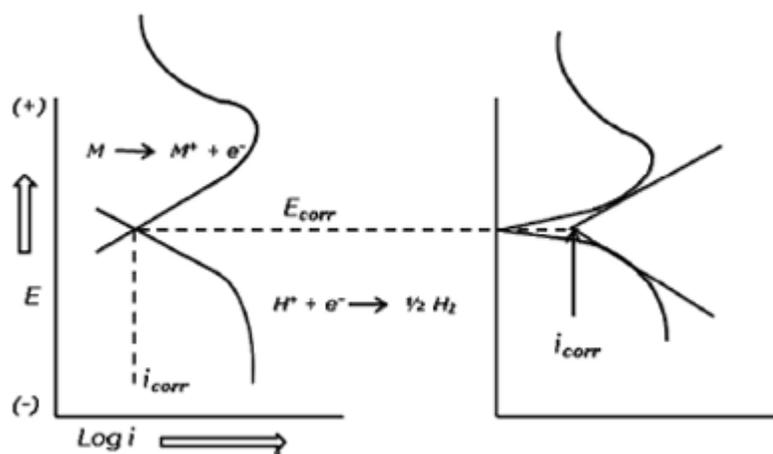


Figura 6. Curva de resistencia a la polarización.

Fuente [35]. i_{corr} – Corriente de corrosión, E_{corr} – Potencial de corrosión, M – metal, E – potencial.

CAPÍTULO 3:

3 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

A continuación, se presenta la metodología llevada a cabo en este trabajo, la cual es una investigación de ciencia básica donde se realizó la obtención hidroxiapatita a partir de hueso de ovejo por ruta de estado sólido variando el parámetro de la temperatura de calcinación. Esta hidroxiapatita empleada para la realización de recubrimiento bioactivos, se combinó una técnica de modificación superficial y una técnica de deposición. Para la modificación superficial la HAp fue incorporarla sobre sustratos de Ti empleando la técnica de OEP (oxidación electrolítica por plasma) y posteriormente las muestras se sometieron a deposición de hidroxiapatita por ruta hidrotermal. Finalmente se analizaron sus características fisicoquímicas y se evaluó de forma preliminar el recubrimiento utilizando técnicas electroquímicas (Tafel y EIS).

3.1 Obtención de Hidroxiapatita a partir de Origen Biogénico

Para la obtención de hidroxiapatita se siguió el protocolo reportado por Forero *et al.*, [36], para lo cual se emplearon 2,00 kg de hueso femoral de ovejo macho de 2 años del mercado del municipio de Marulanda ubicado en el departamento de Caldas. En la primera etapa de este proceso, se cortaron las epífisis (extremos del hueso) dejando solo la diáfisis para trabajar, después se retiró la mayor cantidad de grasa superficial de forma manual (figura 4(a)), y se lavó y cocinó el hueso durante 1 h y 30 minutos en una olla exprés (figura 4(b)). En la segunda etapa, el material resultante se trituró y se sometió a un proceso del lavado convencional con agua destilada; seguidamente, el producto lavado se astillo, hasta lograr un tamaño reducido (figura 4(c)). Estas astillas se adicionaron en un vaso de precipitado con una mezcla de detergente líquido convencional y agua destilada (figura 4(d)), que luego se llevó a un horno microondas con una potencia de 700 W para realizar la separación de los lípidos restantes del

hueso durante 30 minutos, este paso se repite 3 veces cambiando en cada lavada el agua de cocción, se realizó un lavado más solo con agua destilada y, por último, se realizó un proceso de secado en el horno por 30 minutos (figura 4(e)).

En la tercera etapa del proceso, se aplicó un lavado con ácido oxálico al preparado al 1M durante 2 h en baño ultrasónico; después de transcurridas las 2 h, se dejó la solución en reposo por 1 h (figura 4(f)). Este proceso se repitió 2 veces más y posteriormente se lavó el material con agua destilada para luego secarse en el microondas durante 30 minutos. El material obtenido se lleva a un molino de bolas de acero inoxidable 304 en una relación de peso de 1:10 de astillas de hueso y bolas de acero respectivamente, durante 7 días, en un periodo de 8 h/día. El polvo obtenido de la primera molienda se pasa a un molino de bolas tipo cerámico hasta obtener un polvo fino con un grano promedio de $38 \mu\text{m}$ (figura 4(g)), al cual se le realizó un tratamiento térmico variando la temperatura de calcinación entre 600°C , 800°C y 1000°C con velocidad de calentamiento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, manteniendo la temperatura calcinación durante 24 h, como se representa en la figura (h) Para la selección de estas temperaturas se tomó en cuenta lo reportado por [25], ya que a estos rangos de temperatura permiten observar sustituciones de carbono dentro de la estructura de la hidroxiapatita por fosfatos.

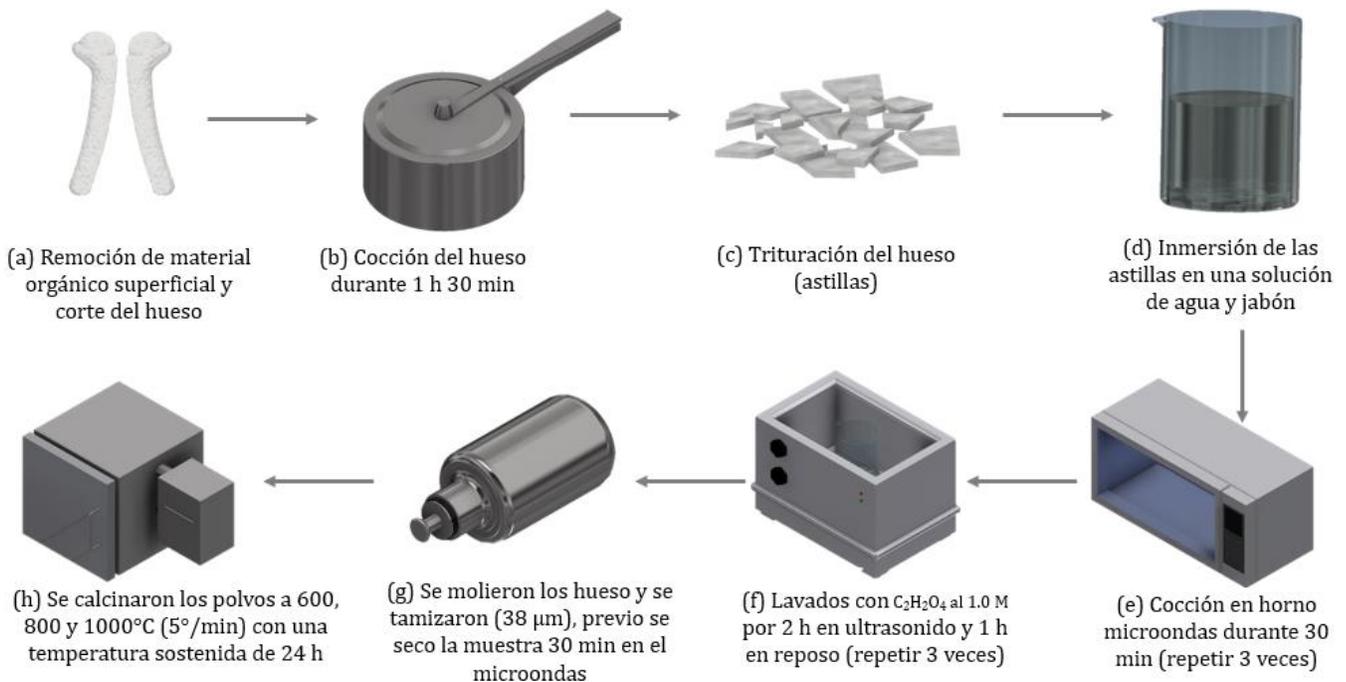


Figura 7. Metodología obtención de hidroxiapatita a partir de fuente natural.

3.2 Síntesis de recubrimientos de Hidroxiapatita de hueso ovino

3.1.1 Preparación de sustrato de Ti

Se empleó sustrato de titanio comercialmente adquirido de tipo ASME-SB-265 de grado 2 de 99% de pureza, se cortó en dimensiones de 20x20x1mm. Para llevar a cabo el proceso de preparación de la superficie, se empieza con un pulido grueso con lijas de granulometría de 240 granos, el cual elimina imperfecciones provenientes del corte; posteriormente, se sube el tamaño de grano hasta un pulido más fino que elimina rayas que se originan en el pulido grueso (240, 360, 400, 600). El desbaste se realizó en una sola dirección hasta que todas las líneas estén paralelas, luego se procede a girar 90° el sustrato y repetir el mismo procedimiento. Seguidamente, se realizó una limpieza de los sustratos mediante una cuba ultrasónica con ayuda de acetona, durante 15 minutos con el fin de eliminar impurezas provenientes de las lijas y la manipulación de este, y finalmente las muestras son secadas. La preparación de los sustratos se realizó siguiendo el procedimiento de Luo *et al.*, [37].

3.1.2 Parámetros del proceso de Oxidación electrolítica por plasma

Previamente al proceso de OEP se realizó la solución en 400 ml de agua destilada con 3,00 g de sulfato de sodio (Na_3PO_4) y 3,00 g de hidroxiapatita para cada una de estas (600 °C, 800 °C, 1000 °C y comercial). La solución se agitó a 700 RPM durante 1 h, posteriormente la solución se llevó a ultrasonido durante 30 min, para la preparación del electrolítico se siguió las recomendaciones de Luo *et al.*, [37]. Posteriormente, para el proceso de OEP se utilizó una fuente conmutada de alimentación de pulsos, con 378 V de tensión máxima de entrada y una tensión operacional de 353 V, frecuencia de 2000 Hz, y ciclo útil de trabajo del 10%; el recubrimiento tuvo un tiempo de duración 7 minutos. La técnica OEP emplea un sistema de

refrigeración compuesto por H₂O/EtOH, y un recipiente tipo cilindro de acero inoxidable (acero quirúrgico) como uno de los electrodos, con el medio electrolítico previamente hecho. La lámina tratada se limpió con agua desionizada durante y se secó con aire caliente. Este proceso se llevó a cabo teniendo como guía Torres *et al.*, [38], y escogiendo 10% como ciclo útil debido a los resultados expuesto de porosidad.

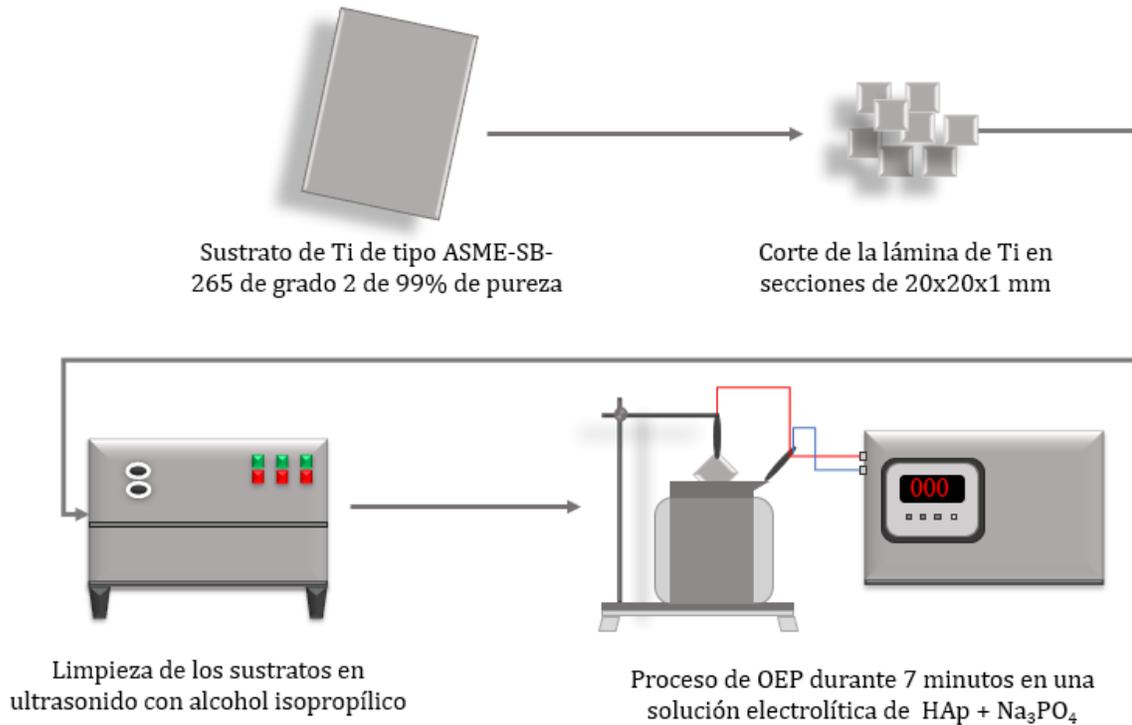


Figura 8. Proceso de oxidación electrolítica por plasma.

Fuente: propia

3.1.3 Crecimiento del recubrimiento por ruta hidrotermal

Para el proceso por ruta hidrotermal se adaptó el protocolo seguido por Fazel *et al.*, [12]. Para esto se preparó una primera disolución de 300 mL de NaOH al 4,00 M. Se tomaron 0,50 g de cada hidroxiapatita de las hidroxiapatitas calcinadas a diferentes temperaturas (600 °C, 800 °C y 1000 °C) y una muestra de hidroxiapatita comercial (Marca *Hydroxylapatite powder captal 30* de la empresa PLASMA BIOTAL). El polvo fue disuelto en 50 mL solución acuosa de NaOH. La mezcla se llevó a la autoclave en un porcentaje de llenado del 50% junto con la probeta de

titanio previamente tratada por OEP. La temperatura de tratamiento fue 180 °C, con un calentamiento de 5 °C/min y la temperatura se sostuvo durante 10 h.

La solución se dejó enfriar toda la noche. La solución fue descartada y la lámina se lavó con agua destilada durante 4 h; finalmente se secaron las láminas a una temperatura de 80 °C durante 24 h. Finalmente las muestras se almacenaron y se caracterizaron de forma fisicoquímica.

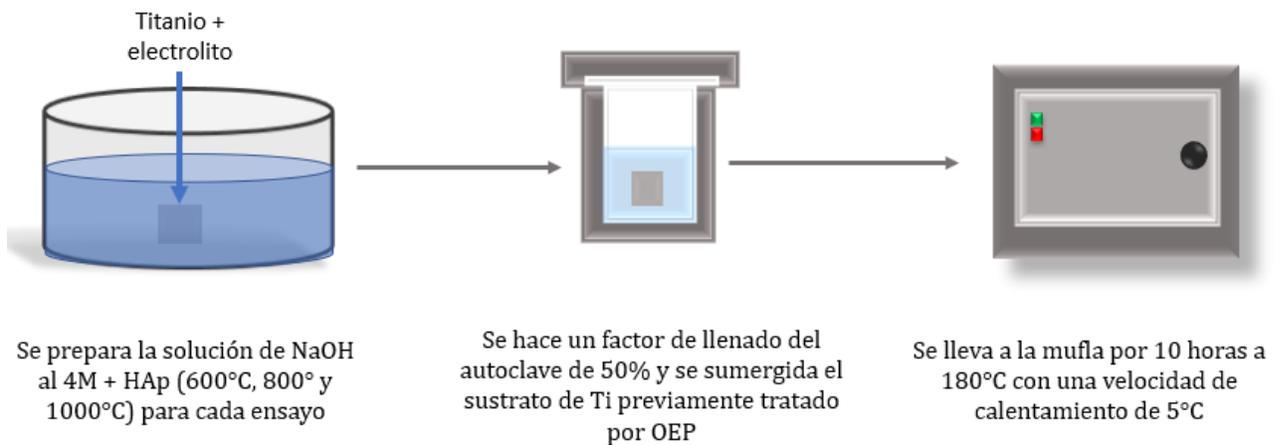


Figura 9. Metodología recubrimiento por ruta hidrotermal.

Fuente: propia

3.1.4 Método de caracterización del polvo de hueso y la hidroxiapatita

El polvo de óseo resultante, después del proceso de molienda se caracterizó térmicamente utilizando un ATG Mettler Toledo del laboratorio de polímeros de la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales, aplicando una velocidad de calentamiento de 5 °C/min hasta alcanzar 950°C en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 60 mL/min. La temperatura de calibración se realizó con un estándar, comenzando por su temperatura Curie. El equipo tiene una resolución de temperatura de 1 °C y una resolución de peso de 0,0001 mg.

La morfología y composición química de los polvos de HAp se observaron usando un microscopio electrónico de barrido SEM Carl Zeiss EVO MA 10 equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X de silicio modelo Oxford Instrument X-act y software INCA suite

v5.05 para análisis EDX, del Laboratorio de Biomateriales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Para la identificación de grupos funcionales se empleó espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FTIR-ATR, utilizando un equipo Alpha Platinum ATR de Bruker del Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.

Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con resolución de 4 cm^{-1} , en un rango de medición de $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ y 100 Scan en modo absorbancia. La caracterización estructural de las muestras se llevó a cabo con un difractómetro de rayos X (DRX) D8 Bruker AXS de la universidad nacional de Colombia sede Manizales, en el Laboratorio de física del plasma, con ánodo de cobre $K\alpha$, longitud de onda $\lambda = 1.5406\text{ \AA}$, voltaje de 30kV y rango de medición de $20^\circ < 2\theta < 80^\circ$, un paso 0.02 de 3s, el equipo de DRX es perteneciente al Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.

3.1.5 Método de evaluación electroquímica de los recubrimientos de hidroxiapatita

3.1.5.1. Fluido biológico simulado (FBS)

Se prepara previamente el fluido biológico simulado (FBS) siguiendo el protocolo reportado por Kokubo *et al.*, [39], donde se prepara una solución final de 1000 mL, para esto se adicionan los reactivos descritos en la tabla 1, la temperatura de la solución se estabiliza y se mantienen $36,5^\circ\text{C}$, tras la adición de cada reactivo. Finalmente, a esta solución se agrega TRIS Buffer, con el cuidado de tener un pH final de 7,40.

Tabla 1. Reactivos necesarios para el fluido biológico simulado

Orden	Reactivos	Cantidad
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	KCl	0.225 g

4	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.231 g
5	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.311 g
6	1M - HCl	ajustar a pH 2
7	$CaCl_2$	0.292 g
8	Na_2SO_4	0.072 g
9	Tris	6.118 g
10	1.0 M - HCl	0-5 mL

3.1.5.2. Evaluación electroquímica por EIS y Tafel

Se usaron 150 mL de la solución de FBS para cada ensayo, con el fin de simular la exposición a plasma sanguíneo. Para esto se usó como electrodo de trabajo las láminas de titanio previamente tratadas con OEP y con OEP+HT, como contraelectrodo una barra de grafito y como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl. La solución se calentó a 36,5 °C, durante todo el ensayo. Para el inicio de la medida, las muestras tuvieron un periodo de estabilización de 10 min, y el tiempo total de inmersión fue de 3 h. Las medidas de EIS se realizaron entre 10^6 y 1.0^{-3} Hz como rango de medición de frecuencia y una amplitud de onda AC de 20 mV. Para las mediciones de resistencia a la polarización Tafel se realizaron en el rango [-250 - 250] mV con un área de exposición de 3,5 cm². Esta evaluación se realizó por triplicado para cada muestra, tanto para las muestras solo tratadas con OEP y OEP e hidrotermal.

CAPÍTULO 4:

4 Resultados y Discusión

Este capítulo se encuentra dividido en cuatro etapas; en la primera etapa se realizó la caracterización del PHO y posterior calcinación a 600 °C, 800 °C y 1000 °C respectivamente, estas muestras fueron caracterizadas por ATG, IR y DRX, los resultados mostraron las características composicionales y morfológicas de la Hidroxiapatita. El termograma del PHO mostró la degradación que sufre este material en un rango de temperatura donde se observan la pérdida de una fase orgánica e inorgánica; en IR se observaron las diferencias composicionales entre la hidroxiapatita y el PHO, que principalmente son los compuestos orgánicos presentes y la sustitución de los carbonatos dentro de la red, lo cual se corrobora con IR y ATG; por otra parte, en DRX se observan los patrones cristalinos de la hidroxiapatita y la definición de los picos conforme aumenta la temperatura, la cual se asocia al cambio de la cristalinidad.

En la segunda etapa, se realizó una modificación superficial de TiO₂/HAp empleando muestras obtenidas en la primera parte y una muestra comercial, estas muestras fueron sintetizadas por la técnica de oxidación electrolítica por plasma y los recubrimientos obtenidos fueron analizados por DRX mostrando la formación de TiO₂ en fase anatasa y los resultados de SEM mostraron una superficie porosa, la cual fue utilizada como semillas para posterior tratamiento.

En la tercera etapa se modificaron los recubrimientos obtenidos por OEP por la ruta hidrotermal, logrando la formación de cristales de HAp con diferentes morfologías entre las muestras obtenidas (Biohidroxiapatita) y la comercial. Finalmente, en la cuarta etapa, se realizó el análisis electroquímico en FBS (fluido biológico simulado) aplicando la técnica EIS y Tafel para el análisis, donde se observó un comportamiento destacado en la muestra de 600 °C que comparación con las demás.

4.1 Caracterización de polvo de hueso e HAp calcinada a 600 °C, 800 °C y 1000 °C.

4.1.1 Análisis Termogravimétrico (ATG):

En la figura 10 se observa el resultado del ATG del polvo de hueso ovino (previo a la calcinación a diferentes temperaturas), en ella se determinó la degradación de los componentes óseos presentes en la muestra. Adicionalmente, la figura muestra las derivadas obtenidas del ATG donde se aprecia puntos altos de pérdida de masa a una temperatura determinada. En este estudio, se evidenció una pérdida de peso total del 45,51%, que comenzó a 48,91 °C y terminó a temperaturas superiores a 856 °C. Este proceso puede describirse en cuatro fases: en la primera, el rango entre la temperatura ambiente y 141,58 °C se atribuye a la evaporación del agua superficial y la unida a la estructura [40], [41].

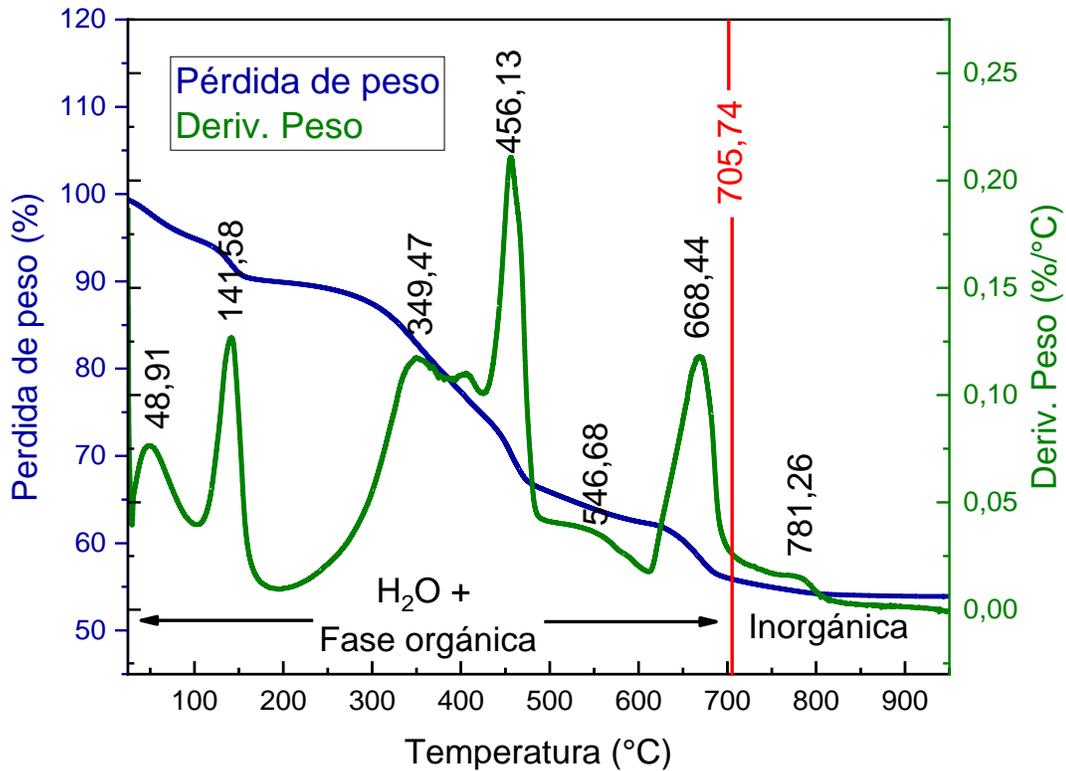


Figura 10. Gráfica ATG del polvo de hueso ovino.

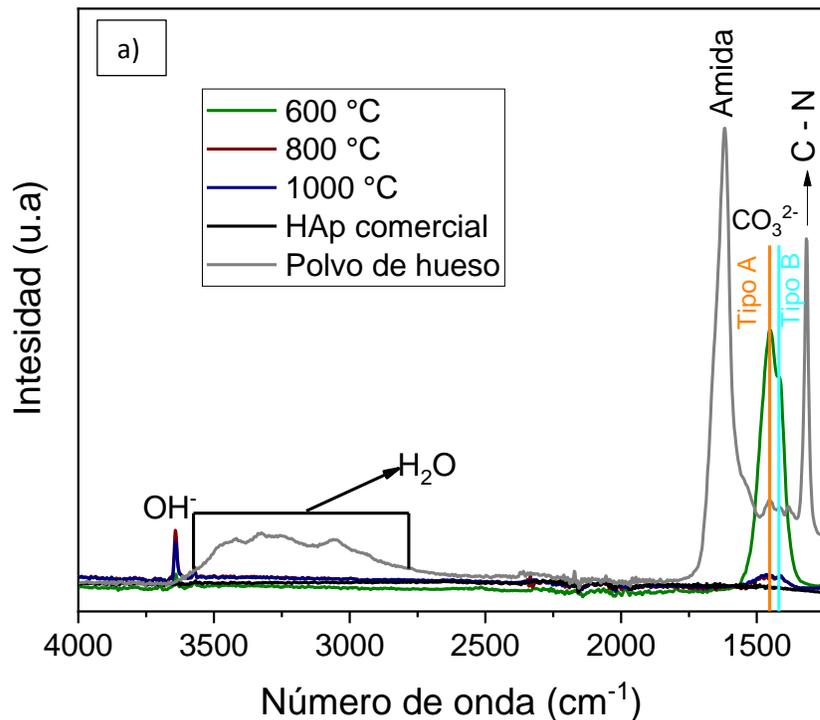
La segunda fase de pérdida de peso, está relacionada con la liberación de agua ligada químicamente y la descomposición de grasas y proteínas, la cual se ubicó entre 141,58 °C y 546,68 °C [40], [42]; en la tercera fase ocurrió en el rango de temperatura 546,68 °C y 668,44 °C que de acuerdo a la literatura se atribuye a la degradación del colágeno [40]–[43]; y la presencia de un máximo local entre 668,44 °C y 926,23 °C puede estar relacionada con cambios en la fase inorgánica de la red de HAp, probablemente asociado a la liberación de carbonato de la matriz [41], [42].

El comportamiento térmico de los polvos de hueso de oveja evaluados estuvo de acuerdo con un estudio informado previamente por Ellingham *et al.*, [40], donde la eliminación de la fase orgánica y el carbonato de la fase inorgánica de los huesos de costilla de oveja se dieron entre 50 °C y 700 °C. Además, también se han reportado resultados similares para Barua *et al.*, [44] en el caso de HAp derivada de la ganadería caprina, donde la fase orgánica de los huesos y el contenido de carbonato de la matriz se eliminaron a 774 °C y se alcanzó la formación de HAp cristalina sin fases secundarias. Además, Ramírez-Gutiérrez *et al.*, [45] documentaron que en

el caso de HAp extraída de huesos de cerdo, se produjo descomposición de la fase orgánica por debajo de 670 °C, y para temperaturas entre 670 °C y 850 °C se evidenció la liberación de carbonato de la red de HAp, dando paso a una recristalización de la fase mineral inducida [46].

4.1.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

En los espectros de FTIR, se aprecian las muestras calcinadas a 600, 800, 1000 °C, comercial y polvo de hueso, respectivamente como se observa en la figura 11(a) y 11(b), donde se hizo una identificación en el rango de 4000 a 450 cm^{-1} , a partir de lo cual se observan los picos asociados a los grupos funcionales presente en la estructura de la hidroxiapatita, es decir, fosfatos PO_4^{3-} , hidroxilos OH^- y carbonatos CO_3^{2-} .



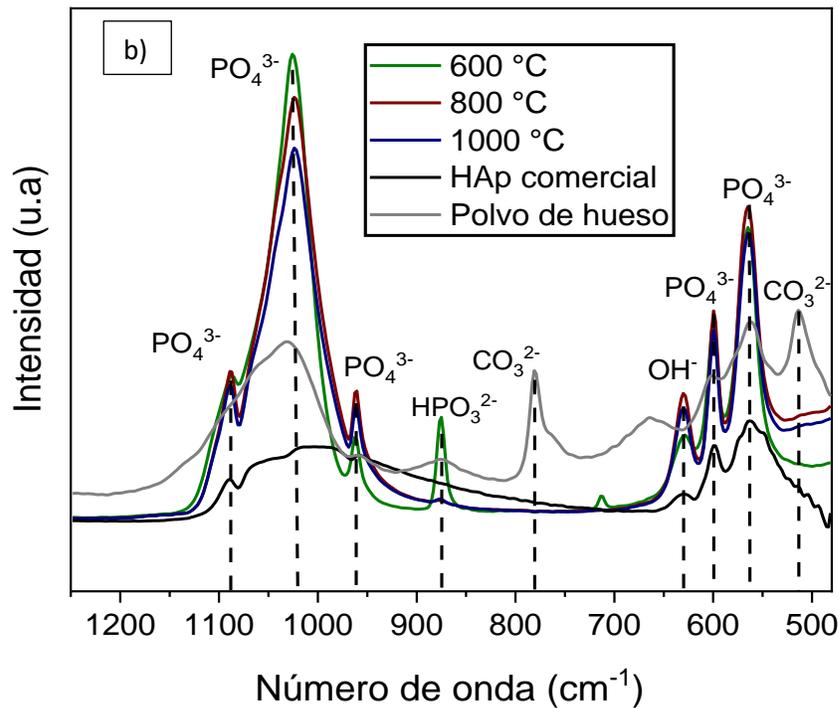


Figura 11. Espectros FTIR de las diferentes hidroxiapatitas a) Rango de 4000 a 1250 cm^{-1} , b) Rango de 1250 a 400 cm^{-1} .

Las bandas características relacionadas con los principales grupos funcionales de HAp están presentes en los espectros de todas las muestras calcinadas. La muestra de PHO exhibe una banda en 3200 cm^{-1} , que es propia de la molécula del H_2O y esta genera puentes de hidrógeno, los cuales tienen vibraciones similares a la molécula del H_2O produciendo un ensanchamiento de la banda y es característica de humedad y agua ligada [41], [47]. Esta banda tiende a desaparecer de los demás espectros conforme aumenta la temperatura de calentamiento generando un corrimiento de esta hacia los 3640 cm^{-1} de estiramiento asimétrico OH^- como se observa en las muestras con calentamiento a 600 °C, 800 °C y 1000 °C [41], [43], [47]. Adicionalmente, el PHO presenta una banda en 1615 cm^{-1} y en 1315 cm^{-1} , asociada a la amida I y al enlace C-N como lo reporta Berzina *et al.*, [48], correspondientes al material orgánico presente en para ese momento. En la misma región de 4000 a 1250 cm^{-1} , la muestra calcinada a 600 °C muestra un doblete del grupo carbonato en 1450 y 1415 cm^{-1} tipo a y tipo b, el cual se pierde para las siguientes muestras calcinadas (800 °C y 1000 °C) congruente con lo observado y expuesto en los análisis ATG.

La hidroxiapatita de tipo biológico generalmente tiene excesos de calcio, además de otros iones en menor cantidad como Mg^+ , Na^+ , K^+ , etc.; debido a esas características puede presentar diferentes sustituciones en la red [24]. En el caso, de las sustituciones más comunes que se pueden presentar dentro de la hidroxiapatita, surgen con el grupo carbonato; donde se hallan dos posibles tipos de sustitución: (1) sustitución directa de OH^- con CO_3^{2-} (sustitución de tipo A ($CO_3^{2-} \leftrightarrow 2OH^-$)). Y la (2) corresponde a una (sustitución de tipo B) en donde hay una necesidad de compensación de cargas, PO_4^{3-} en la que se sustituye un grupo tetraédrico con CO_3^{2-} [4], [49]. Los grupos de sustitución pueden provocar cambios característicos en los parámetros de la red, la cristalinidad, la simetría de los cristales, la estabilidad térmica, la morfología y la solubilidad, física, química y biológica [49].

Para el PHO y las muestras calcinadas a 600 °C, 800 °C y 1000 °C en la región de 1250 a 400 cm^{-1} , se muestran las bandas características de las vibraciones moleculares de la HAp. En la caracterización se identificó una vibración de los picos correspondientes al ion fosfato PO_4^{3-} ubicado en dos regiones, en la primera se encontraron 3 picos alrededor de los 1000 cm^{-1} , que son 1089; 1025 y 960 cm^{-1} , donde el pico de 1025,84 cm^{-1} presenta una intensidad mayor para la HAp calcinada a 600 °C; la siguiente región está cerca de los 600 cm^{-1} , y los picos encontrados son 632; 599 y 564 cm^{-1} , los cuales presentan mayor intensidad en la HAp de 800 °C. Por último, se encuentra un pico cerca de 469,1 y 874,9 cm^{-1} en la HAp de 600 °C, que no muestra presencia en la HAp de 800 °C y 1000 °C asociado a la pérdida de carbonatos por temperatura entre 670 °C y 850 °C como lo reflejan los resultados ATG.

4.1.3 Difracción de rayos X (DRX)

En la figura 12 se presentan los patrones de difracción de rayos X de las muestras de PHO e hidroxiapatitas calcinadas a 600 °C, 800 °C, 1000 °C y la muestra comercial. La identificación de los patrones de difracción se realizó utilizando los patrones estándar de la hidroxiapatita (PDF (HA: ICDD PEF 00-009-0432)). En los difractogramas se observan que todos los picos identificados a partir de los espectros concuerdan bien con el patrón característico de HAp, exceptuando a la muestra de PHO. Dentro de los índices de Miller (hkl) principales de la hidroxiapatita se encuentran: (002), (210), (211), (112), (300), (202), (310), (222), (213), (004) y (304), como se observan en la figura 12, donde se evidencia que el de mayor intensidad

es el (211) como se observa en la figura 13(a) para la muestra calcinada a [50]. Los difractogramas de las muestras calcinadas y comercial evidencian mejor cristalinidad comparada con la muestra PHO, ya que, este polvo presenta un patrón amorfo posiblemente por la presencia de materia orgánica y humedad como se evidenció en los análisis termogravimétricos y los IR (ver figura 10 y 11). La hidroxiapatita comercial y natural comparten los picos representativos, a excepción de los marcados en 37,38° y 53,88° pues esto solo se presentan en la HAp natural y están asociados al CaO (Oxido de Calcio), esto debido a su característica biogénica, como lo reporta Ungureano, *et al.*, [8].

Se calcularon los porcentajes de cristalinidad obteniendo así valores de 60,05 %, 88,77 %, 87,24 % y 83,06 % para las muestras calcinadas a 600 °C, 800 °C, 1000 °C y comercial, respectivamente, como lo reporta Alshemary *et al.*, [51], [52], de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$1 - \left(\frac{V_{I_{112}}}{I_{300}} \right) * 100 \quad (1)$$

Estos resultados son coherentes con el cambio que presentan los picos de las muestras a medida que se aumenta la temperatura; para el cambio de 600°C a 800 °C, se presenta un aumento en la intensidad y una disminución en la anchura de estos, lo que indica una mejora de la cristalinidad, asociada a la pérdida de la parte orgánica que pertenece al polvo de hueso [6]. Al aumentar la temperatura hasta 1000 °C se nota una disminución en la intensidad de los picos respecto a la muestra de 800 °C, Este ocurre, ya que, para las muestras calcinadas por encima de 800 °C, se presenta el fenómeno de la coalescencia; lo que significa una reducción de la cristalinidad, además de un cambio en los tamaños de cristalito, como lo reporta Londoño *et al.*, [43]. Este mismo comportamiento se observa para la muestra de HAp comercial debido a que en el reporte de la ficha técnica muestra que la temperatura de sinterización de esta muestra es a los 1250°C, por lo que se presenta el mismo fenómeno que para la muestra de 1000°C.

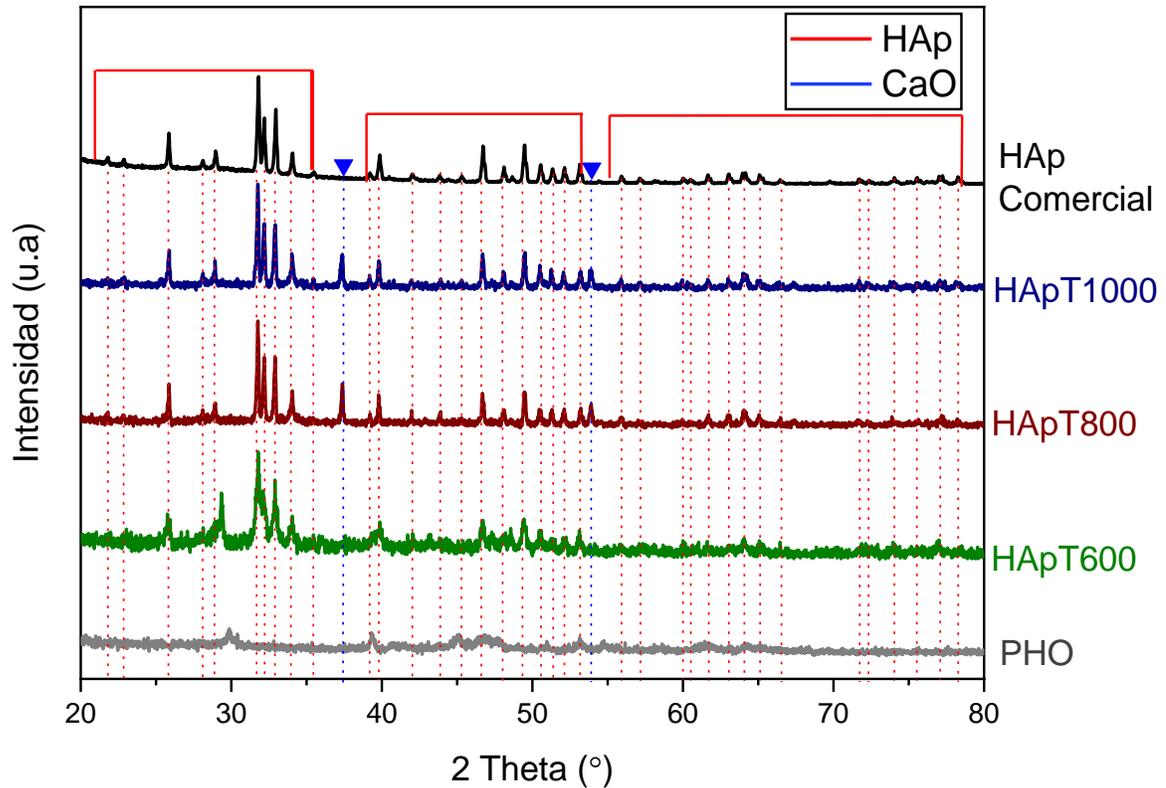


Figura 12. Difractogramas de las HAp calcinadas a 600°C, 800°C, 1000°C y comercial.

Con el fin de determinar el efecto de la temperatura de calcinación en el tamaño de cristalito de la hidroxiapatita (calcinadas y comercial), se determinó el FWHM (siglas del inglés: full-width at half-maximum) empleando una función *Lorentz* en el pico orientado (211) ubicado en 31.79° en 2 theta de acuerdo con lo reportado por Londoño *et al.*, [43]. En la figura 13(a) se muestra el ajuste para la muestra calcinada a 800 °C y de esta manera se realizó para las demás muestras. En la figura 13(b) se muestra la relación entre el FWHM y la temperatura de calcinación para las muestras de 600 °C, 800 °C, 1000 °C y la muestra comercial, donde se aprecia que los resultados no tienen una relación lineal en función de la temperatura. En la gráfica se observa que a mayor temperatura el FWHM disminuye, como se observa en el cambio de 600 °C a 800 °C esto se da como consecuencia del incremento en la temperatura que la eliminación de residuos orgánicos de la muestra [43]. En el caso de muestra de 1000 °C el cambio no es significativo comparada con la muestra de 800 °C, a pesar de esto se observa un pequeño aumento. En ese sentido, el ensanchamiento de los picos obedece a la dispersión elástica e inelástica generada por los cristales de BHAp y a la presencia de cristales de tipo

nanométricos [53]. Para el caso de la muestra comercial de acuerdo con la ficha esta fue calcinada a 1250 °C por un tiempo de 4 horas.

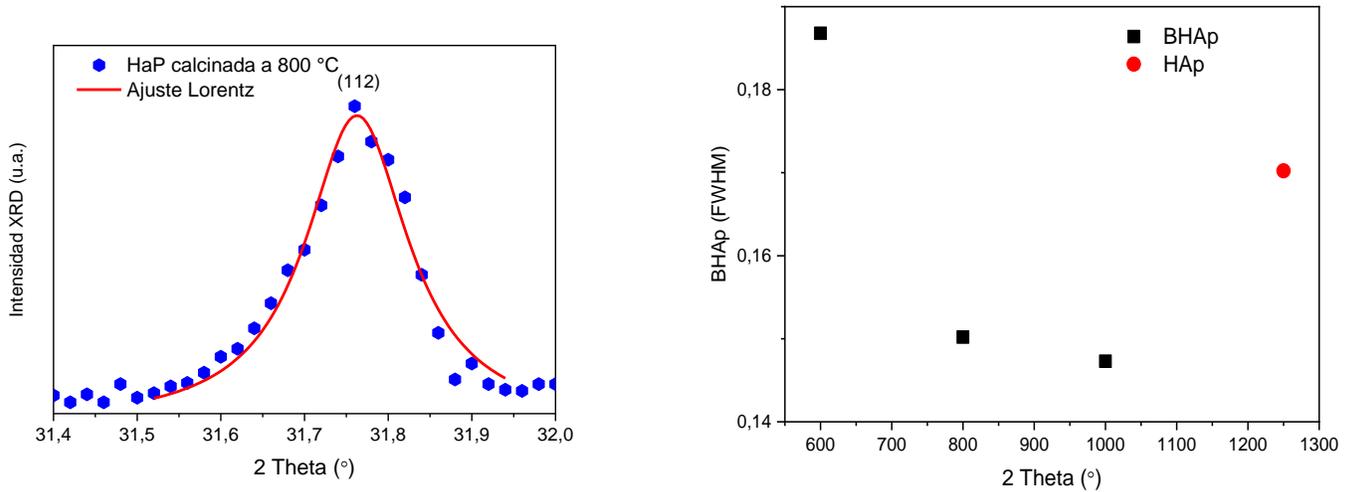


Figura 13. a) Ajuste Lorentz para muestra calcinada a 800 °C y b) relación entre el FWHM y la temperatura de calcinación de HAp (600 °C, 800 °C y 1000 °C) y comercial.

Para hallar el tamaño de cristalito se usó la ecuación de Scherrer [51]:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (2)$$

Donde:

D es el tamaño del cristal

k es la constante de Scherrer depende de la forma del cristalito

λ es la longitud de onda de la fuente de emisión de rayos X

β es la anchura a media altura del pico

θ es el ángulo de Bragg de la reflexión evaluada

Y teniendo en cuenta que el parámetro de tamaño de cristalito es un valor inverso al valor del FWHM, se conoce que para valores con un FWHM alto, el tamaño de cristalito será bajo, como se puede observar en la tabla 2. A partir de esto, se observa un cambio inicial respecto al tiempo

con el tamaño de cristalito, hasta la temperatura de 1000 °C, donde el valor del cristalito es muy cercano al de la temperatura de 800°C. Por otro lado, la muestra de hidroxiapatita comercial se sale de la tendencia presenta un valor cercano a la hidroxiapatita de 600 °C, acorde con lo que se reporta en la literatura, sobre las temperaturas superiores a 900 °C, se presenta coalescencia en las muestras [43].

Tabla 2. Parámetros de red y cristalinidad de muestras de 600, 800, 1000 y comercial.

Temperatura de tratamiento (°C)	Cristalinidad (%)	Tamaño de cristalito (nm)
600°C	60,05%	48,50
800°C	88,77%	55,33
1000°C	87,24%	56,63
Comercial	83,06%	52,65

4.1.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) – Energía dispersiva de Rayos X

Para determinar los cambios morfológicos y la composición elemental de las muestras de BHAp en función de la temperatura del tratamiento térmico, se realizaron análisis MEB-EDX, tanto al polvo de hueso como a los polvos de HAp (600 °C, 800 °C y 1000 °C) como se puede observar a continuación en las figuras 14, 15, 16 y 17, respectivamente. A partir de la figura 14 se puede observar las micrografías del PHO, donde se aprecia que el polvo no tiene una morfología regular.

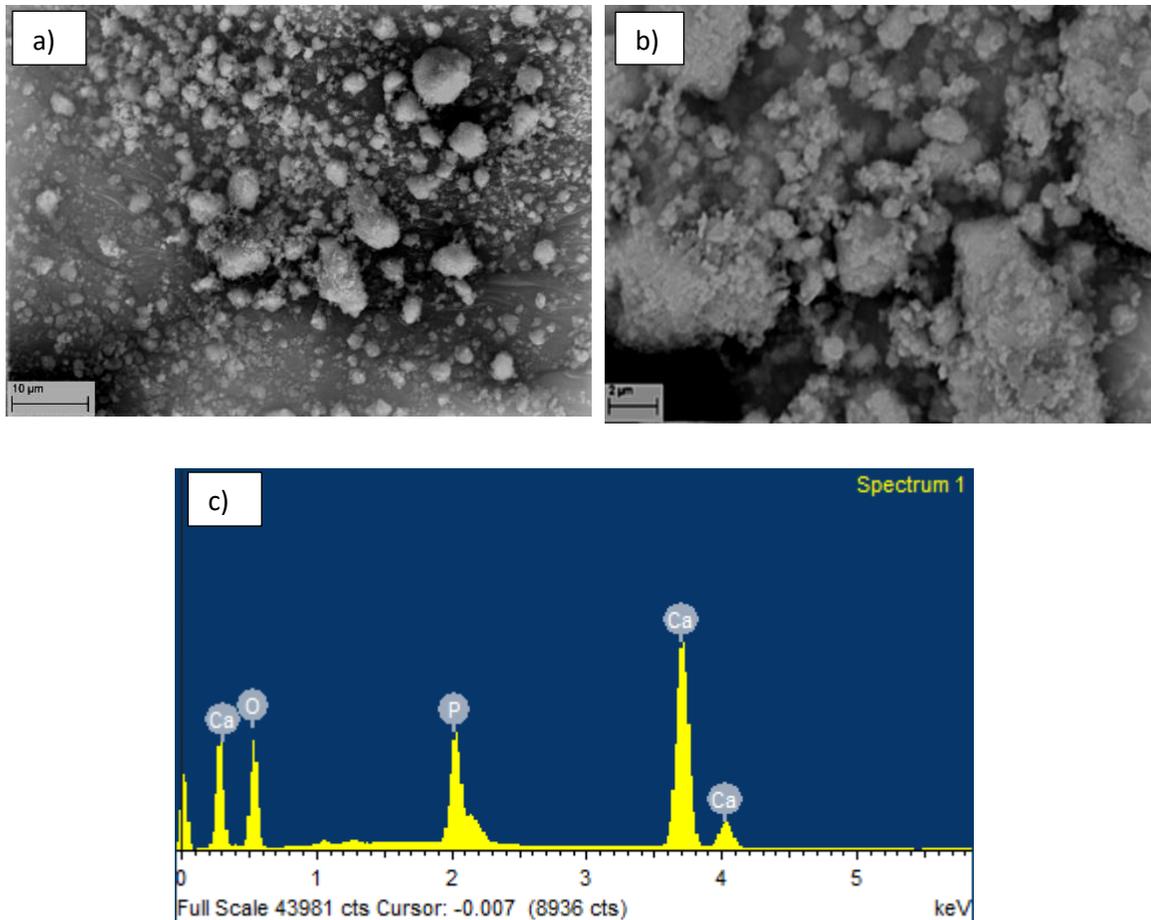


Figura 14. Micrografías MEB del polvo de hueso ovino a) Magnificación 10 μm , b) Magnificación 2 μm y c) espectro EDX elemental del PHO.

A partir del análisis elemental solo se observa la identificación de O, Ca, P, como se observa en el espectro EDX para el PHO. Además, se obtuvieron los valores de los porcentajes del peso de los elementos, estos se tomaron en 3 puntos diferentes de la muestra, y se calculó la relación del Ca/P.

La caracterización morfológica de las muestras calcinadas a 600 $^{\circ}\text{C}$, 800 $^{\circ}\text{C}$ y 1000 $^{\circ}\text{C}$ se puede observar en las figuras 15, 16 y 17, con sus respectivos espectros de EDX donde se ve el análisis elemental. Se puede apreciar que desde las muestras tratadas a 600 $^{\circ}\text{C}$ se ven partículas con formas más definidas, a pesar de esto se exhibe la presencia de porosidad interconectada que constituye la fase orgánica. Para las muestras 800 $^{\circ}\text{C}$ según los análisis de ATG se eliminó el total de la grasa y proteína presente en la muestra, en este punto las partículas comienzan a tomar una forma semiesférica y se interconectan [43], [45]. Cuando la temperatura sube hasta 1000 $^{\circ}\text{C}$ se observa la formación de agregados de policristales, a estas temperaturas la

porosidad no corresponde a la del hueso, sino que se debe a la formación de cúmulos. Estos cúmulos formados por la temperatura a la que se somete la HAp se fusionan para formar partículas individuales y exhiben algunos hábitos de crecimiento. La coalescencia de las partículas produce un solo cristal de HAp como reportan Londoño *et al.*, [43], estas partículas presentan una estructura hexagonal característica de HAp. Aquí, también es evidente que debido a la coalescencia de la BHAp policristalina, la porosidad corresponde a los espacios intercristalinos [42].

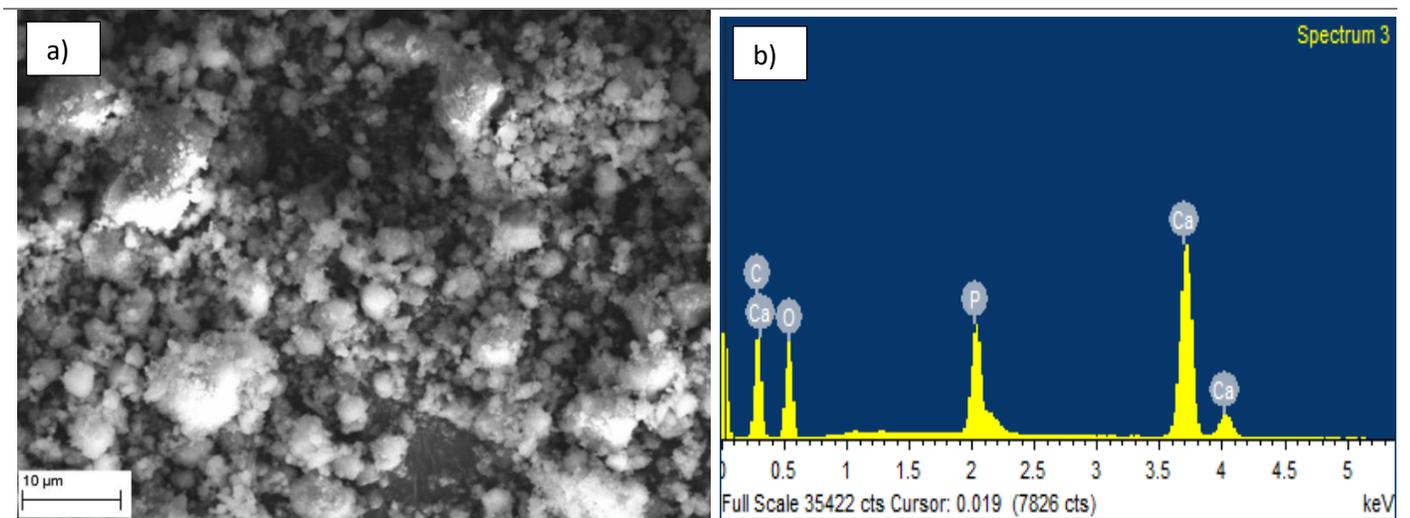


Figura 15. HAp calcinada a 600°C a) Micrografías MEB, b) Espectro EDX elemental.

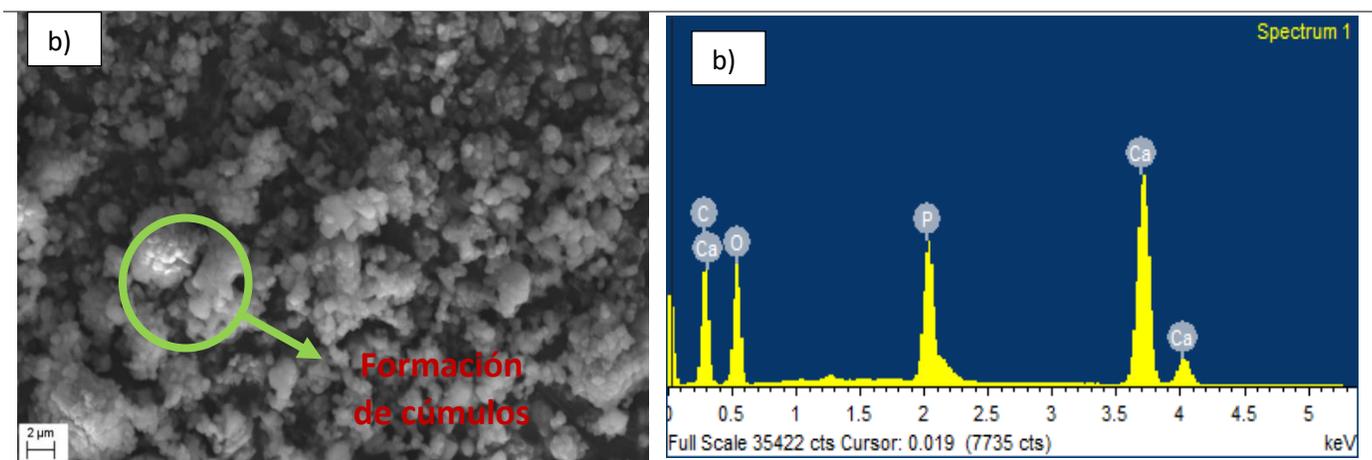


Figura 16. HAp calcinada a 800°C a) Micrografías MEB, b) Espectro EDX elemental.

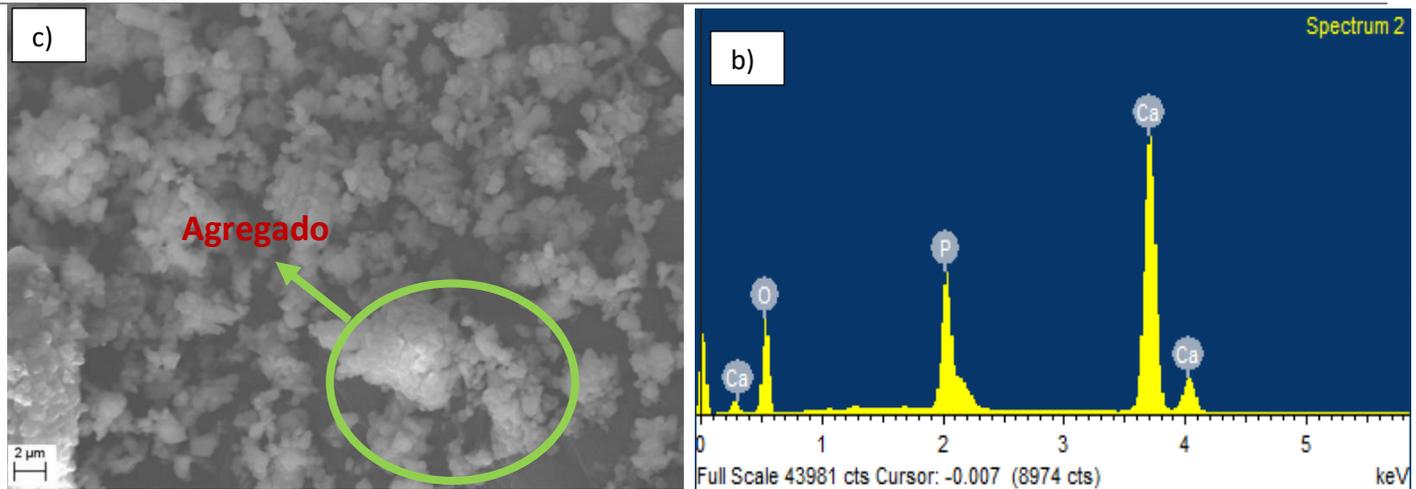


Figura 17. HAp calcinada a 1000°C a) Micrografías MEB, b) Espectro EDX elemental.

En el análisis composicional hecho a partir por EDX, se refleja que para las muestras de 600 °C y 800°C se ve presencia de carbono, el cual se pierde en la muestra de 1000 °C, asociado a la pérdida de carbono que se da entre 600 °C y 800 °C, como se estudió anteriormente en el análisis ATG. Con este tratamiento térmico se da la aparición de poros, y, además, se elimina el agua y fases orgánicas como colágeno, proteínas, polisacáridos y lípidos una morfología porosa es favorable para aplicaciones ortopédicas permite la proliferación celular y la unión, como reportó Niakan *et al.*, [41].

A partir de los datos elementales obtenidos se realizó la tabla 4 donde se muestra la relación Ca/P para las 5 muestras, donde se ve una disminución entre la muestra de PHO, 600 °C y 800°C, pero en la muestra de 1000 °C nuevamente este valor aumenta. La muestra 600 °C a pesar de haber recibido una energía térmica muestra una relación Ca/P alta en comparación con la relación estequiométrica, pero se mantiene en el rango de hidroxiapatita biológica. Por otra parte, la muestra de 800 °C es la más cercana a la estequiométrica, pero de igual forma la relación está en el rango de HAp biológica; y para la muestra de 1000 °C se ve un incremento en la relación Ca/P asociado al aumento del calcio en la muestra, que se puede atribuir a la pérdida de los iones del grupo hidroxilo (OH⁻) o deshidroxilación de la hidroxiapatita, debido a la descomposición de la HAp en otro tipo de fosfatos tricálcicos (FTC) [30], [53]–[56].

Tabla 3. Relación Ca/P de las hidroxiapatitas calcinadas (600 °C, 800 °C y 1000 °C) y la comercial.

Muestra	Ca/P
PHO	2,41 ±0,25
600 °C	1,89±0,22
800 °C	1,76±0,09
1000 °C	2,24±0,11
Comercial	1,67±0,02

Una vez realizada la primera parte sobre la caracterización de la BHAp, se procedió a utilizar los polvos de HAp a 600 °C, 800 °C y 1000 °C y una muestra comercial de Hydroxylapatite powder capital 30 de la empresa PLASMA BIOTAL para la formación de semillas de HAp sobre recubrimientos de TiO₂.

4.2 Caracterización de la modificación superficial por OEP - TiO₂/HAp

4.2.1 Difracción de rayos X (DRX)

A partir de los resultados de difracción de rayos X que se presentan en la figura 19, se observa la fase en la que se encuentra el material en la superficie de la placa de Ti después del tratamiento por OEP con un ciclo útil de 10%. Para el blanco de titanio se observan los planos (100), (002), (101) y (102) los cuales están asociados al Titanio, y estos fueron comparados con los PDF del titanio (TI: ICDD PDF 00-044-1294); y para las muestras tratadas con OEP se presentan los planos asociados a Ti y adicionalmente, el plano (101) correspondiente a la fase de anatasa, esto como lo reporta Torres *et al.*, [27], donde a ciclos de trabajo bajos solo se alcanza la formación de anatasa en la superficie del titanio.

En las diferentes muestras se observa los planos característicos del Ti y un pico característico se relaciona con la formación de TiO_2 fase anatasa en la superficie, en un ángulo de $25,4^\circ$. A partir de esto se puede inferir que en el electrolito y la muestra no se presentaron temperaturas superiores a 400°C debido a que no se presenta formación de rutilo en la superficie para este tratamiento [57], [58]–[60]. En ese mismo sentido, los picos asociados a la HAp no se observan en los difractogramas, ya que, por debajo de 400°C la hidroxiapatita no tiene la energía suficiente para recrystalizar [34], [58], [59], [61], [62], como se esquematiza en la figura 18.

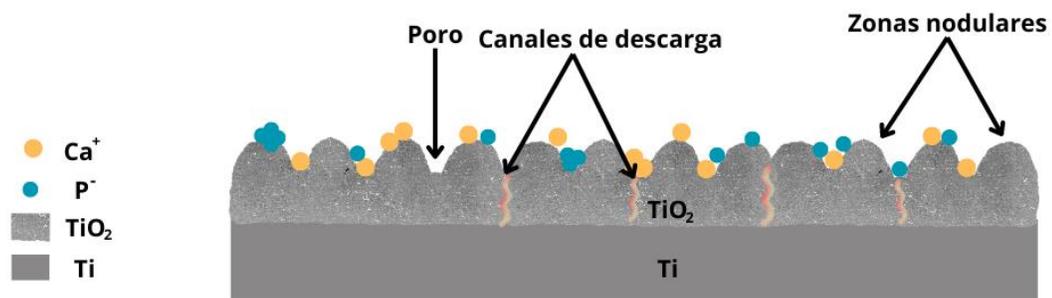
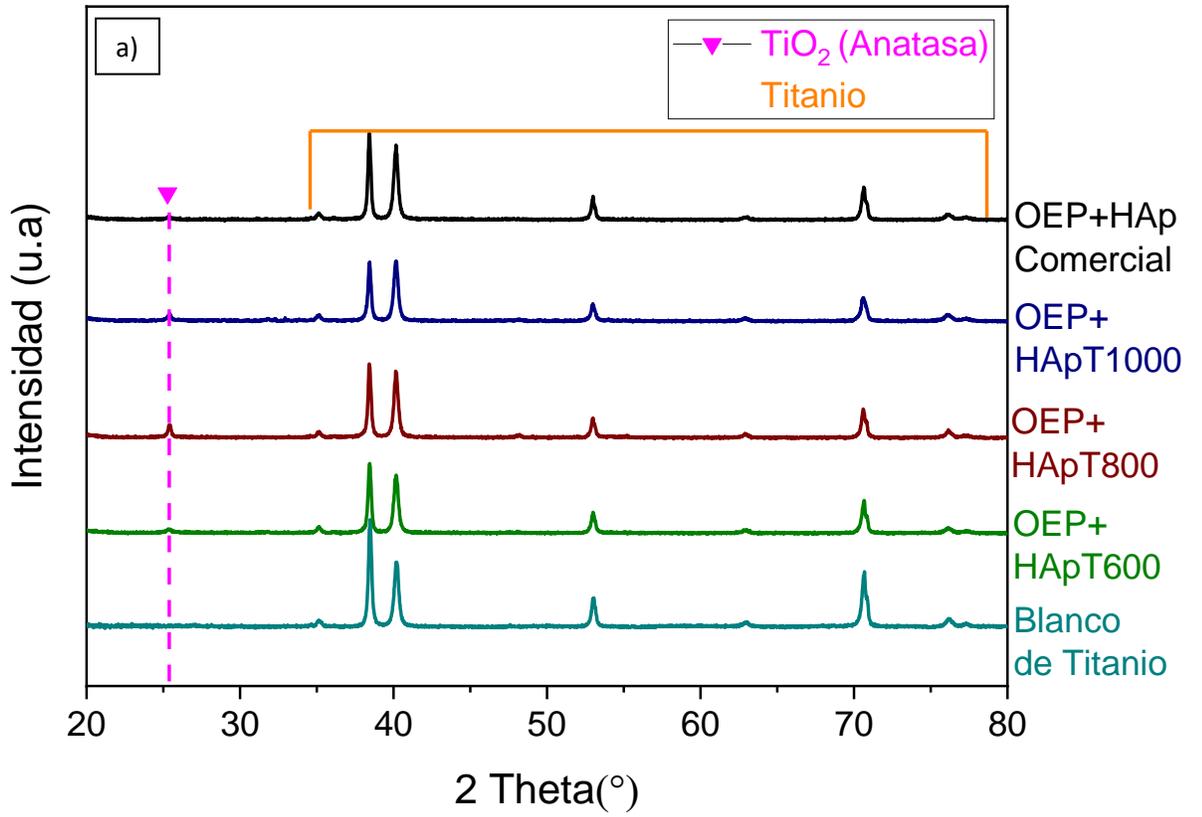


Figura 18. Esquema de la disposición de los iones de calcio y fosforo en la superficie del sustrato de Ti.

El plano (101) correspondiente a la fase anatasa presenta una mayor intensidad en las muestras de 800°C con respecto a las demás. Este fenómeno puede atribuirse a las diferencias en las estructuras cristalinas residuos orgánicos y composiciones químicas que presentan cada una de las muestras de HAp debido a las diferentes temperaturas de calcinación. Se ha demostrado que la temperatura de calcinación de la hidroxiapatita puede aumentar su calidad entre temperaturas de $750\text{--}900^\circ\text{C}$ [43]. Así mismo, también se presentan cambios en la cristalinidad y pureza de la hidroxiapatita, lo que a su vez puede mejorar la reactividad y la uniformidad de la formación de TiO_2 sobre la superficie del sustrato de Ti [38], [57], [63]–[66][58]–[62], [67], [68].



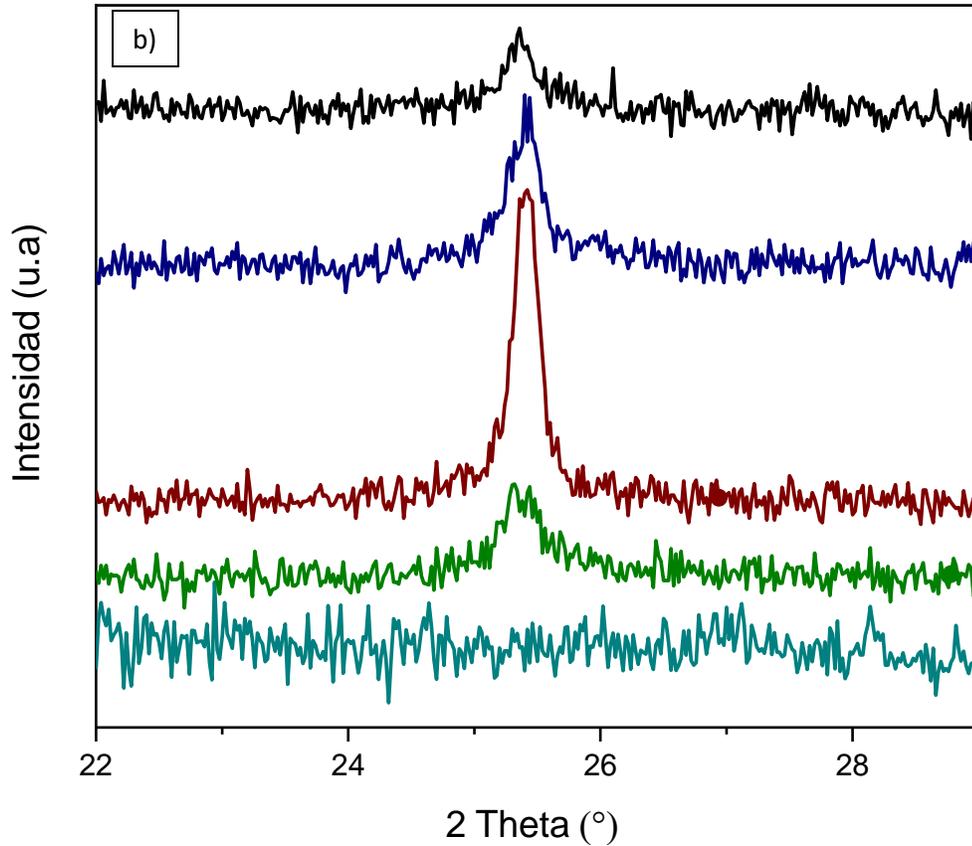


Figura 19. a) Difractograma de blanco de Ti y de las láminas de Ti con tratamiento de OEP, HApT600, HApT800, HApT1000, HAp comercial. b) Plano (101) de anatasa para las muestras de HApT600, HApT800, HApT1000 e HAp comercial.

Como se analizó en la figura 19 las muestras procesadas por OEP, contenían principalmente anatasa (TiO_2), acompañado de picos del sustrato de Ti; sin embargo, después del tratamiento hidrotermal se pudo apreciar picos referentes al crecimiento superficial ordenado de la hidroxiapatita, formación de rutilo y picos asociados al sustrato Ti como se ve en la figura 20. Se observa la recristalización de la HAp, como se esquematiza en la figura 21, por lo que se muestran picos intensos y definidos para las muestras de 800 °C, 1000 °C y comercial, debido a su buena cristalinidad previa. En el caso de la de 600 °C la hidroxiapatita, presenta algunos residuos de material orgánico y algunos iones como Mg, Na, K y carbonatos [69], [70]. Esto debido a que, la microestructura resultante de la HAp, cristalinidad aglomeración, estequiometría y sustituciones, están influenciado por la calidad del polvo de hidroxiapatita utilizado para el experimento HT, como lo reporta Ruffini *et al.*, [30]. Además, el proceso

hidrotermal permite la modificación de la morfología superficial asociado a la elección de factores como, concentración de reactivos y muestra, saturación de la solución, temperatura, pH, tiempo del proceso y la presencia de algún agente potencializante para controlar el resultado final [71].

Se observó, además que, para las muestras, después del proceso de hidrotermal no se aprecia la fase de anatasa en ninguna de estas, sino que, se presenta una nueva fase rutilo, este fenómeno necesita temperaturas superiores a 600°C y presiones superiores a un 1 GPa. Pero debido a las condiciones del proceso hidrotermal, en el que se cuenta con una presión elevada, una temperatura superior a 100 °C y la solución de interés, se consiguió el cambio de fase; debido a que la fase de rutilo necesita tiempo de exposición más de 2 h, temperatura superior a 100°C y medios agresivos para comenzar su formación [66], [69]–[71].

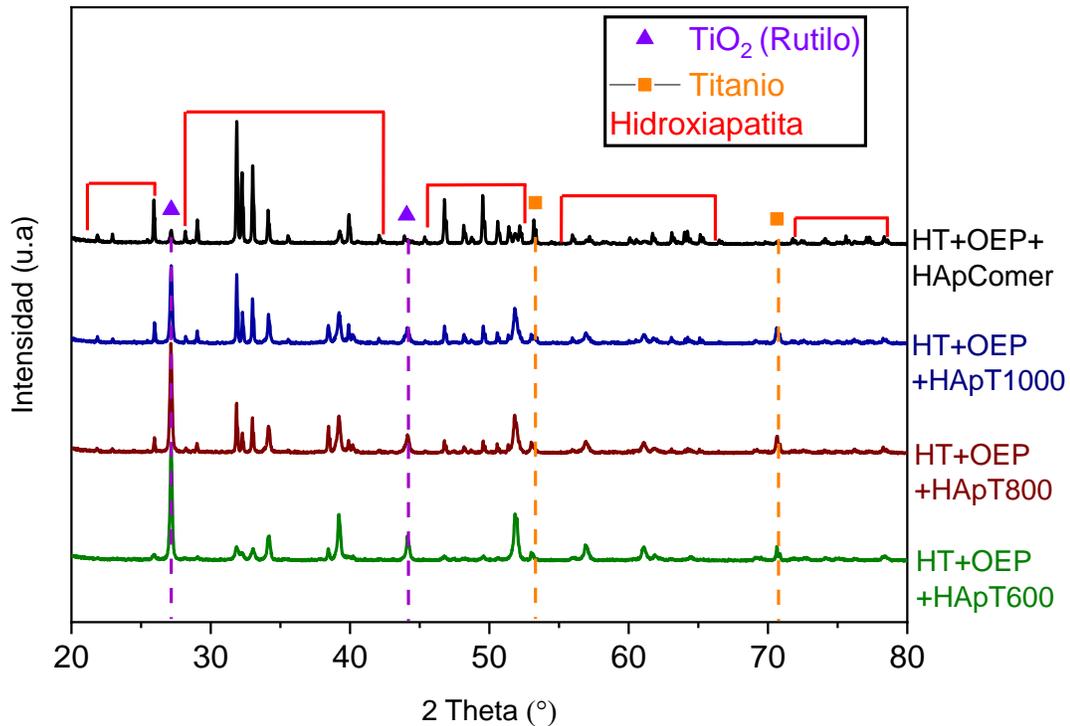


Figura 20. Difractogramas de las láminas de Ti con tratamiento de OEP e HT a) HApT600°C, b) HApT800°C, c) HApT1000°C, d) HApComercial.

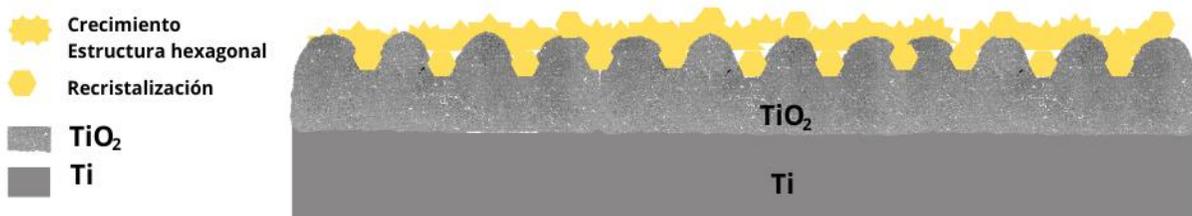


Figura 21. Esquema del recubrimiento bioactivo después del tiramiento OEP e HT.

4.2.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para observar las modificaciones superficiales de las láminas de Ti se hicieron micrográficas MEB como se presenta en las figuras 22, 23, 24 y 25 y para ver el cambio elemental superficial se hizo EDX como en los espectros. En las micrográficas se observa como el proceso de OEP genera una capa de oxido superficial porosa y rugosa, donde se ve una densidad de poros variable para cada muestra de hidroxiapatita utilizadas. Se pudo observar que las muestras de 800 °C y 1000 °C presentan una densidad de poro mucho más regular y definido.

A partir del análisis elemental se observa porcentajes de Ca, P, O, Ti y C en la superficie de la muestra, debido a la interacción de los iones con la superficie de trabajo. En la superficie del material se ven los canales de descarga que aparecen como formas circulares y elípticas irregulares que están distribuidas por toda la superficie. Este tipo de formas se presenta por la liberación de oxígeno gaseoso debido a la descarga de los microarcos en el material [10],

logrando así que se expulse el material de la superficie del metal y quede una superficial porosa [38][65].

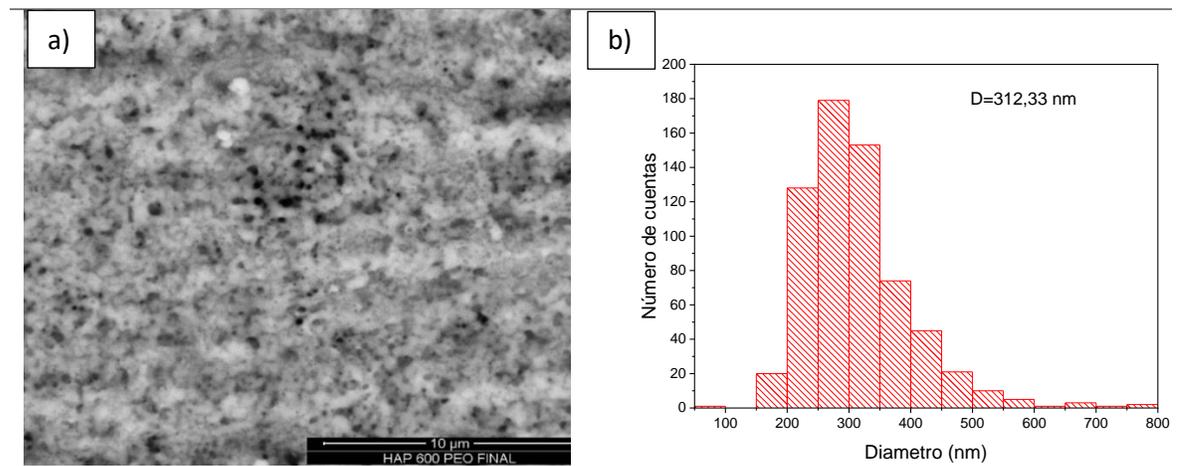


Figura 22. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HAP600°C, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.

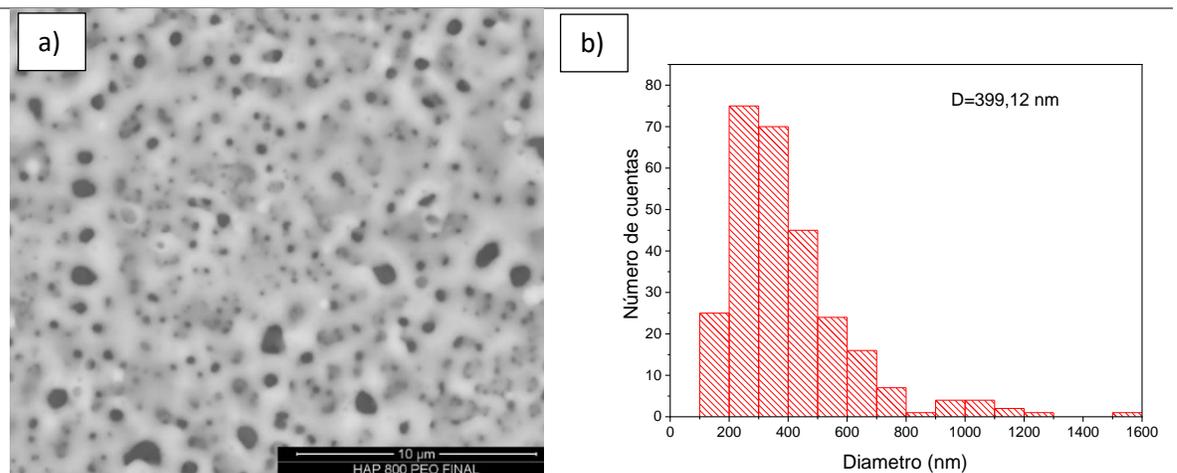


Figura 23. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HAP800°C, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.

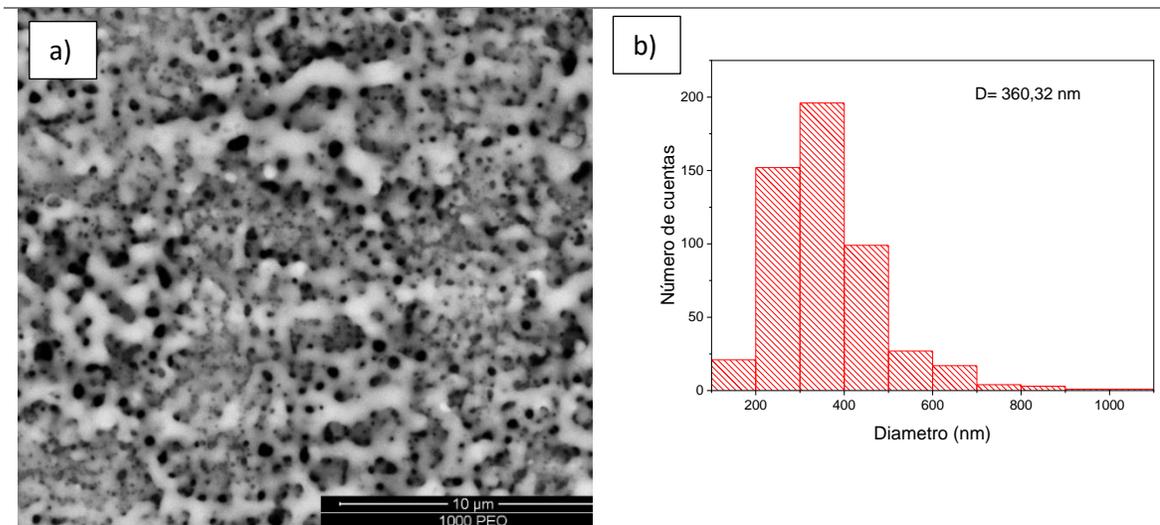


Figura 24. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HAp1000°C, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.

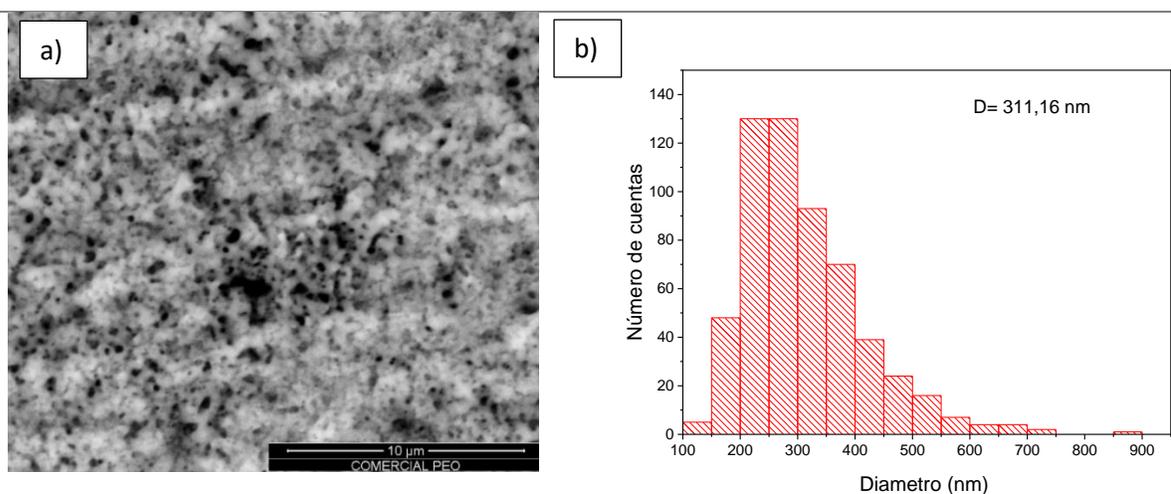


Figura 25. a) Micrografías MEB de las láminas después de tratamiento OEP HApComercial, b) distribución del tamaño de poro de la lámina después de OEP.

En las figuras 27, 28, 29 y 30 se pueden observar las muestras después del 600 °C, 800 °C, 1000 °C y comercial, después del tratamiento hidrotérmico, en estas muestras también se presentan porcentajes de Ca, P, O, Ti y C. En estas figuras se observa la formación de una capa superficial ordenada de HAp en todas las muestras, esto debido a la deposición de semillas hechas en el tratamiento de OEP. En estas micrografías se aprecian los tamaños de las diferentes muestras

obtenidas, de esto se puede observar que la hidroxiapatita comercial presenta tamaños superiores a la hidroxiapatita de fuentes natural, ya que la comercial traía un tamaño promedio de 50 μm y la natural tenía un tamaño máximo de 38 μm previas al tratamiento hidrotérmal.

La técnica de OEP e HT son complementarias, esto se hace porque la porosidad obtenida en las superficies por OEP limita su resistencia a la corrosión como lo reporta Cui *et al.*, [72], debido a que las soluciones corrosivas podrían filtrarse fácil a través de los poros; en consecuencia, varias investigaciones reportan recubrimiento compuestos que permitan sellar los poros creados por OEP [73]. A partir de las imágenes 27, 28, 29 y 30 se aprecia que después del tratamiento, ya no se alcanzan a distinguir los canales de descarga en la superficie de la muestra, de acuerdo con lo encontrado en la literatura, debido al recubrimiento superficial completo como se observa en la figura 26.



Figura 26. Cambio del sustrato debido a los tratamientos.

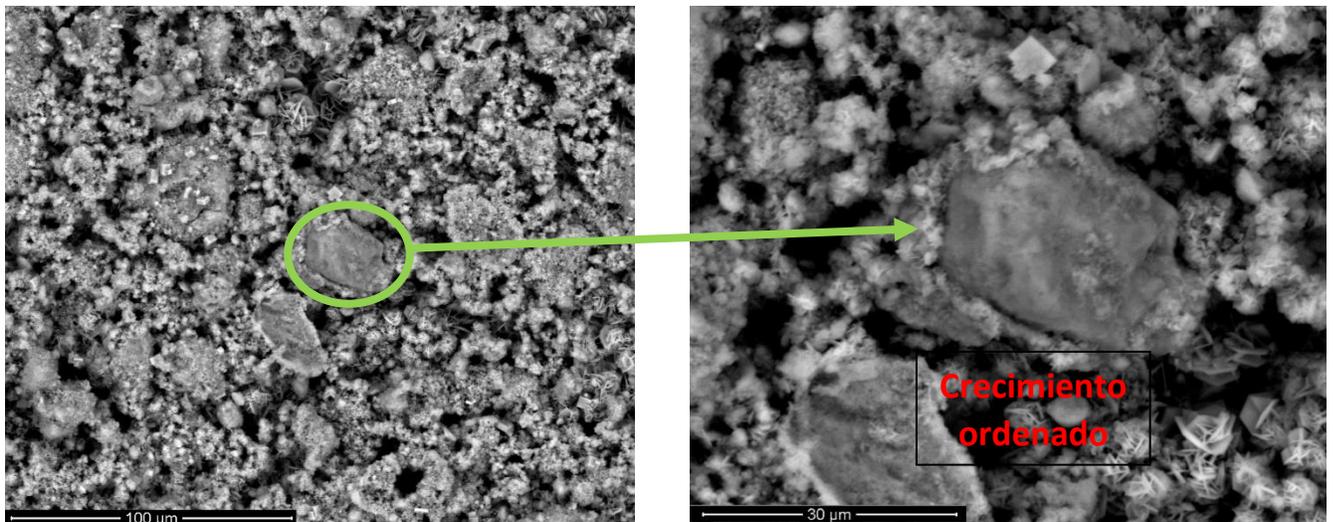


Figura 27. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotérmal (OEP+HT+HAp600°C).

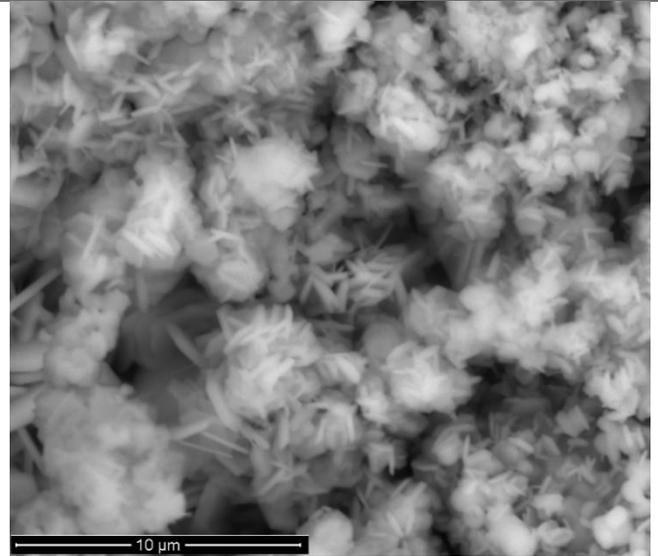
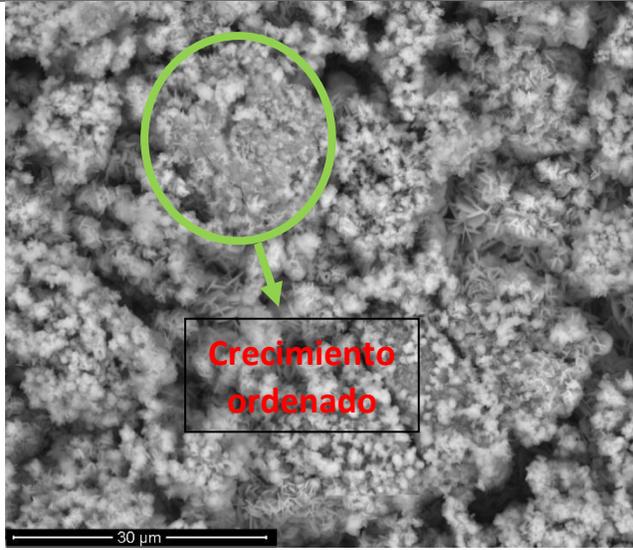


Figura 28. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HAp800°C)

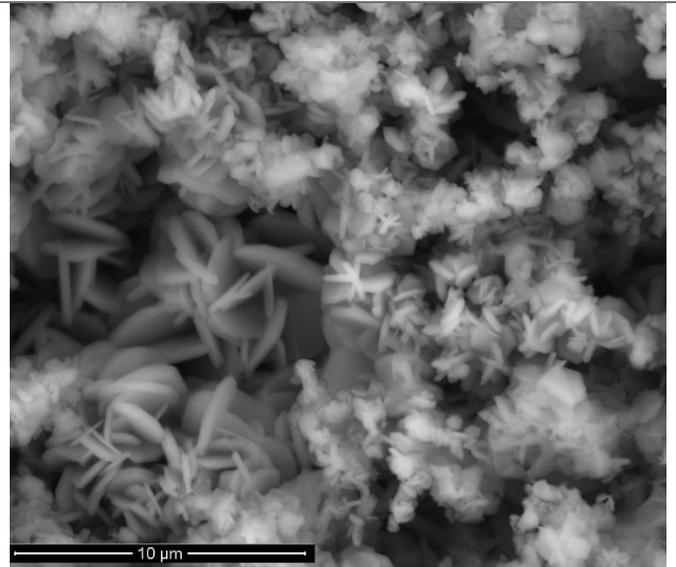
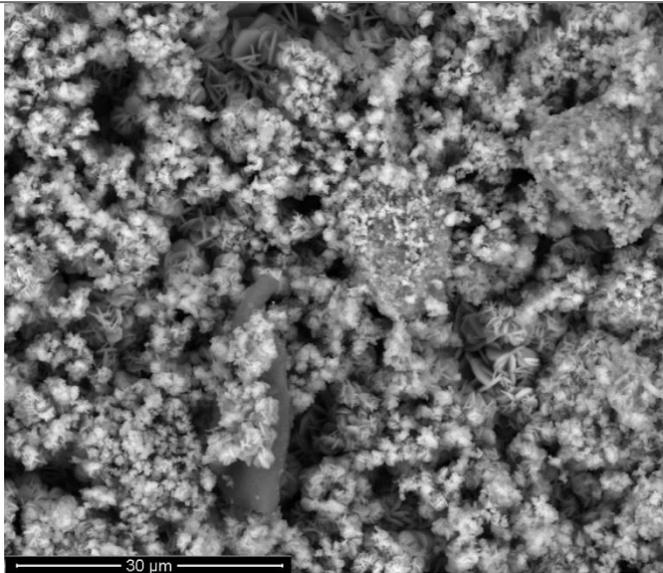


Figura 29. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HAp1000°C)

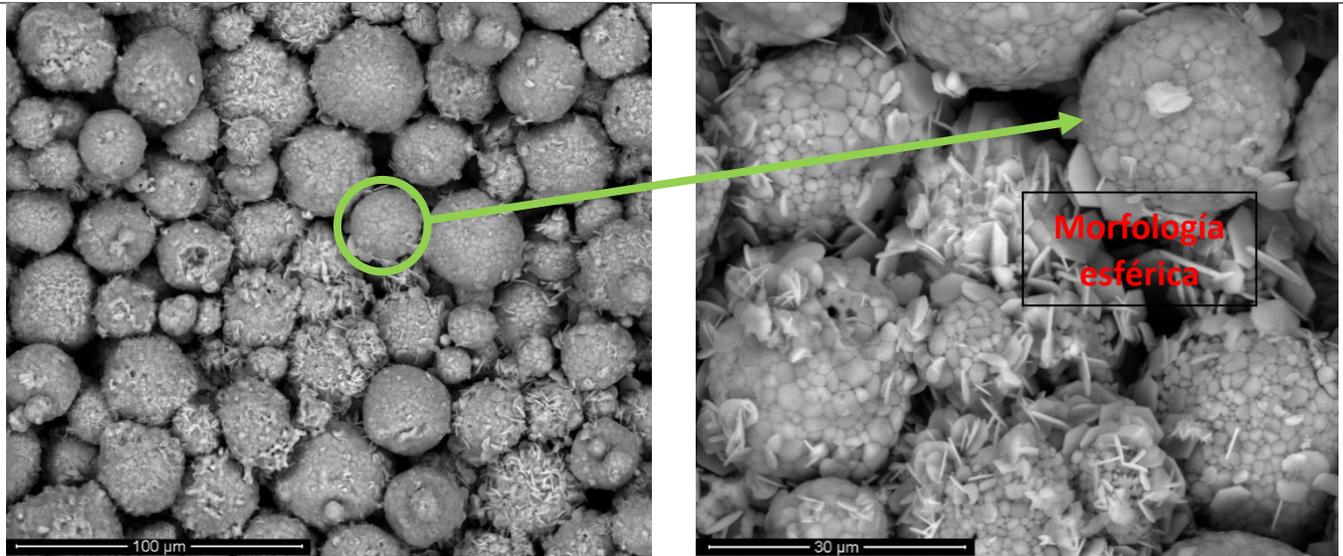


Figura 30. Micrografías MEB después del tratamiento Hidrotermal (OEP+HT+HApComercial).

Se observa además un crecimiento de cristales tipo plato (c-plane) no muy común en la superficie de los recubrimientos, este tipo de formación se debe a la sobresaturación de la solución y la termodinámica interna del proceso como lo reporta Ruffini *et al*, [30]; también se aprecia que las muestras HT+OEP+HAp600 exhiben cristales mucho más definidos en comparación a las demás muestras y el recubrimiento con HApComercial presenta un crecimiento más demorado después del proceso hidrotermal, contrario a los resultados de las muestras de 800 °C y 1000 °C. Este tipo de crecimiento presenta excelentes propiedades de adsorción debido a su mayor superficie de carga, la cual podría tener aplicaciones dentales [65]. Este tipo de formación se conoce como fosfatos octocalcicos (FOC). Este tipo de compuesto se presentan en ciertas condiciones, como en presencia de altas concentraciones de iones de calcio y fósforo en solución, y a altas temperaturas y presiones que se dan durante el proceso hidrotermal. Esto se debe a que la superficie de los cristales de hidroxiapatita es más estable en esa dirección, lo que permite un crecimiento más rápido y eficiente [74].

4.3 Evaluación electroquímica

El análisis electroquímico se realizó con la finalidad de obtener datos preliminares de las propiedades bioactivas de los recubrimientos sintetizados. Es por esto, que, la solución electrolítica a usar es fluido biológico simulado (FBS). Adicionalmente, esta evaluación se realiza para conocer propiedades electroquímicas asociadas como la resistencia a la biocorrosión, velocidad de corrosión y mecanismos de corrosión de las muestras. Por esta razón, se emplearon dos técnicas electroquímicas enunciadas a continuación.

4.3.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica brinda información sobre las diferentes capas de los recubrimientos sintetizados a fin de conocer las diferentes mecánicas de reacción con el medio biológico simulado a una temperatura de 37 °C durante todo el experimento [70]. Una vez se extrajeron los datos, estos fueron graficados en diagramas de Nyquist a fin de describir las diferentes reacciones dentro de la celda electroquímica. en la figura 31 y 32 se presentan los diagramas de Nyquist para las diferentes muestras, en este diagrama se tiene la impedancia real en el eje x y el negativo de la impedancia imaginaria en el eje y.

En las gráficas 31 y 32 se presentan los diagramas de Nyquist de las muestras con OEP y OEP e HT respectivamente. En estas figuras, se grafica la impedancia real en el eje x contra la impedancia imaginara en el eje y, a fin de conocer con mayor profundidad los mecanismos de reacción de la superficie modificada con fluido biológico [70]. Se observa que para todas las medidas se presentan uno o más semicírculos representando la reacción de las diferentes morfologías en las muestras.

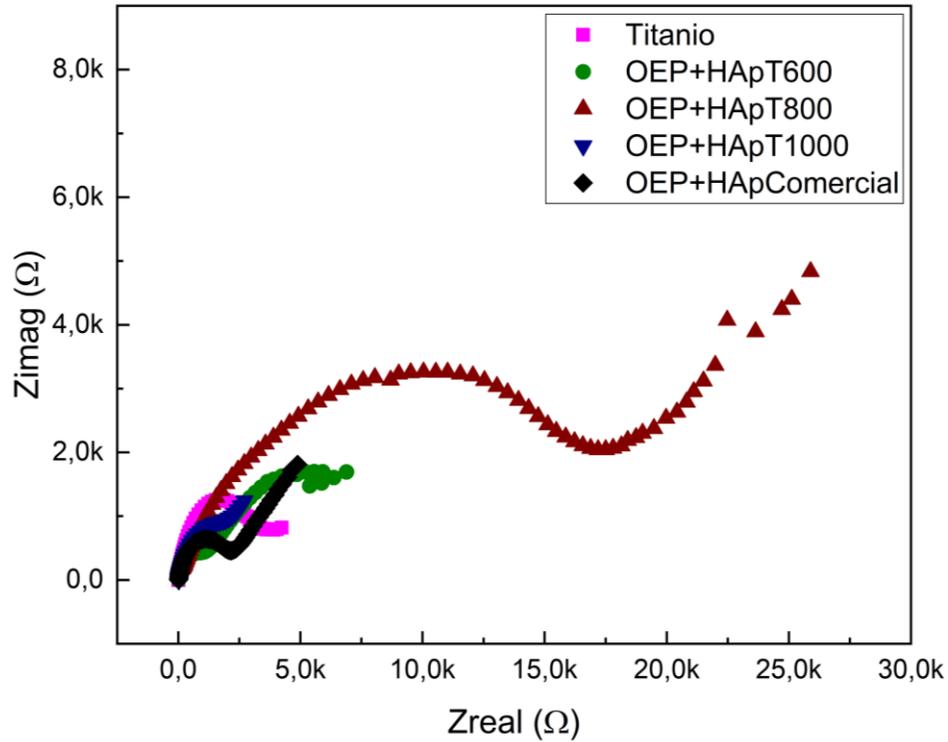


Figura 31. Gráfica Nyquits del análisis de las muestras tratadas con OEP.

La figura 31 describe los ensayos EIS para las muestras con tratamiento OEP en presencia de hidroxiapatita a diferentes temperaturas de calcinación e hidroxiapatita comercial. Se puede observar que existe interacción del medio electrolítico con dos superficies, esto debido a la porosidad generada mediante el tratamiento OEP; para bajas frecuencias representa las propiedades de la barrera interna, mientras que las frecuencias altas corresponden a la respuesta de la capa porosa externa [12]. Adicionalmente, se observa que la muestra tratada en presencia de hidroxiapatita calcinada a 800°C presenta una impedancia mayor, pudiendo significar un mejor comportamiento ante la corrosión, asociado a la degradabilidad de la HAp por la relación Ca/P [71].

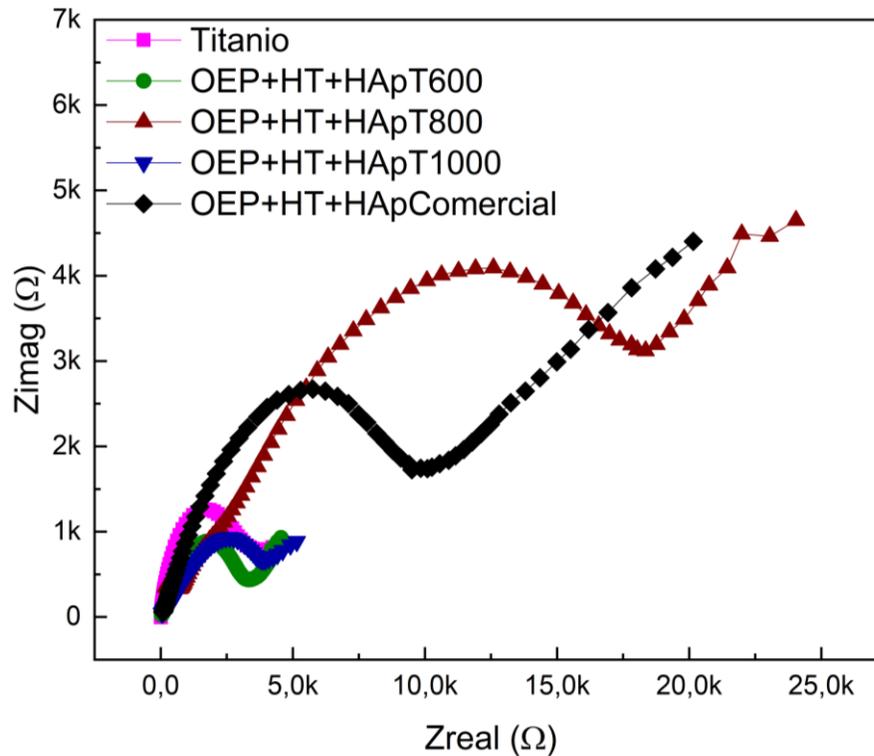


Figura 32. Gráfica Nyquits del análisis de las muestras tratadas con HT.

En la figura 32 se observan los diagramas de nyquist para las muestras tratadas con OEP e hidrotermal en presencia de hidroxiapatitas a diferentes temperaturas de calcinación y comercial a fin de realizar una comparacion de los efectos que este cambio pueda generar en las muestras estudiadas. De igual forma que las muestras solo tratadas con OEP, estas superficies presentan resultados atribuibles a una doble capa, según los datos obtenidos. Inicialmente, se hace evidente que las muestras tratadas en presencia de hidroxiapatita comercial y calcinadas a 800°C, presentan un mayor rendimiento comparada con las demás. Esta diferencia de desempeño puede deberse a una mejor adherencia del recubrimiento al sustrato, a fases cristalinas más estables o pasivación de las superficies [70]–[72], [75]. A fin de entender mejor el comportamiento de las muestras ante el electrolito se emplearon circuitos equivalentes que permiten representar mediante un circuito eléctrico las diferentes reacciones que dan lugar en la celda.

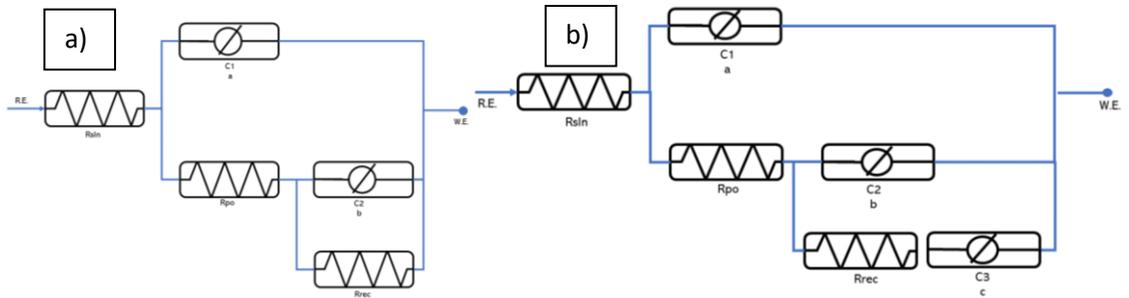


Figura 33. Circuito equivalente (a) muestras tratadas por OEP y (b) muestras tratadas por OEP e hidrotermal.

En la figura 33 se presentan los circuitos equivalentes que explican el comportamiento de las muestras dentro de la celda electroquímica. En estos circuitos R_{sln} da razón de la resistencia a de la solución, $C1$ junto con R_{po} dan razón de la capa porosa superficial y $C2$, R_{rec} y $C3$ dan razón de la capa de barrera entre la solución y el sustrato, en el caso de la figura 33(b), se observa que $C3$ da referencia a una capa extra debido a la deposición de hidroxiapatita en la superficie mediante el tratamiento hidrotermal [12]. En la figura 34 se presenta un esquema donde se observa más claramente las superficies interactuantes en el análisis electroquímico y su equivalencia con los componentes del circuito [73], [75].

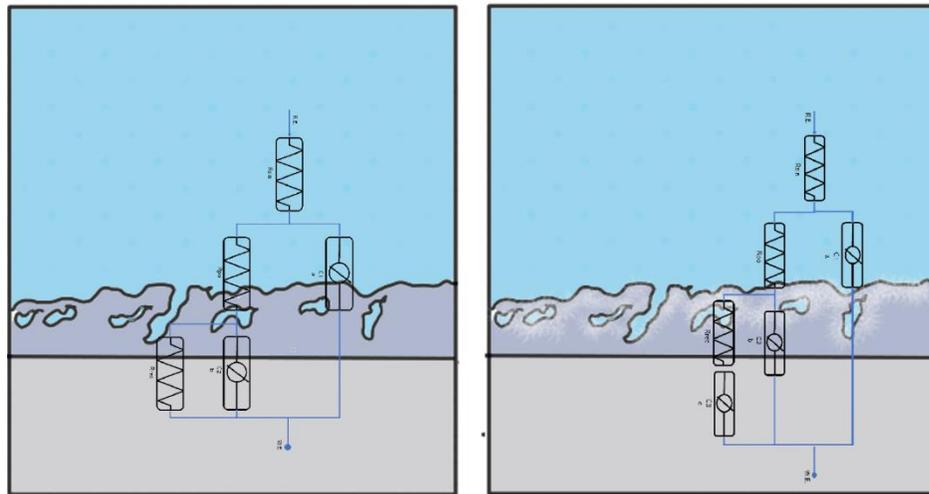


Figura 34. Representación gráfica del comportamiento de los circuitos equivalentes.

4.3.2 Resistencia a la polarización. (Tafel)

Se analizó el rendimiento de las muestras modificadas por OEP frente a la corrosión, así como el sustrato de titanio. Las muestras se estudiaron utilizando PDP (polarización potenciodinámica), donde se polarizaron las muestras en la región catódica hacia la región anódica alrededor del potencial de un circuito abierto [72]. Para estimar el comportamiento a la corrosión se evalúan parámetros como el potencial de corrosión (E_{corr}) y la densidad de corriente de corrosión (i_{corr}), las cuales se miden mediante la extrapolación Tafel en un rango de potencial de -250 mV a +250mV alrededor del potencial de circuito abierto. El potencial de corrosión representa la viabilidad de que ocurra una reacción de este tipo [72].

Los resultados correspondientes al análisis por resistencia a la polarización con extrapolación Tafel, se realizó con el objetivo de conocer el mecanismo de corrosión y determinar parámetros importantes como resistencia a la polarización (R_p) y Velocidad de corrosión (Vel_{corr}) que son primordiales en aplicaciones biomédicas como implantes. Con el fin de obtener esta información se presentan los siguientes voltagramas producto de las mediciones Tafel. En las figuras 35 y 36 se presentan los voltagramas de las muestras por OEP y las muestras con HT respectivamente, estos se presentan con el logaritmo base diez del valor absoluto de la corriente en el eje x, y con el voltaje en el eje y.

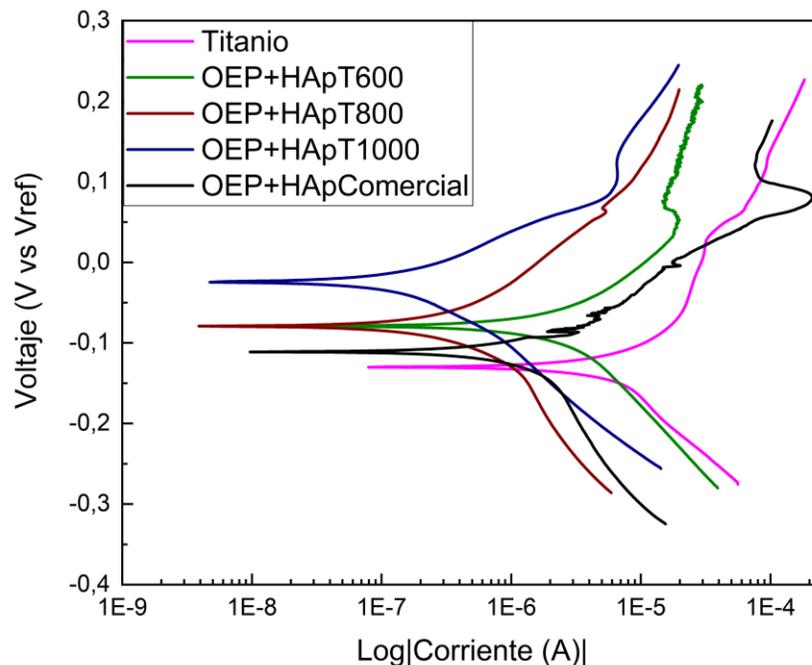


Figura 35. Curvas de polarización de muestras tratadas con OEP.

En la figura 35 y 36 se presentan los voltagramas que relacionan el voltaje contra el voltaje de referencia en el eje y, y el logaritmo base 10 del valor absoluto de la corriente en el eje x, esto último a fin de obtener información de los mecanismos de corrosión por medio de la extrapolación tafel. En los voltagramas se observan las dos semirreacciones catódica y anódica correspondientes a la reducción y oxidación de la muestra estudiada. Es evidente que la semirreacción anódica es más pronunciada, esto efecto de la corrosión generalizada característica del titanio [72]. Adicionalmente, se presenta en todos los casos se presenta una pasivación y posterior reactivación en el rango de 84 a 120 mV que da razón de la creación de una capa pasiva de óxido de titanio y su posterior dilución representado por la continuación en el aumento de la corriente [12], [38], [66], [72], [76].

En la figura 36, se presentan los voltagramas correspondientes a las mediciones de las muestras con tratamiento OEP en presencia de hidroxiapatita a diferentes temperaturas de calcinación. Se observa que, en todos los casos, las muestras tratadas con OEP tienden a potenciales más positivos respecto al blanco de titanio, indicando una disminución en la velocidad de corrosión [66], [70], [75].

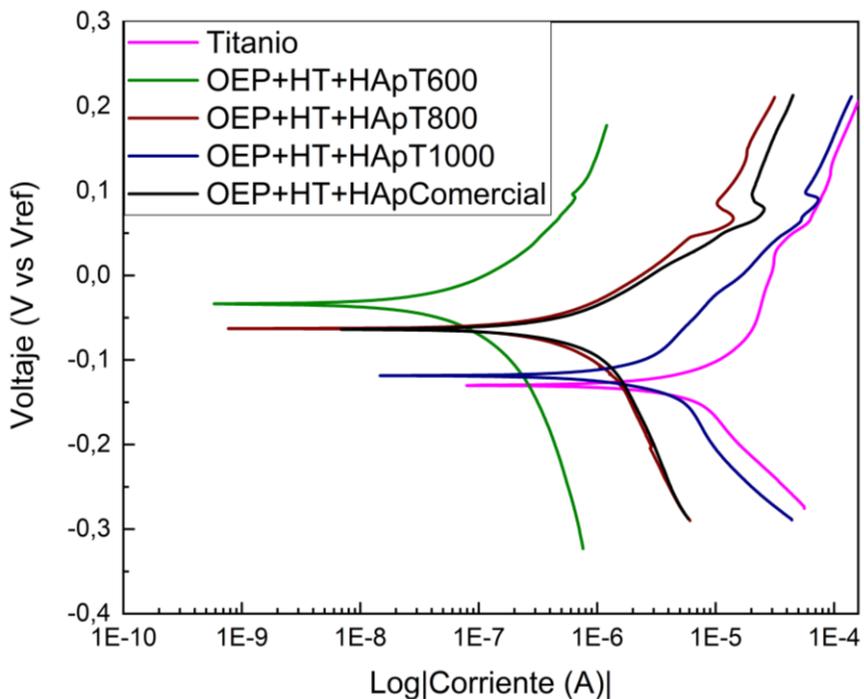


Figura 36. Curvas de muestras tratadas con OEP e Hidrotermal.

En la tabla 4 se presentan los valores de potencial, corriente y velocidad de corrosión además de la resistencia a la polarización. Mediante estos parámetros se puede medir cuantitativamente la calidad de las muestras para su aplicación final.

Tabla 4. Resultados de las evaluaciones electroquímicas.

MUESTRA	ICOR	ECO (mV)	RES Polarización (KΩ)	VEL COR (mpy)
BLANCO	4,031 μA	-148	14,02	783,2 e-3
600 OEP	3,472 μA	-79,05	9,14	674 e-3
800 OEP	642,4nA	-79,09	55,01	124,7 e-3
1000 OEP	184,7nA	-24,65	94,03	35,85e-3
COMOEP	2,098 μA	-111,10	14,59	407,2e-3
600 OEP+HIDRO	119,7 nA	-33,54	7,51	1796 e-3
800OEP+HIDRO	852,9nA	-62,81	37,03	165,6e-3
1000OEP+HIDRO	4,621 μA	-118,50	6,64	897,1e-3
COMOEP+HIDRO	922,5 nA	-63,94	29,84	179,1e-3

A partir de los resultados hallados se hizo la correlación con las relaciones de Ca/P y las muestras que se había se habían tratado con OEP+HT para determinar la importancia de la relación Ca/P de cada HAp en los recubrimientos finales, y su comportamiento electroquímico como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Relación de la HAp con las variables electroquímicas.

Muestra	Ca/P	Rp(kΩ)	Vel Corr (mpy)
600OEP+HIDRO	1,89	7,51	1,796
800OEP+HIDRO	1,76	37,03	0,165
1000OEP+HIDRO	2,24	6,64	0,897

COMOEP+HIDRO	1,67	29,84	0,179
---------------------	------	-------	-------

En las figuras 37, 38 y 39 que se encuentran a continuación se observan gráficas de correlación de la resistencia a la polarización, velocidad de corrosión y relación Ca/P en función de las diferentes hidroxiapatitas utilizadas en el proceso. A partir de estas correlaciones se puede observar que las tendencias de resistencia a la corrosión y resistencia a la polarización se comportan de acuerdo con la relación de Ca/P, ya que, para la muestra de 800 °C se presentan los mejores valores de estos parámetros. Este comportamiento, también se asocia a la cristalinidad, porosidad de la hidroxiapatita y tamaño de cristalito, puesto que este valor cambia a medida que la calcinación del polvo de hueso supera los 900 °C, y se debe, principalmente a que estos parámetros se ven modificados por el fenómeno de la coalescencia; lo que significa una reducción de la cristalinidad, además de un cambio en los tamaños de cristalito, como lo reporta Londoño *et al.*, [43].

Además, estos resultados concuerdan con lo analizado en los resultados iniciales de la modificación con OEP donde se observa un cambio en la definición y densidad de poros en las imágenes MEB, así como el pico que se presenta en los difractogramas (figura 19) asociado a la formación de anatasa más definido para las muestras asociadas a 800 °C y 1000 °C, siendo la muestra de 800 °C la que muestra una mayor intensidad debido a estos cambios que presentan las diferentes HAp asociado a los cambios en la estructura cristalina y la composición química de cada muestra, lo que puede tener incidencia en el comportamiento electroquímico, debido a la afectación de la movilidad de los iones en la superficie del material [14], [55], [58], [59], [61], [66], [67], [70], [77], [78].

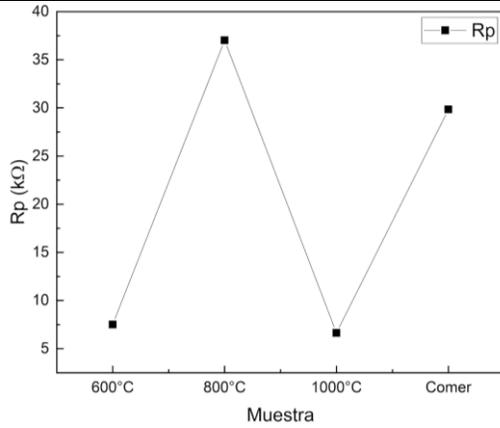


Figura 37. Correlación del valor de resistencia a la polarización en función de las diferentes hidroxiapatitas.

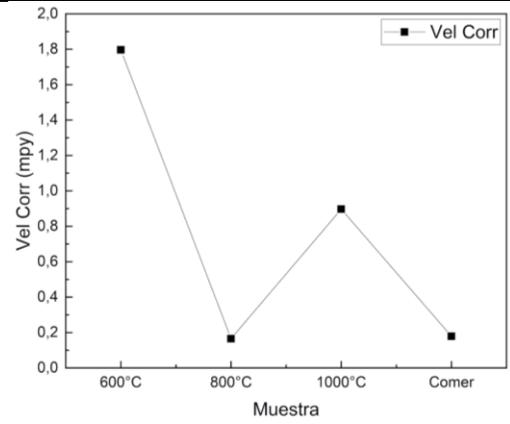


Figura 38. Correlación del valor de velocidad de corrosión en función de las diferentes hidroxiapatitas.

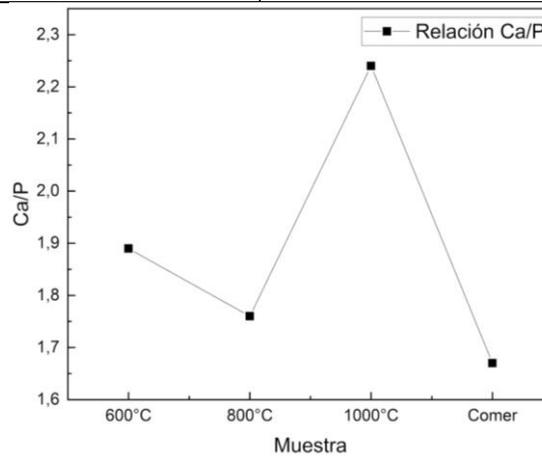


Figura 39. Relación de Ca/P para las diferentes hidroxiapatitas.

4.3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

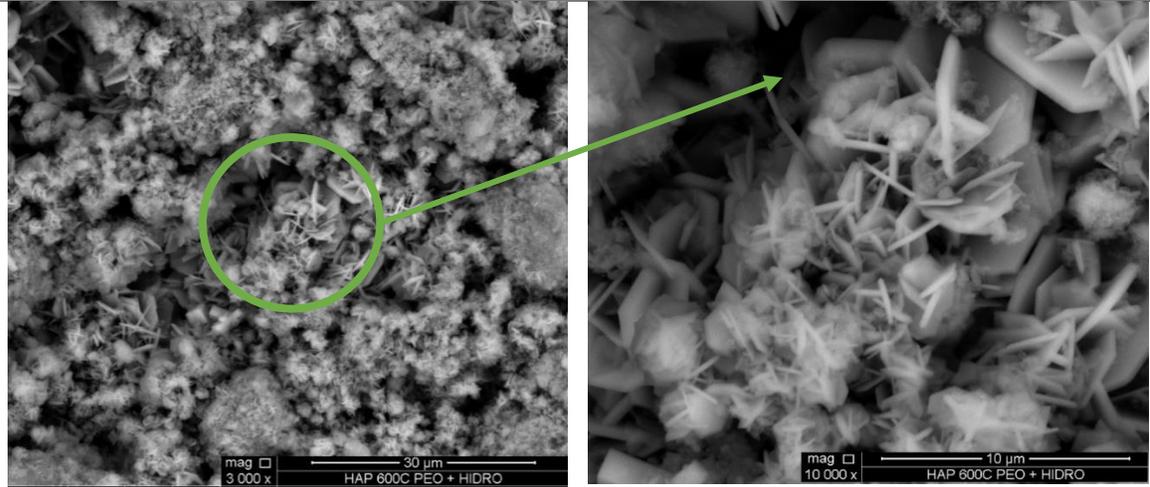


Figura 40. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HAp600).

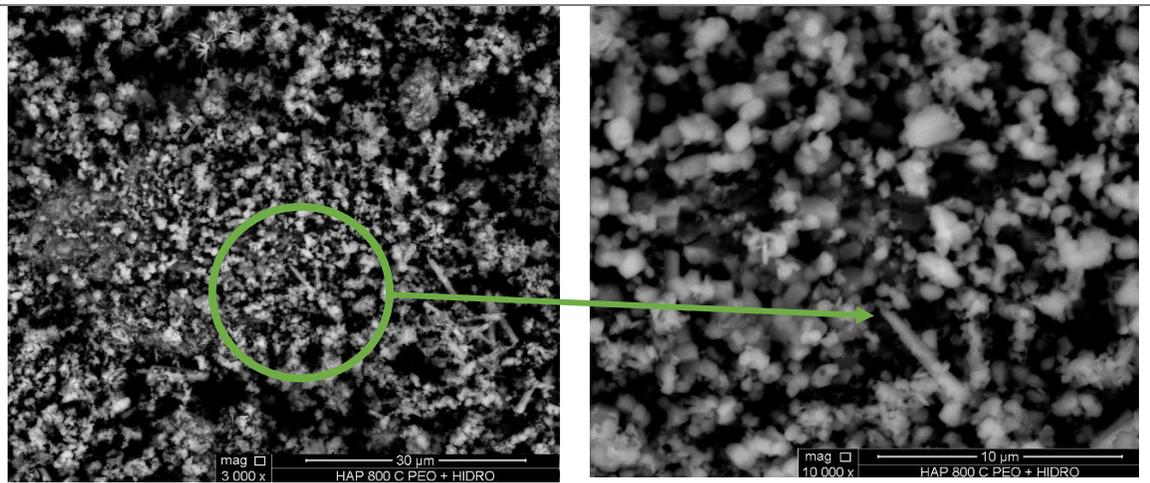


Figura 41. Figura 40. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HAp800).

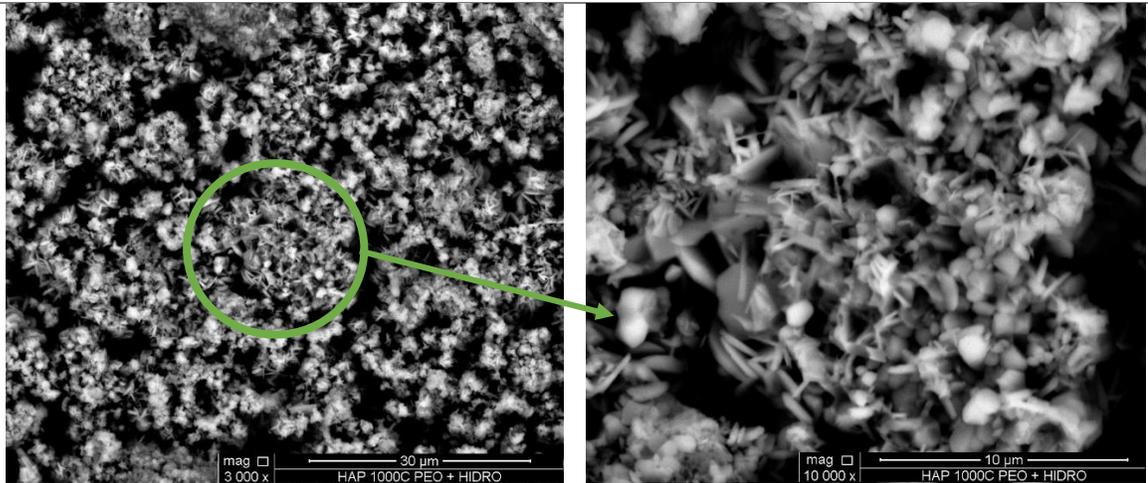


Figura 42. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HAp1000).

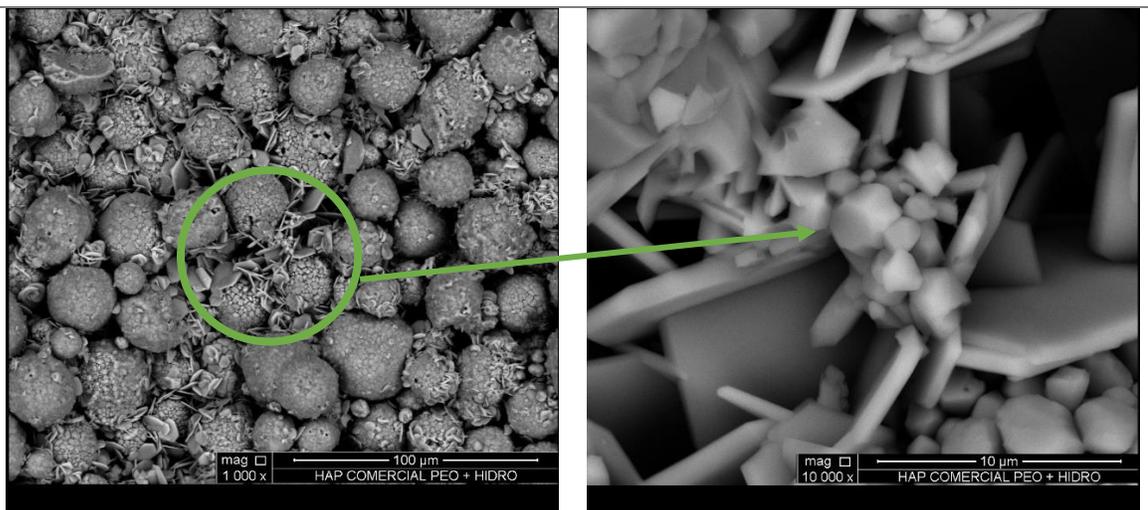


Figura 43. Micrografías MEB después de la evaluación electroquímica (OEP+HT+HApComercial).

A partir de las imágenes se observan las morfologías superficiales de los recubrimientos con la aplicación de las diferentes hidroxiapatitas, después del análisis electroquímico. En todas las muestras se alcanza a ver la formación de tipo plano (c-plane) de cristales de hidroxiapatita, pero en las muestras de 800°C y 1000°C se comienza a ver otro tipo de morfologías alargadas en la dirección del eje c debido al crecimiento de los cristales.

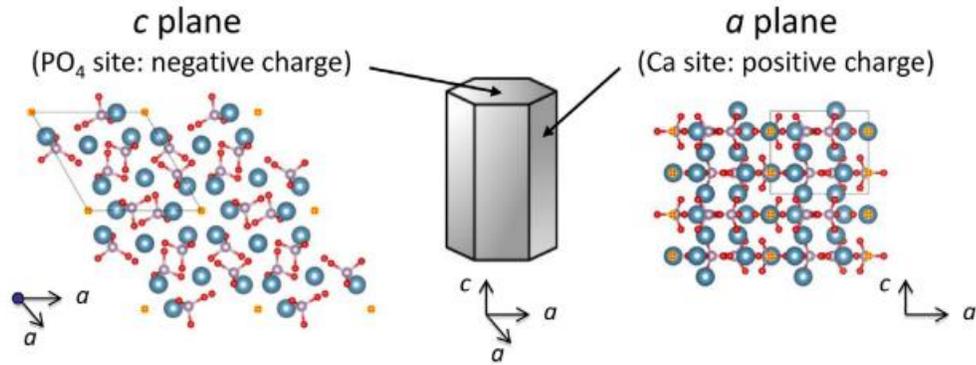


Figura 44. Disposición de los planos de hidroxiapatita

Los cristales de hidroxiapatita tienen una preferencia por crecer a lo largo del eje c , que es la dirección que corresponde a la longitud de la estructura cristalina [74], en la muestra de 600 y comercial se conserva el crecimiento tipo plato, en mayor medida que para las muestras de 800 °C y 1000 °C. A pesar de esto, para la muestra de comercial se logra observar el crecimiento que se genera a partir de la deformación de las partículas superficiales que componen el recubrimiento.

Una vez que se inicia la formación de hidroxiapatita en el c -plane, el crecimiento en esa dirección es favorecido debido a las condiciones del entorno y la estructura cristalina de la hidroxiapatita. La hidroxiapatita se forma a través de la deposición sucesiva de iones de calcio y fosfato en la superficie del cristal existente, lo que permite que el cristal crezca en la dirección c -plane y se vaya consolidando en esa orientación [30].

Estos compuestos octocalcicos son formas metastables de hidroxiapatita, con una relación estequiométrica de Ca/P que puede variar, siendo mayor que 1,67 y acercándose a 2.0 o incluso superándola. Esto se debe a la presencia de iones adicionales de calcio en la estructura cristalina, lo que resulta en una mayor concentración de calcio en la superficie del cristal en comparación con la hidroxiapatita convencional [79].

Finalmente, a partir de estas imágenes se logra apreciar que las muestras de 800 °C y 1000 °C son las que presentan un mayor crecimiento de los cristales con respecto a las muestras de 600 °C y comercial y esto se puede asociar a la interacción con el entorno, lo que puede deberse a la composición química superficial, a la cristalinidad y solubilidad de los recubrimientos obtenidos a partir de combinar el método OEP y la ruta hidrotermal [61], [74], [79].

5. CONCLUSIONES

Se obtuvo hidroxiapatita a nivel de laboratorio de un subproducto de la industria cárnica como lo son los huesos de oveja variando la temperatura de calcinación (600 °C, 800 °C y 1000 °C). Los resultados obtenidos muestran que la temperatura de calcinación influye en los cambios fisicoquímicos de las muestras de polvo de hueso ovino. La BHAp mostró grandes similitudes al ser comparada con la hidroxiapatita comercial. Para las muestras calcinadas a 600 °C se observa una pérdida de agua total y material orgánico, en cambio para la muestra de 800 °C se evidencia una pérdida de carbonatos, que comienza aproximadamente 705 °C, lo que se corrobora en los espectros IR donde para la temperatura de 800 °C y 1000 °C ya no se encuentran los picos de carbonatos. En los resultados de la cristalinidad, la muestra de HAp calcinada a 800 °C mostró un mejor resultado comparada con la muestra comercial; de igual forma, para los resultados de la relación Ca/P para la muestra de 800 °C y comercial son muy cercanos, pero la muestra de 800 °C sigue teniendo la relación de una hidroxiapatita biológica, ya que está por encima del rango estequiométrico (1,62-1,72). A pesar de esto, la muestra de 800 °C se considera de acuerdo con estos análisis la mejor muestra para trabajos de biocompatibilidad.

La modificación superficial por OEP en el análisis de DRX presentó picos asociados al Ti puro y un único pico representativo de TiO_2 en forma de anatasa, por lo que se puede inferir que los sustratos de titanio soportaron temperaturas inferiores a 400 °C, y debido a esto tampoco se logran apreciar picos de la hidroxiapatita, ya que a esta temperatura la HAp no alcanza a recrystalizarse. El análisis morfológico refleja los canales de descarga en la superficie de la muestra, obtenido a las microarcos (microdescargas) que tienen lugar en el proceso de OEP; con lo que se obtienen al final una superficie porosa. El análisis elemental muestra en la superficie elementos como Ti, P y Na, debido a que, son los iones que participan de la reacción.

En el análisis por DRX de los recubrimientos por ruta hidrotermal, se obtuvo los picos asociados a la HAp en todas las muestras tratadas. A partir de los resultados, se entiende que la HAp logró la recrystalización superficial en la superficie de la lámina de titanio, consiguiendo rellenar, los canales de descargas obtenidos por OEP; adicionalmente, en los difractogramas se obtuvo picos asociados a la formación de TiO_2 en fase rutilo, y ya no se consiguió observar la fase anatasa en las muestras tratadas por HT, consecuente con lo informado en la literatura sobre la forma de rutilo, para lo cual se necesita, temperaturas superiores a 100 °C, tiempo de

tratamiento superior a 10h y una solución agresiva. La morfología superficial después del tratamiento con HT presenta cristales c-plane hexagonales

A partir de los resultados obtenidos se puede inferir que la oxidación electrolítica por plasma y el método hidrotérmal, funcionan muy bien como técnicas de recubrimientos complementarias, ya que se ve un aumento en la resistencia a la corrosión de las muestras tratadas con OEP a las muestras tratadas con OEP e HT, esto se asume debido a que las cavidades formadas por la reacción de OEP son rellenadas en el proceso HT. Además, en la resistencia a la polarización también se observa una mejora significativa. En las dos evaluaciones se tiene que la mejor muestra fue la de hidroxiapatita calcinada a 800°C, debido a sus características, como porcentaje de cristalinidad, tamaño de cristalito, entre otras; superiores a las demás muestras. Se observó además que, aunque la hidroxiapatita comercial presenta un recubrimiento, más ordenado, por su morfología esférica y tamaños de partículas regulares, no pudo superar, el crecimiento de la HAn con la aplicación de la técnica HT, ni tuvo las mejores respuestas en cuanto a las evaluaciones electroquímicas propuestas para este experimento.

5.1 PRODUCTOS DE LA TESIS

A raíz de este trabajo se presentaron los avances de la tesis en el **Congreso Internacional de Física y Tecnologías Emergentes:**

- Ponencia tipo poster titulado *“Análisis electroquímico de los recubrimientos de hidroxiapatita ovina crecidos por ruta hidrotérmal sobre capas de TiO₂ obtenidas por oxidación electrolítica por plasma”* Manizales, diciembre de 2021.

A partir de este trabajo de investigación se publicó parte de los resultados:

- Artículo publicado: Influence of the calcination temperature on the crystallographic, compositional, and morphological properties of natural hydroxyapatite obtained from sheep bones, Scientia et Technia, 2021.

5.2 RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Para este trabajo se consideró un análisis electroquímico en fluido biológico simulado, lo cual sería de gran interés como punto de partida para cinéticas de bioactividad, y pruebas experimentales in vitro e in vivo.

Por otra parte, teniendo en cuenta los recubrimientos obtenidos por oxidación electrolítica por plasma se puede extrapolar en piezas de diferentes geometrías, para diferentes aplicaciones biomédicas. También, evaluar diferentes ciclos útiles para la modificación superficial por OEP y deposición de semillas en los sustratos.

En el presente trabajo se utilizaron parámetros determinados del proceso hidrotermal que se aplicó a todas las muestras. Se recomienda realizar un estudio con la variación de estos parámetros, ya que podrían generar diferentes estructuras en el material de interés.

Adicionalmente, se podría pensar en la incorporar de iones de interés en la superficie del recubrimiento para evaluar su afectación en el desempeño de la bioactividad de los recubrimientos.

6. REFERENCIAS

- [1] C. Peniche, Y. Solís, N. Davidenko, and R. García, “Materiales compuestos de quitosana e hidroxiapatita,” *Biotecnología Aplicada*, vol. 27, no. 3, 2010.
- [2] La Asociación Colombiana de Osteoporosis-Caracol Radio, “La Asociación Colombiana de Osteoporosis presentó el II Consenso Colombiano de Osteoporosis | Sanamente | Caracol Radio,” 2017.
https://caracol.com.co/programa/2017/09/08/sanamente/1504900428_897168.html
(accessed oct. 04, 2021).
- [3] J. L. A. T. FUENTES, “Obtención y caracterización de hidroxiapatita porosa a partir de cáscara de huevo y tunicina,” 2010.
- [4] Y. J. Mata Cocolletzi, “Caracterización estructural, microestructural y química durante el proceso para obtener Hidroxiapatita a partir de hueso de bovino,” *Thesis*, p. 101, 2016.
- [5] S. I. Eguía, “Estudio microestructural de partículas de hidroxiapatita crecidas sobre geles de sílice,” *Universida Autonoma de Nuevo leon*, vol. 1, p. 65, 2019.
- [6] E. A. Ofudje, A. Rajendran, A. I. Adeogun, M. A. Idowu, S. O. Kareem, and D. K. Pattanayak, “Synthesis of organic derived hydroxyapatite scaffold from pig bone waste for tissue engineering applications,” *Advanced Powder Technology*, vol. 29, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1016/j.apt.2017.09.008.
- [7] D. A. Florea, D. Albuleț, A. M. Grumezescu, and E. Andronescu, “Surface modification – A step forward to overcome the current challenges in orthopedic industry and to obtain an improved osseointegration and antimicrobial properties,” *Materials Chemistry and Physics*, vol. 243, no. August 2019, p. 122579, 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122579.
- [8] D. N. Ungureanu, N. Angelescu, R. M. Ion, E. V. Stoian, and C. Z. Rizescu, “Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by chemical precipitation,” *10th WSEAS International Conference on EHAC'11 and ISPR'11, 3rd WSEAS Int. Conf. on Nanotechnology, Nanotechnology'11, 6th WSEAS Int. Conf. on ICOAA'11, 2nd WSEAS Int. Conf. on IPLAFUN'11*, no. September 2015, pp. 296–301, 2011.
- [9] M. V. Garcia Garduño and J. Reyes Gasga, “Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211937005>,” *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006.
- [10] S. A. Adeleke *et al.*, “The properties of hydroxyapatite ceramic coatings produced by plasma electrolytic oxidation,” *Ceram Int*, vol. 44, no. 2, pp. 1802–1811, 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.10.114.
- [11] L. R. Rivera, “Efecto de la biofuncionalización superficial en la formación de matriz extracelular MEC sobre un recubrimiento vitrocerámico con morfología controlada crecido sobre Ti6Al4V,” 2013.
- [12] M. Fazel, H. R. Salimijazi, M. Shamanian, I. Apachitei, and A. A. Zadpoor, “Influence of hydrothermal treatment on the surface characteristics and electrochemical behavior of Ti-

- 6Al-4V bio-functionalized through plasma electrolytic oxidation,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 374, no. May, pp. 222–231, 2019, doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.05.088.
- [13] C. A. Carvalho Zavaglia, R. F. Silva, S. A. Santos, and C. R. Pelliciaro de Lima, “Caracterización de recubrimientos de hidroxiapatita depositadas sobre la aleación Ti6Al7Nb a través de aspersión térmica a plasma,” *Biomecánica*, vol. 8, no. 1, pp. 49–53, 2000, doi: 10.5821/sibb.v8i1.1646.
- [14] C. J. Chung, R. T. Su, H. J. Chu, H. Te Chen, H. K. Tsou, and J. L. He, “Plasma electrolytic oxidation of titanium and improvement in osseointegration,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 101 B, no. 6, pp. 1023–1030, 2013, doi: 10.1002/jbm.b.32912.
- [15] E. Peón, A. Jiménez Morales, E. Fernández-Escalante, M. C. García-Alonso, M. L. Escudero, and J. C. Galván, “Recubrimientos de hidroxiapatita preparados mediante un proceso sol-gel,” *Revista de Metalurgia*, vol. 41, no. Extra, pp. 479–482, 2005, doi: 10.3989/revmetalm.2005.v41.iextra.1080.
- [16] H. Melero, J. Fernández, and J. M. Guilemany, “Recubrimientos bioactivos: Hidroxiapatita y titania,” *Biomecánica*, vol. 19, pp. 35–48, 2011.
- [17] H. El Boujaady, M. Mourabet, A. EL Rhlissi, M. Bennani-Ziatni, R. El Hamri, and A. Taitai, “Adsorption of a textile dye on synthesized calcium deficient hydroxyapatite (CDHAp): Kinetic and thermodynamic studies,” *Journal of Materials and Environmental Science*, vol. 7, no. 11, pp. 4049–4063, 2016.
- [18] A. Chandrasekar, S. Sagadevan, and A. Dakshnamoorthy, “Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique,” *International Journal of Physical Sciences*, vol. 8, no. 32, pp. 1639–1645, 2013, doi: 10.5897/IJPS2013.3990.
- [19] M. I. Ochoa Gómez, “Síntesis Y Caracterización De Polvos De Hidroxiapatita Carbonatada Tipo B Con Diferentes Contenidos De Carbonato,” *Revista Colombiana de Materiales*, no. 17, pp. 22–32, 2021, doi: 10.17533/udea.rcm.n17a03.
- [20] A. M. Janus, M. Faryna, K. Haberkowicz, A. Rakowska, and T. Panz, “Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones,” *Microchimica Acta*, vol. 161, no. 3–4, pp. 349–353, 2008, doi: 10.1007/s00604-007-0864-2.
- [21] R. Furlong, “The Furlong® Hydroxyapatite Ceramic Coated Total Hip Prosthesis,” *HIP International*, vol. 2, no. 2, pp. 37–42, Apr. 1992, doi: 10.1177/112070009200200201.
- [22] R. Geesink, ... K. de G.-C. O. and, and undefined 1987, “Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings: the development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite,” *researchgate.net*.
- [23] V. Uskoković, “Ion-doped hydroxyapatite: An impasse or the road to follow?,” *Ceramics International*, vol. 46, no. 8, pp. 11443–11465, 2020, doi: 10.1016/j.ceramint.2020.02.001.
- [24] I. V. Antoniac, *Handbook of bioceramics and biocomposites*. 2016. doi: 10.1007/978-3-319-12460-5.

- [25] S. Marković *et al.*, "Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: A comparative study of crystal structure and morphology," *Biomedical Materials*, vol. 6, no. 4, 2011, doi: 10.1088/1748-6041/6/4/045005.
- [26] S. Aliasghari, "Plasma electrolytic oxidation of titanium," p. 223, 2014.
- [27] D. A. Torres-Cerón, E. Restrepo-Parra, and R. Ospina-Ospina, "Producción de recubrimientos de TiO₂ mediante oxidación electrolítica por plasma (PEO), para posibles aplicaciones tecnológicas," 2020.
- [28] J. M. Bennett *et al.*, "Comparison of the properties of titanium dioxide films prepared by various techniques," *Applied Optics*, vol. 28, no. 16, p. 3303, 1989, doi: 10.1364/ao.28.003303.
- [29] K. Q. Alvarez, "Síntesis de cordierita a partir de hidroxihidrogeles bajo tratamiento hidrotermal.," pp. 1–110, 2012.
- [30] A. Ruffini, S. Sprio, L. Preti, and A. Tampieri, "Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite via Controlled Hydrothermal Route," *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration*, May 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.85091.
- [31] Y. G. Morales, "Síntesis, caracterización y evaluación de la bioactividad de biomateriales compuestos de hidroxiapatita carbonatada/hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad," Universidad de Sonora, 2019.
- [32] A. M. Hend S. Magar, Rabeay Y. A. Hassan, "Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)_ Principles, Construction, and Biosensing Applications _ Enhanced Reader.pdf." 2021.
- [33] "Resistencia a la polarización." <https://www.gamry.com/Framework Help/HTML5 - Tripane - Audience A/Content/EIS/Theory/Physical Electrochemistry and Circuit Elements/Polarization Resistance.htm> (accessed Aug. 01, 2022).
- [34] F. Mansfeld, "Tafel slopes and corrosion rates obtained in the pre-Tafel region of polarization curves," *Corrosion Science*, vol. 47, no. 12, pp. 3178–3186, Dec. 2005, doi: 10.1016/J.CORSCI.2005.04.012.
- [35] D. Jiménez Trujillo, "Determinación de la velocidad de corrosión de un bronce comercial en contacto con una mezcla de etanol- gasolina mediante técnicas electroquímicas," Universidad Tecnológica de Pereira, 2016.
- [36] P. A. F. Sossa, B. S. Giraldo, B. C. G. Garcia, E. R. Parra, and P. J. A. Arango, "Comparative study between natural and synthetic hydroxyapatite: Structural, morphological and bioactivity properties," *Revista Materia*, vol. 23, no. 4, 2018, doi: 10.1590/s1517-707620180004.0551.
- [37] Q. Luo, Q. Cai, X. Li, and X. Chen, "Characterization and photocatalytic activity of large-area single crystalline anatase TiO₂ nanotube films hydrothermal synthesized on Plasma electrolytic oxidation seed layers," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 597, pp. 101–109, Jun. 2014, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2014.01.216.

- [38] D. A. Torres-Ceron, E. Restrepo-Parra, C. D. Acosta-Medina, D. Escobar-Rincon, and R. Ospina-Ospina, "Study of duty cycle influence on the band gap energy of TiO₂/P coatings obtained by PEO process," *Surf Coat Technol*, vol. 375, pp. 221–228, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2019.06.021.
- [39] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [40] S. T. D. Ellingham, T. J. U. Thompson, and M. Islam, "Thermogravimetric analysis of property changes and weight loss in incinerated bone," *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, vol. 438, pp. 239–244, 2015, doi: 10.1016/j.palaeo.2015.08.009.
- [41] A. Niakan *et al.*, "Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone," *Ceramics International*, vol. 41, no. 2, pp. 3024–3029, 2015, doi: 10.1016/j.ceramint.2014.10.138.
- [42] A. Heredia, I. De F, I. De F, and C. De F, "Thermal analysis study of human bone," vol. 8, pp. 4777–4782, 2003.
- [43] S. M. Londoño-Restrepo, C. F. Ramirez-Gutierrez, A. del Real, E. Rubio-Rosas, and M. E. Rodriguez-García, "Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air," *Journal of Materials Science*, vol. 51, no. 9, pp. 4431–4441, 2016, doi: 10.1007/s10853-016-9755-4.
- [44] E. Barua *et al.*, "Effect of thermal treatment on the physico-chemical properties of bioactive hydroxyapatite derived from caprine bone bio-waste," *Ceramics International*, vol. 45, no. 17, pp. 23265–23277, 2019, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.08.023.
- [45] C. F. Ramirez-Gutierrez, S. M. Londoño-Restrepo, A. del Real, M. A. Mondragón, and M. E. Rodriguez-García, "Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone," *Ceramics International*, vol. 43, no. 10, pp. 7552–7559, 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.03.046.
- [46] C. M. Antonie Zazzo, Jean-Francois Saliégie, Mathieu Lebon, Sébastien Lepetz, "Radiocarbon dating of calcined bones: insights from combustion experiments under natural conditions," *Nature*, vol. 388, pp. 539–547, 2021.
- [47] W. Khoo, F. M. Nor, H. Ardhyanta, and D. Kurniawan, "Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures," *Procedia Manufacturing*, vol. 2, no. February, pp. 196–201, 2015, doi: 10.1016/j.promfg.2015.07.034.
- [48] Liga Berzina-Cimdina and Natalija Borodajenko, "Research of calcium phosphates using FTIR spectroscopy.pdf," pp. 127–134, 2012.
- [49] A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, and C. Paluszkiwicz, "FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods," *Journal of Molecular Structure*, vol. 744–747, no. SPEC. ISS., pp. 657–661, 2005, doi: 10.1016/j.molstruc.2004.11.078.

- [50] D. J. Indrani, B. Soegijono, W. A. Adi, and N. Trout, "Phase composition and crystallinity of hydroxyapatite with various heat treatment temperatures," *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 9, no. Special Issue 2, pp. 87–91, 2017, doi: 10.22159/ijap.2017.v9s2.21.
- [51] A. Z. Alshemary, M. Akram, Y. F. Goh, M. R. Abdul Kadir, A. Abdolahi, and R. Hussain, "Structural characterization, optical properties and in vitro bioactivity of mesoporous erbium-doped hydroxyapatite," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 645, no. May, pp. 478–486, 2015, doi: 10.1016/j.jallcom.2015.05.064.
- [52] M. Bohner, "Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements," *Injury*, vol. 31, no. SUPPL. 4, 2000, doi: 10.1016/S0020-1383(00)80022-4.
- [53] A. M. Castillo-Paz, S. M. Londoño-Restrepo, L. Tirado-Mejía, M. A. Mondragón, and M. E. Rodríguez-García, "Nano to micro size transition of hydroxyapatite in porcine bone during heat treatment with low heating rates," *Progress in Natural Science: Materials International*, vol. 30, no. 4, pp. 494–501, 2020, doi: 10.1016/j.pnsc.2020.06.005.
- [54] T. H. Aneem, S. K. Saha, R. A. Jahan, S. Y. Wong, X. Li, and M. T. Arafat, "Effects of organic modifiers and temperature on the synthesis of biomimetic carbonated hydroxyapatite," *Ceramics International*, vol. 45, no. 18, pp. 24717–24726, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2019.08.211.
- [55] W. Ma, Z. Lu, and M. Zhang, "Investigation of structural transformations in nanophase titanium dioxide by Raman spectroscopy," *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, vol. 66, no. 6, pp. 621–627, 1998, doi: 10.1007/s003390050723.
- [56] J. Jeong, J. H. Kim, J. H. Shim, N. S. Hwang, and C. Y. Heo, "Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration," *Biomaterials Research*, vol. 23, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1186/s40824-018-0149-3.
- [57] S. Vargas-Villanueva, D. A. Torres-Ceron, S. Amaya-Roncancio, I. D. Arellano-Ramírez, J. S. Riva, and E. Restrepo-Parra, "Study of the incorporation of S in TiO₂/SO₄²⁻ Coatings produced by PEO process through XPS and DFT," *Applied Surface Science*, vol. 599, no. May, 2022, doi: 10.1016/j.apsusc.2022.153811.
- [58] W. S. W. Harun *et al.*, "A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials," *Ceramics International*, vol. 44, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 1250–1268, Feb. 01, 2018. doi: 10.1016/j.ceramint.2017.10.162.
- [59] Z. Q. Yao *et al.*, "Synthesis and properties of hydroxyapatite-containing porous titania coating on ultrafine-grained titanium by micro-arc oxidation," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 7, pp. 2816–2825, 2010, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2009.12.053.
- [60] M. C. Kuo and S. K. Yen, "The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature," *Materials Science and Engineering C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 153–160, May 2002, doi: 10.1016/S0928-4931(02)00026-7.
- [61] J. zhi Chen, Y. long Shi, L. Wang, F. ying Yan, and F. qiang Zhang, "Preparation and properties of hydroxyapatite-containing titania coating by micro-arc oxidation," *Mater Lett*, vol. 60, no. 20, pp. 2538–2543, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.MATLET.2006.01.035.

- [62] R. Uribe, A. Uvillús, L. Fernández, O. Bonilla, A. Jara, and G. González, "Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite on Stainless Steel Coated with Tantalum/Tantalum Nitride Using Simulated Body Fluid as an Electrolytic Medium," *Coatings*, vol. 12, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/coatings12040440.
- [63] JAMIESON JC and OLINGER B, "Pressure-Temperature Studies of Anatase, Brookite Rutile, and TiO₂(li). a Discussion," *American Mineralogist*, vol. 54, no. 9–10, pp. 1477–1481, 1969.
- [64] S. Tanaka, N. Hirose, and T. Tanaki, "Effect of the Temperature and Concentration of NaOH on the Formation of Porous TiO₂," *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 152, no. 12, p. C789, 2005, doi: 10.1149/1.2073207.
- [65] M. A. Bassi, M. A. Lopez, L. Confalone, R. M. Gaudio, L. Lombardo, and D. Lauritano, "Enhanced Reader.pdf," *Nature*, vol. 388, pp. 539–547, 2020.
- [66] L. Y. Cui *et al.*, "Degradation mechanism of micro-arc oxidation coatings on biodegradable Mg-Ca alloys: The influence of porosity," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 695, pp. 2464–2476, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2016.11.146.
- [67] K. W. Widantha, E. A. Basuki, E. Martides, and B. Prawara, "Effect of hydroxyapatite/alumina composite coatings using HVOF on immersion behavior of NiTi alloys," *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 36, no. 3, pp. 375–384, Sep. 2021, doi: 10.1177/08853282211022531/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_08853282211022531-FIG2.JPEG.
- [68] R. Uribe, A. Uvillús, L. Fernández, O. Bonilla, A. Jara, and G. González, "Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite on Stainless Steel Coated with Tantalum/Tantalum Nitride Using Simulated Body Fluid as an Electrolytic Medium," *Coatings 2022, Vol. 12, Page 440*, vol. 12, no. 4, p. 440, Mar. 2022, doi: 10.3390/COATINGS12040440.
- [69] F. Peng, D. Wang, Y. Tian, H. Cao, Y. Qiao, and X. Liu, "Sealing the Pores of PEO Coating with Mg-Al Layered Double Hydroxide: Enhanced Corrosion Resistance, Cytocompatibility and Drug Delivery Ability," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 8167, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08238-w.
- [70] X. Zhang, Y. Wu, Y. Lv, Y. Yu, and Z. Dong, "Formation mechanism, corrosion behaviour and biological property of hydroxyapatite/TiO₂ coatings fabricated by plasma electrolytic oxidation," *Surface and Coatings Technology*, vol. 386, no. January, p. 125483, 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.125483.
- [71] H. Wang, J. K. Lee, A. Moursi, and J. J. Lannutti, "Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite in vitro," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 67, no. 2, pp. 599–608, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10538.
- [72] S. Amruthaluru, D. V. Pillai, H. Sampathirao, and N. Rameshbabu, "Development of plasma electrolytic oxidation coatings on Ti-42Al-2V-2Nb alloy," *Mater Today Proc*, vol. 46, pp. 1056–1060, 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2021.01.420.
- [73] P. Molaeipour, S. R. Allahkaram, and S. Akbarzadeh, "Corrosion inhibition of Ti6Al4V alloy by a protective plasma electrolytic oxidation coating modified with boron carbide

- nanoparticles," *Surface and Coatings Technology*, vol. 430, no. July 2021, p. 127987, 2022, doi: 10.1016/j.surfcoat.2021.127987.
- [74] S. Ban and S. Maruno, "Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid," 1998.
- [75] A. O. Peo *et al.*, "Silicate and Hydroxide Concentration Influencing the Properties," pp. 1–21, 2022.
- [76] S. Durdu, Ö. F. Deniz, I. Kutbay, and M. Usta, "Characterization and formation of hydroxyapatite on Ti6Al4V coated by plasma electrolytic oxidation," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 551, pp. 422–429, 2013, doi: 10.1016/j.jallcom.2012.11.024.
- [77] Z. Chen, G. Zhang, and F. Bobaru, "The Influence of Passive Film Damage on Pitting Corrosion," *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 163, no. 2, pp. C19–C24, Nov. 2016, doi: 10.1149/2.0521602JES/XML.
- [78] Y. Wang, W. Zhang, and Y. Zheng, "Experimental Study on Corrosion Fatigue Performance of High-Strength Steel Wire with Initial Defect for Bridge Cable," *Applied Sciences 2020, Vol. 10, Page 2293*, vol. 10, no. 7, p. 2293, Mar. 2020, doi: 10.3390/APP10072293.
- [79] M. Ashok, S. N. Kalkura, N. M. Sundaram, and D. Arivuoli, "Growth and characterization of hydroxyapatite crystals by hydrothermal method," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 18, no. 5, pp. 895–898, May 2007, doi: 10.1007/s10856-006-0070-5.