

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías “El Politécnico”

**Recubrimientos Biofuncionales de Quitosano e Hidroxiapatita
sobre superficies de Ti6AL4V para aplicaciones en prótesis
metálicas**

Christian Mateo Hernández Pillajo

Ingeniería Química

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías “El Politécnico”

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Recubrimientos Biofuncionales de Quitosano e Hidroxiapatita sobre
superficies de Ti6Al4V para aplicaciones en prótesis metálicas**

Christian Mateo Hernández Pillajo

Nombre del Profesor, Título académico

José Álvarez Barreto, PhD.

Marco León, M.Sc.

Daniela Almeida, Dr.-Ing.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Christian Mateo Hernández Pillajo

Código: 00132808

Cédula de identidad: 1003065164

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue desarrollar recubrimientos biofuncionales de Quitosano e Hidroxiapatita sobre sustratos de Ti6Al4V. El método propuesto para la fabricación del recubrimiento multicapa está basado en la deposición de HAp mediante HVOF como técnica de termorociado y la deposición de quitosano mediante electrodeposición. El proceso de HVOF consistió en aplicar un total de 60 pasadas y fue caracterizado mediante Difracción de Rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El recubrimiento exhibió un alto grado de cristalinidad (68%) con un tamaño de poro promedio de $(38 \pm 4.6) \mu\text{m}$, sin la presencia de fases secundarias que afecten la integridad mecánica del recubrimiento. Para la electrodeposición de quitosano se aplicó condiciones de voltaje y tiempo de 3V, 4V y 5V, 20 y 30 minutos respectivamente, donde se evidenció, mediante SEM, la formación de múltiples capas de quitosano depositadas de manera homogénea a lo largo de la superficie del sustrato. En base a este análisis se determinó que las condiciones más adecuadas para la electrodeposición se logran a 5V y 30 min. Se observó, además, que la variación de las condiciones de electrodeposición influye en el tamaño de poro del recubrimiento de quitosano, generando poros en un rango de 30-40 μm , lo cual lo hace apropiado en aplicaciones de encapsulación y liberación de fármacos, tales como Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) para la estimulación de crecimiento óseo en prótesis metálicas.

Palabras clave: Ti6Al4V, Recubrimientos Biofuncionales, Hidroxiapatita, Quitosano, HVOF, Electrodeposición, Prótesis.

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop biofunctional coatings of Chitosan and Hydroxyapatite on Ti6Al4V substrates. The proposed method for the fabricated multilayer coating is based on the deposition of HAp by HVOF as a thermal spray technique and the deposition of chitosan by electrodeposition. The HVOF process consisted of applying a total of 60 passes and was characterized by X-ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The coating exhibited a high degree of crystallinity (68%) with an average pore size of $(38 \pm 4.6) \mu\text{m}$, without the presence of secondary phases that affect the mechanical integrity of the coating. For the chitosan electrodeposition process, we applied voltage and time conditions of 3V, 4V y 5V, 20 y 30 minutes, respectively, where it was evidenced, through SEM, the formation of multiple layers of chitosan deposited in a homogeneous way along the surface of the substrate. Based on this analysis, it was determined that the most suitable conditions for electrodeposition are achieved at 5V and 30 min. It was also observed that the variation of the electrodeposition conditions influences the pore size of the chitosan coating, generating pores in a range of 30-40 μm , which makes it suitable in applications of encapsulation and release of different drugs, such as Bone Morphogenetic Proteins (BMP) for the stimulation of bone growth in metal prostheses.

Key words: Ti6Al4V, Biofunctional Coatings, Hydroxyapatite, Chitosan, Thermal Spray, HVOF, Electrodeposition, Prosthesis.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
TABLA DE CONTENIDO.....	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. METODOLOGÍA	13
2.1 Obtención y Preparación de las Muestras	13
2.2 Preparación Superficial (Granallado)	13
2.3 Recubrimiento de Hidroxiapatita por el método HVOF (High Velocity Oxygen Fuel)	14
2.4 Preparación de Quitosano	16
2.5 Electrodeposición de Quitosano	16
2.5 Funcionalización de Quitosano.....	17
2.6 Caracterización Recubrimiento de Hidroxiapatita y Quitosano	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1 Análisis del Recubrimiento de Hidroxiapatita.....	19
3.1.1 Caracterización Morfológica del recubrimiento de Hidroxiapatita	19
3.1.2 Análisis de las fases y cristalinidad del recubrimiento de HAp por XRD.....	22
3.2 Corroboración del Recubrimiento de QT mediante la electrodeposición de QT funcionalizado.....	23
3.3 Análisis del Recubrimiento de Quitosano.....	25
3.3.1 Caracterización del Recubrimiento de Quitosano mediante SEM.....	25
3.3.2 Análisis del Tamaño de Poro en los recubrimientos de HAp y QT	28
4. CONCLUSIONES	32
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros para el Granallado de las superficies de Ti6Al4V	14
Tabla 2. Parámetros para el proceso de HVOF.....	15
Tabla 3. Variables del Proceso de Electrodeposición.....	16
Tabla 4. Tamaño Promedio de Poro para diferentes condiciones de Tiempo y Voltaje de Electrodeposición de Quitosano.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema General para los Recubrimientos Biofuncionales de HAp y QT en la superficie de Ti6Al4V.....	13
Figura 2. Proceso de Termorociado por HVOF sobre los sustratos de Ti6Al4V	15
Figura 3. Esquema del sistema de electrodeposición.....	17
Figura 4. Comparación del Recubrimiento de HAp visto a 100x: a) Jiménez, 2020 b) Investigación Presente. LVSED, Barra de Calibración: 100 μ m	20
Figura 5. Análisis mediante SEM de la Presencia de Porosidad y Fusión en el Recubrimiento de HAp: a) Zonas de Porosidad vistas a 1000x, b) Esferas de HAp fusionadas con la superficie de Ti6Al4V vistas a 2000x. LVSED, Barra de Calibración: 10 μ m	21
Figura 6. Difractograma del Termorociado por HVOF del recubrimiento de HAp.	22
Figura 7. Comparación del Recubrimiento aplicando Electrodeposición bajo una cámara UV (excitación a 365nm) cuando: a) Quitosano Funcionalizado, b) Quitosano sin Funcionalizar.....	23
Figura 8. Comparación del Recubrimiento mediante Electrodeposición cuando: a) 5V y 20 min b) 5V y 30 min	24
Figura 9. Comparación del Recubrimiento de HAp vs Electrodeposición vistos a 100x a) HAp b) Electrodeposición de Quitosano LVSED, Barra de Calibración: 100 μ m.....	25
Figura 10 Caracterización de la Electrodeposición mediante SEM a 500x y 1000x. (a) 3V y 20min, (b) 3V y 30min, (c) 4V y 20min, (d) 4V y 30min (e) 5V y 20min, (f) 5V y 30min. LVSED, Barra de Calibración: 50 μ m	26
Figura 11. Histograma del Tamaño de Poro en el Recubrimiento de HAp	29
Figura 12. Histograma del Tamaño de Poro para el recubrimiento de Quitosano cuando el tiempo de Electrodeposición es: (a) 20 minutos, (b) 30 minutos.....	30

1. INTRODUCCIÓN

Las aleaciones metálicas actualmente son los materiales más utilizados en la fabricación de prótesis e implantes para diferentes aplicaciones óseas, siendo uno de los más comunes el Ti6Al4V. Uno de los factores más importantes que deben cumplir estas aleaciones metálicas es una buena resistencia a la corrosión al momento que estén inmersos en un medio hostil, como es el cuerpo humano, y poder mantener una buena estabilidad térmica a una temperatura de 37°C (D Zujur & Álvarez Barreto, 2016). La corrosión es un factor importante ya que puede generar óxidos en la superficie del metal, lo cual puede producir diversas reacciones en los tejidos, ocasionando la falla del implante.

Un problema que se presenta usualmente en las prótesis metálicas es la reacción del tejido en contacto con el biomaterial, lo cual puede desencadenar en el rechazo del dispositivo implantado debido a una reacción extraña del cuerpo (Oshida, 2013). La superficie del biomaterial juega un papel importante en la interacción biológica, siendo esta la única parte que se encuentra en contacto directo con el tejido humano. También, las propiedades de la superficie, como la topografía, son importante porque puede afectar la interacción con el tejido circundante (Balza et al., 2013). Por ende, un componente crucial para que exista una buena adhesión celular a la superficie del implante, es lograr bioactivar la superficie metálica por medio de dos enfoques importantes: tratamientos superficiales para modificar la topografía y también la aplicación de recubrimientos bioactivos. Otro problema que han presentado estos materiales son dadas por dos limitaciones: la primera es la bioactividad y la segunda es la susceptibilidad de la superficie a la oxidación por colonización bacteriana. En el caso de los implantes dentales, se ha visto que aproximadamente el 52,5 % de estos implantes fallan debido a infecciones bacterianas (Denise Zujur et al., 2015).

Se ha estudiado cerca de 1096 casos de pacientes con artroplastia total de cadera pasado cinco años desde la colocación del implante. Se observó que la falla del dispositivo se debió a varios efectos relacionados a la mala práctica quirúrgica y a la escasa regeneración de hueso y cartílago (Olmstead, 2014). Según el Instituto de Estadísticas y Censos, INEC, en Ecuador, en el año 2014 se registraron alrededor de 9 mil fracturas de diferentes miembros como cráneo y huesos faciales, fémur, cuello, y pelvis, entre otros; muchas de estas fracturas requieren la aplicación de prótesis metálicas, por lo que se puede apreciar que existe una alta demanda de prótesis e implantes óseos que necesitan aumentar su desempeño y dar un mejor estilo de vida al paciente (INEC, 2014). Mediante tratamientos superficiales se puede disminuir la tasa de falla del implante, así como aumentar el tiempo de vida del mismo.

La Hidroxiapatita (Hap, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ha sido tema de estudio por muchos investigadores, al ser considerada uno de los materiales más apropiados como recubrimientos superficiales sobre prótesis de titanio, debido a su composición química, alta bioactividad y su capacidad de mejorar la osteointegración, proceso de conexión directa entre el hueso vivo y el implante (Branemark, 2005). Entre los procesos de deposición de HAp en superficies metálicas, el High Velocity Oxygen Fuel (HVOF) representa una interesante alternativa para realizar recubrimientos estables debido a que la temperatura del proceso ($< 3200\text{ }^\circ\text{C}$) es menor en comparación a otras técnicas como el plasma spray; además, exhibe altas velocidades (en el régimen supersónico), haciendo posible presentar estructuras cristalinas que puedan generar una gran estabilidad y buenas propiedades mecánicas a largo tiempo (Jiménez, 2020). Sin embargo, un problema usual que presentan este tipo de recubrimientos cerámicos es la presencia de esfuerzos térmicos durante el proceso de HVOF, que puede conducir a grietas en la interface y comprometer la adherencia del recubrimiento (Li et al., 2002). No solo se han reportado problemas por esfuerzos térmicos, sino también pueden producirse reacciones

químicas entre el material cerámico y el metal, que puede reducir la adhesión célula-sustrato (Katti, 2004). Es por eso que los biopolímeros como la pectina, quitina, celulosa y el quitosano también se han estudiado ampliamente en la generación de recubrimientos sobre sustratos metálicos (Vartiainen et al., 2014). Entre los biopolímeros más utilizados como recubrimientos sobre sustratos metálicos y para aplicaciones de regeneración de tejidos, se encuentra el quitosano (QT). Este es un polisacárido que proviene del exoesqueleto de crustáceos marinos y paredes celulares de hongos. Debido a su baja tasa de degradación, el quitosano permite tener un enfoque importante en el desempeño de la adherencia en el sustrato, ya que posee la ventaja de poder ser enlazado a superficies metálicas mediante varios métodos (Di Martino et al., 2005). Los métodos que más se han utilizado son: la adsorción e interacción química (GERGELY et al., 2000).

El quitosano de igual manera ha sido estudiado como precursor para aplicaciones en crecimiento de hueso y cartílago ya que tiene la posibilidad de funcionalizarse con diversas moléculas bioactivas y la capacidad de ajustar perfiles de liberación controlada con diferentes biomoléculas (Bumgardner et al., 2007). Numerosos estudios han demostrado que el quitosano como film y gel puede mejorar considerablemente la regeneración de hueso debido a su capacidad de encapsular factores de crecimiento que a la vez incrementen la migración celular y mejoren la osteointegración de la prótesis (Denise Zujur et al., 2015).

Actualmente se han propuesto nuevos métodos de recubrimientos para sustratos de titanio a base de quitosano. Uno de ellos es el método de electrodeposición, una técnica versátil y eficiente para fabricar películas tanto delgadas como gruesas y recubrimientos en áreas de mucho interés. Este proceso consiste en crear un campo eléctrico con la finalidad de emplear partículas cargadas eléctricamente y depositarlas en una superficie determinada. La

electrodeposición, a diferencia de otras técnicas de deposición, permite realizar el mismo proceso en un menor tiempo, en condiciones de temperatura ambiente y además no requiere agentes de entrecruzamiento (Z. Wang et al., 2014). La electrodeposición de quitosano ha sido recientemente estudiada en la Universidad San Francisco de Quito, sobre superficies de Ti6Al4V, demostrando ser una tecnología con alto potencial, pero su aplicación sobre recubrimientos de hidroxiapatita debe ser aún estudiada (Álvarez, 2020).

Por lo tanto, el presente estudio busca desarrollar recubrimientos biofuncionales, a base de quitosano e hidroxiapatita, para superficies de Ti6Al4V. Para esto, se depositó HAp sobre la superficie de titanio por el método de HVOF y posteriormente se evaluó la electrodeposición de QT sobre las muestras recubiertas de hidroxiapatita, con la finalidad de encontrar las condiciones más adecuadas de deposición. La importancia de esta investigación es otorgar un mejor desempeño de implantes a base de Ti6Al4V mediante la aplicación de novedosos métodos superficiales, para de esta manera, corregir los múltiples problemas clínicos que se han reportado.

2. METODOLOGÍA

A continuación, se presenta un esquema general de las modificaciones superficiales que se realiza en los sustratos de Ti6Al4V. Esto permite ejemplificar los procesos que se llevan a cabo para generar recubrimientos biofuncionales a base de quitosano e hidroxiapatita.

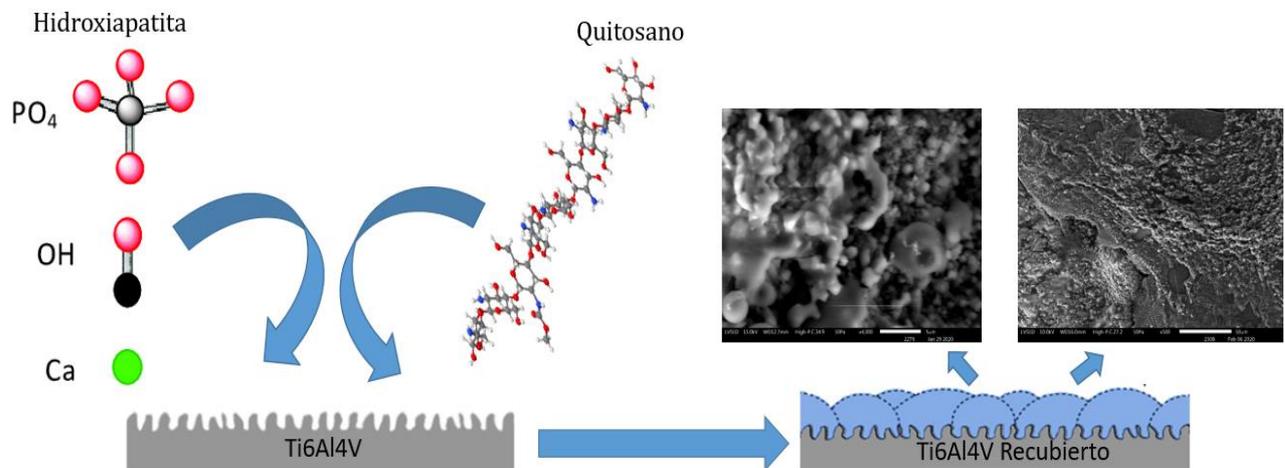


Figura 1. Esquema General para los Recubrimientos Biofuncionales de HAp y QT en la superficie de Ti6Al4V.

2.1 Obtención y Preparación de las Muestras

Las muestras fueron obtenidas a partir de probetas cilíndricas de una aleación de Ti6Al4V, de $\frac{1}{2}$ pulgada de diámetro y 1 pie de longitud. Esta fue seccionada en discos de 8mm de espesor por medio de corte por electroerosión por hilo.

2.2 Preparación Superficial (Granallado)

Con la finalidad de obtener una rugosidad superficial cercana a las de las prótesis comerciales, de aproximadamente 3-5 μ m (Álvarez, 2020), se realizó el proceso de granallado o sandblasting. El proceso consistió en utilizar polvo de Alúmina (Al_2O_3) con un tamaño de partícula entre 500-600 μ m, las mismas que fueron colocadas en la máquina de granallado y

posteriormente se fijó los parámetros mencionados en la Tabla 1. Posteriormente se dispuso las muestras en un portamuestras metálico, y este se colocó dentro de la cámara de granallado, donde se depositaron las partículas de alúmina sobre los sustratos de titanio. Luego del granallado, las muestras fueron lavadas en ultrasonido durante 15 minutos, para eliminar cualquier impureza presente en el material.

Tabla 1. Parámetros para el Granallado de las superficies de Ti6Al4V

Variables	
Presión de la Cámara [MPa]	0.5
Distancia de Aplicación [m]	0.1
Orientación [°]	90
Tiempo de Granallado [s]	10

2.3 Recubrimiento de Hidroxiapatita por el método HVOF (High Velocity Oxygen Fuel)

El High Velocity Oxygen Fuel, HVOF, es una técnica de termorociado que consiste en la proyección de material sobre la superficie del sustrato (Henaó et al., 2018). Para esto se necesita calentar el material que será termorociado y posteriormente este es acelerado por una tobera, lo cual permite que se llegue a velocidades supersónicas, mayores a 343 m/s (Lima et al., 2005). En esta investigación, se utilizó partículas de hidroxiapatita, donadas por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México, las cuales son depositadas sobre la superficie de titanio y a la vez genera una capa de recubrimiento. Para este proceso fue necesario seleccionar el gas de llama que permita lograr una mejor calidad en el recubrimiento, por lo cual, en base a estudios anteriores, se determinó

que el propano genera buenos resultados (Jiménez, 2020). Posterior a esto, se introdujo el polvo de HAp en la pistola y se controló la presión de ambos gases (oxígeno y propano) los cuales deben estar a 3 bares, para asegurar que el polvo fluya de manera efectiva durante el proceso de HVOF. Los parámetros utilizados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros para el proceso de HVOF

Parámetro	Valor
Temperatura de Pre calentamiento del polvo [°C]	150
Temperatura de Pre calentamiento del alimentador [°C]	100
Temperatura de Pre calentamiento de la muestra [°C]	50
Distancia de Aplicación [m]	0.2
Velocidad del Alimentador [rpm]	9



Figura 2. Proceso de Termorociado por HVOF sobre los sustratos de Ti6Al4V

2.4 Preparación de Quitosano

El quitosano (Medio peso molecular, Sigma, 448887) fue disuelto en 0.25% v/v ácido acético, para una concentración final de 0.5% p/v. Luego, el pH se llevó a 5.5, y la solución se filtró mediante un filtro de papel grado 4 a condiciones de vacío, se mantuvo en refrigeración a 4°C, hasta su uso.

2.5 Electrodeposición de Quitosano

Para el proceso de electrodeposición, se diseñó una estructura mecánica (Figura.3) la cual permite colocar la muestra de titanio, el electrodo de platino. Para esto fue necesario desarrollar un sistema donde se pueda acoplar de manera fija los electrodos, procurando que su distancia este entre 5-10 mm, manteniendo así finalmente una distancia entre electrodos de 5 mm lo cual entra en el rango propuesto. Se procuró que la estructura sea adaptable para distintos experimentos y se utilizó técnicas de impresión 3D para la manufactura de las piezas de acople para los electrodos de titanio y platino. Posterior a eso, los sustratos de titanio, con el recubrimiento de hidroxiapatita, fueron sumergidos en 150 ml de la solución de quitosano, en la que se aplicó un campo eléctrico mediante una fuente, con la finalidad de mantener constantes el voltaje y la corriente por un tiempo determinado. En la Tabla 3 se resumen las variables de entrada en la electrodeposición. Al finalizar este proceso, las muestras fueron lavadas, congeladas y liofilizadas para su posterior caracterización.

Tabla 3. Variables del Proceso de Electrodeposición

Variable	Valores
Voltaje [V]	3, 4 y 5
Tiempo [min]	20 y 30
Concentración de Quitosano [%]	0.5

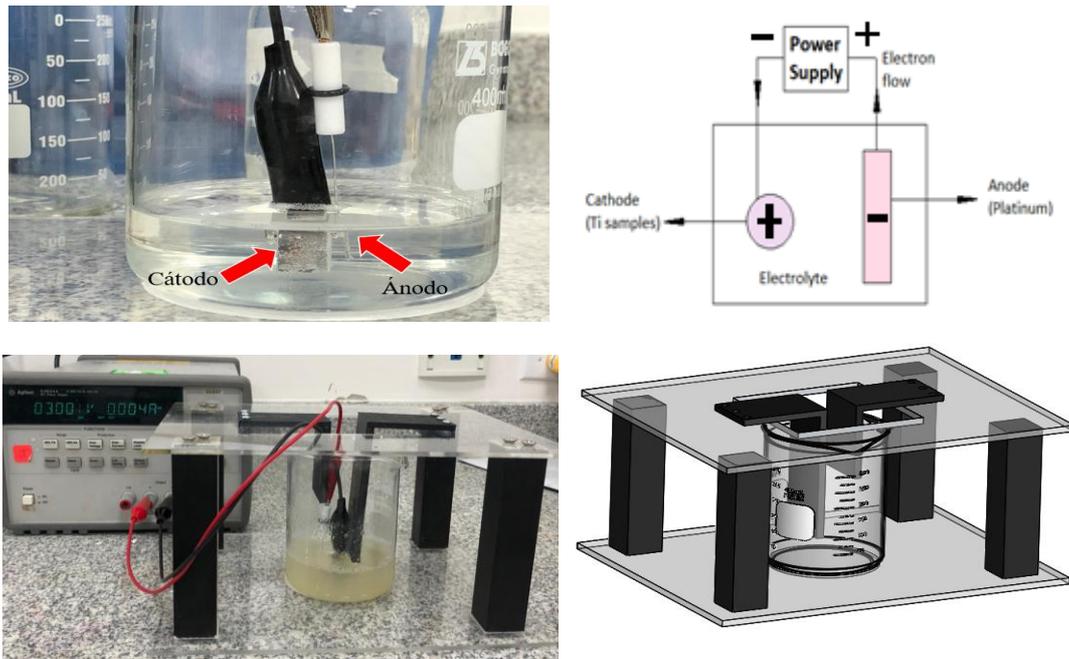


Figura 3. Esquema del sistema de electrodeposición

2.5 Funcionalización de Quitosano

El quitosano es funcionalizado para hacerlo fluorescente y así corroborar visualmente su electrodeposición y la homogeneidad del recubrimiento a través de la superficie. Esto se hizo utilizando anhídrido 1,8-naftálico (NAN), según el método desarrollado en el Laboratorio de Biomateriales-USFQ (Rodríguez, 2020).

2.6 Caracterización Recubrimiento de Hidroxiapatita y Quitosano

La caracterización de los sustratos recubiertos con HAp consistió en analizar su morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) a magnificaciones de 100x, 500x y 1000x para observar si la estructura encontrada es congruente con procedimientos de HVOF a condiciones similares. Las muestras fueron analizadas con el Microscopio Electrónico JEOL JSM-IT300LA a 15 kV y 50 Pa, como parámetros de caracterización. Luego de esto se realizó Difracción de Rayos-X al recubrimiento utilizando la técnica de Incidencia Rasante,

con un ángulo de difracción de 2θ en un rango de 10-80°, a un step size de 0.05°, y a un step time de 2.5 s, donde se quiere determinar las fases presentes en el proceso de HVOF y cuantificar la cristalinidad del recubrimiento. Para determinar cuáles picos son Hidroxiapatita, se utilizó el software Qualx el cual permite conocer las fases de interés y normalizar los datos del Difractograma. Los resultados del XRD fueron comparados con la base de datos del programa y de esta manera se pudo conocer a que ángulo 2θ se encuentran específicamente las fases de HAp.

Posteriormente se utilizó el software Origin Pro para graficar el espectro, seleccionar los picos que son efectivamente el material de interés y calcular la cristalinidad del recubrimiento. Para calcular la cristalinidad se debe seleccionar los picos que representen las fases de HAp (fase cristalina) y el software integra el área de cada uno de los picos. El grado de cristalinidad, está dado por la siguiente relación:

$$\text{Grado de Cristalinidad \%} = \frac{\text{Área Picos Cristalinos}}{\text{Área de todos los Picos (Cristalinos + Amorfos)}} \times 100$$

Donde los picos amorfos son los picos anchos, los cuales representan que hay presencia de fases secundarias en el recubrimiento debido al termorociado por HVOF y los delgados (Sharp Peaks) representan los picos cristalinos.

Las muestras electrodepositadas a diferentes condiciones de tiempo y voltaje fueron analizadas mediante SEM a magnificaciones de 100x, 500x y 1000x y utilizando los mismos parámetros de caracterización en el Microscopio Electrónico (15kV y 50 Pa). Posteriormente se realizó un análisis del tamaño de poro para cada condición de tiempo y voltaje, para observar

la dependencia de las condiciones de electrodeposición en la porosidad del recubrimiento. Para evaluar la porosidad de ambos recubrimientos se analizó los sustratos a magnificaciones de 500x y 1000x para obtener los tamaños de poro. La medición del tamaño de poro se realizó mediante análisis por computador, utilizando el Software ImageJ. Para el análisis estadístico, se graficó histogramas para observar la distribución de la porosidad en los recubrimientos y determinar un tamaño de poro promedio en base a varias mediciones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio, se llevó a cabo diferentes experimentos para evaluar los recubrimientos de HAp y Quitosano en muestras de Ti6Al4V. El primer análisis consistió en la caracterización de la morfología del recubrimiento de HAp, para evaluar las ventajas y desventajas de los parámetros de HVOF utilizados. El segundo análisis es caracterizar el recubrimiento de Quitosano y determinar cuáles son las condiciones de Electrodeposición que generan una morfología más uniforme a lo largo de los sustratos y a la vez verificar mediante la funcionalización de Quitosano que tan homogéneo es el recubrimiento.

3.1 Análisis del Recubrimiento de Hidroxiapatita

3.1.1 Caracterización Morfológica del recubrimiento de Hidroxiapatita.

La caracterización de la morfología del recubrimiento se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), para observar la presencia de una capa de Hidroxiapatita sobre las muestras de titanio que anteriormente fueron granalladas para incrementar su rugosidad específica. Este recubrimiento, como se muestra en la Figura.4, es comparado con el estudio de (Jiménez, 2020), donde se utilizó los mismos parámetros de HVOF y el propósito de este

análisis es observar si este protocolo de termorociado es replicable, y además que genere morfologías de HAp similares. Esta comparación permite verificar que efectivamente el polvo de HAp se depositó sobre la superficie de titanio y al mismo tiempo que su morfología muestre la homogeneidad del recubrimiento. En la Figura.4, se puede observar que ambas superficies muestran la presencia de Hidroxiapatita y sus morfologías tienen una alta similitud.

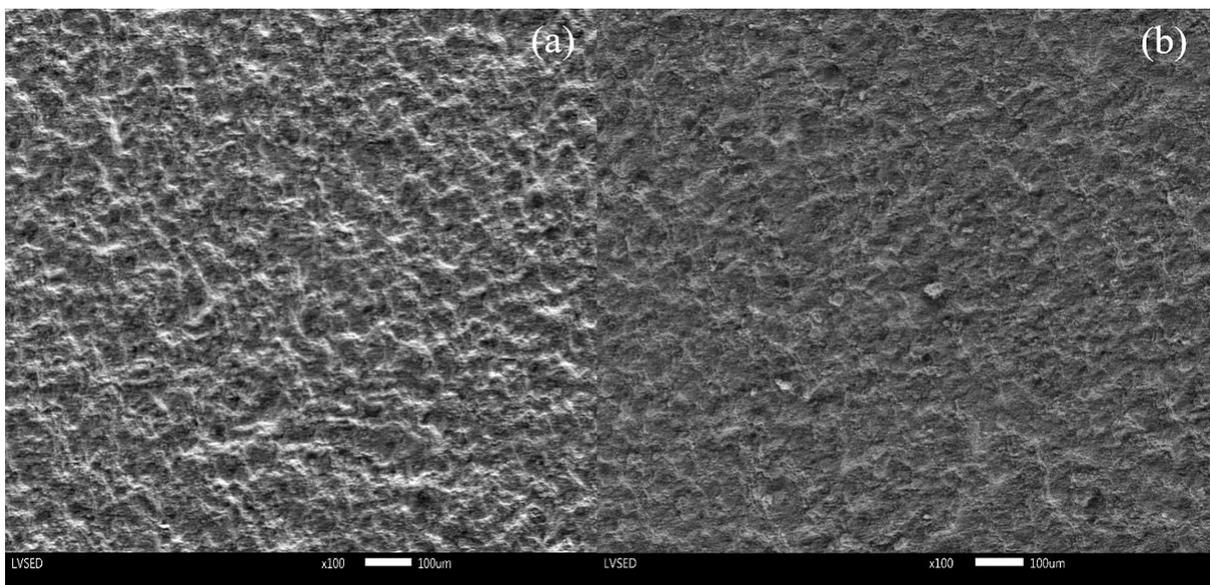


Figura 4. Comparación del Recubrimiento de HAp visto a 100x: a) Jiménez, 2020
b) Investigación Presente. LVSED, Barra de Calibración: 100µm

El recubrimiento de HAp, como se muestra en la Figura.5(a), indica las zonas donde hay presencia de porosidad en el recubrimiento. Es importante mencionar que el recubrimiento de HAp es irregular a lo largo de la superficie de titanio, ya que existen zonas donde claramente se puede apreciar protuberancias debidas a la aglomeración del polvo de HAp, pero que a la vez no afectan en la integridad del recubrimiento. Una manera eficaz para determinar que el recubrimiento de HAp se llevó a cabo satisfactoriamente, es evaluando la fusión parcial de la Hidroxiapatita en la superficie de Titanio. Un indicador para evaluar la fusión del material sobre los sustratos de Titanio, es la presencia de burbujas con alta esfericidad. En este estudio

se comparó nuestro análisis con el de (Harun et al., 2018), donde se utilizó la misma técnica de termorociado, con la finalidad de corroborar que nuestra morfología y la presencia de microesferas, es el resultado de la fusión de HAp aplicando la técnica de HVOF.

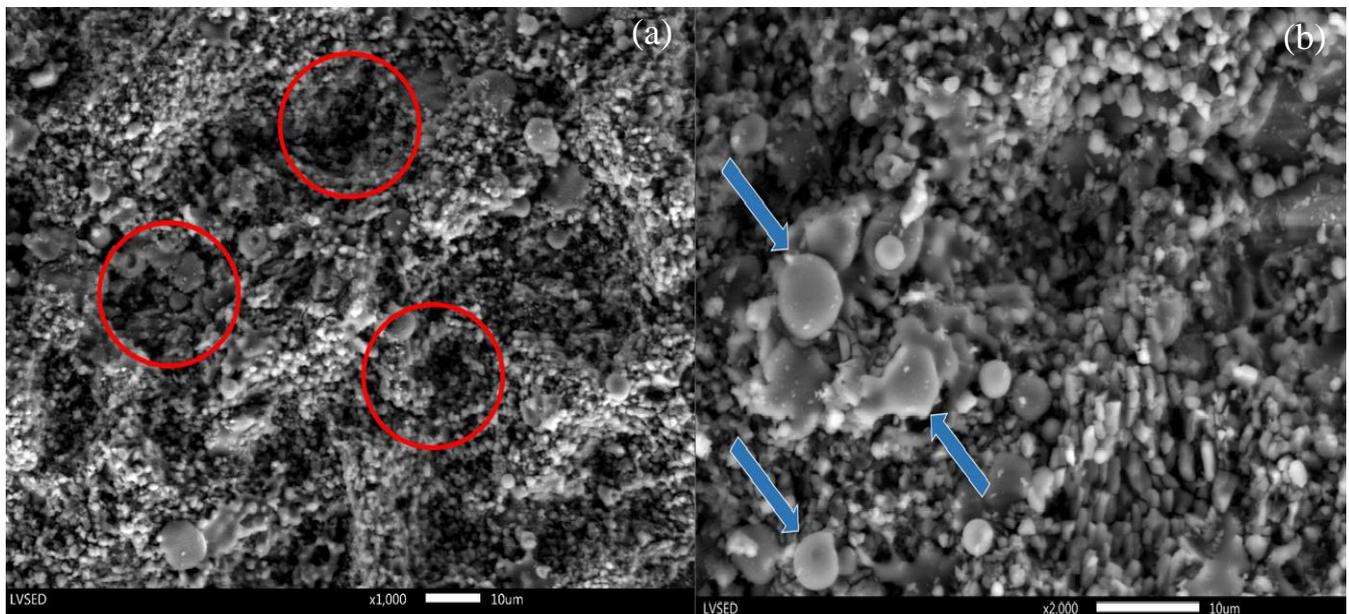


Figura 5. Análisis mediante SEM de la Presencia de Porosidad y Fusión en el Recubrimiento de HAp: a) Zonas de Porosidad vistas a 1000x, b) Esferas de HAp fusionadas con la superficie de Ti6Al4V vistas a 2000x. LVSED, Barra de Calibración: 10µm

Como se muestra en la Fig. 5(b), claramente la morfología del recubrimiento presenta diferentes microestructuras, mostrando poros y aglomeración de partículas de HAp que no se fusionaron con la superficie de Ti6Al4V durante el termorociado. Esto se debe a que el polvo no tuvo una correcta fluidez y por tanto no se logró una óptima coalescencia de las partículas HAp en el proceso de HVOF, a pesar de que se procuró mantener el alimentador a una temperatura de 110°C para evitar que el polvo se humedezca. Es importante observar que la presencia de partículas esféricas debido a la fusión de ambos materiales, juega un rol importante ya que aumenta la bioactividad de la HAp, y se ha demostrado que la presencia de estas estructuras mejoran la fijación ósea (Tsuchiya et al., 2008) .

3.1.2 Análisis de las fases y cristalinidad del recubrimiento de HAp por XRD.

En la Figura.6 se muestra los resultados del análisis de Difracción de Rayos X (XRD) realizado sobre el recubrimiento. Los picos del espectro confirman la presencia de HAp como fase principal y de mayor importancia, corroborando de esta manera, que la técnica de HVOF exhibe una alta solubilidad de HAp en las muestras de titanio. Esto es una gran ventaja de utilizar HVOF ya que en el proceso de rociado se evita llegar a temperaturas superiores a 1350 °C, donde se ha reportado que hay presencia de terceras fases, que pueden afectar la estabilidad mecánica del recubrimiento (Henaio et al., 2018).

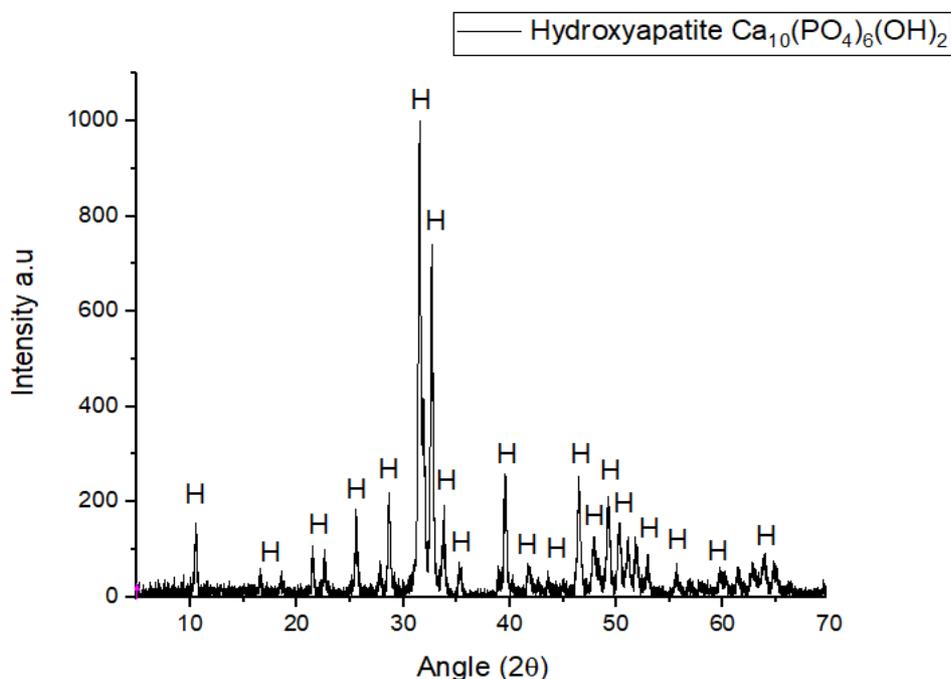


Figura 6. Difractograma del Termorociado por HVOF del recubrimiento de HAp.

La Figura.6 presenta únicamente los picos de HAp, más no fases secundarias como la TCP, TTCP o CaO. Lo que se busca al utilizar termorociado por HVOF es lograr cumplir varios requerimientos necesarios para mejorar la biocompatibilidad y la fijación del implante. Para esto el recubrimiento debe tener una correcta microestructura, baja porosidad, buena adhesión, un alto grado de cristalinidad y esto se logra optimizando los parámetros de HVOF

(Guilemany, 2005). Es importante recordar que un alto grado de cristalinidad implica que el recubrimiento tiene una buena integridad mecánica debido a que el porcentaje de fases secundarias es bajo. De acuerdo a la norma ISO 13779-2 el contenido de cristalinidad de HAp no debe ser menor al 45% y el nivel máximo permitido de otras fases cristalinas debe ser del 5%” (Lima et al., 2005). El contenido de cristalinidad de nuestro recubrimiento es del 68% lo cual refleja un alto grado de cristalinidad, por ende, es un indicador de que estamos dentro de los estándares establecidos para recubrimientos de HAp por HVOF.

3.2 Corroboración del Recubrimiento de QT mediante la electrodeposición de QT funcionalizado.

Una manera útil de observar la homogeneidad del recubrimiento es mediante la funcionalización de Quitosano. Este es un método rápido y eficaz para verificar las zonas donde el material se adhirió de mejor manera, previo a caracterizar las muestras por SEM. En la Figura.7 se puede apreciar la electrodeposición de QT funcionalizado versus QT sin funcionalizar al poner los sustratos en una cámara UV a un nivel de excitación de 365 nm.

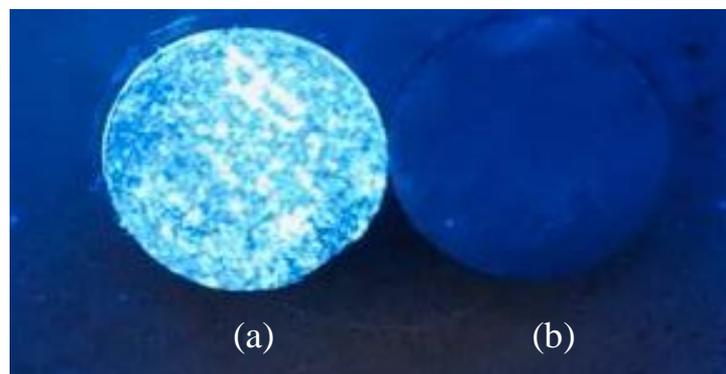


Figura 7. Comparación del Recubrimiento aplicando Electrodeposición bajo una cámara UV (excitación a 365nm) cuando: a) Quitosano Funcionalizado, b) Quitosano sin Funcionalizar

En la Figura.7 se observa claramente que la fluorescencia del recubrimiento se incrementó considerablemente al funcionalizar el Quitosano y a la vez nos permite determinar que tan bien se depositó el material. En la Figura.8, por otro lado, se compara dos sustratos electrodepositados con quitosano funcionalizado, pero a diferentes condiciones de tiempo y voltaje. En la gráfica (a) se aplicó 5V y 20 minutos y se aprecia que existen zonas donde el QT se depositó en mayor cantidad que otras. Por otro lado, la gráfica (b) muestra la electrodeposición a 5V y 30 minutos, donde se exhibe claramente que el material se depositó en mayor cantidad, en comparación a la gráfica (a), cubriendo toda la superficie de manera más homogénea, pero aun así existen zonas donde no hay presencia de QT. La funcionalización de Quitosano claramente es una forma eficiente de evaluar la homogeneidad del recubrimiento y determinar las zonas de mayor interés, al momento de la caracterización del recubrimiento mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

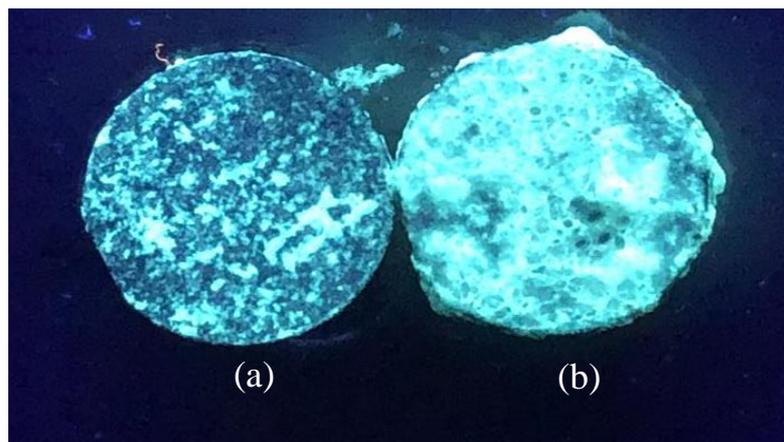


Figura 8. Comparación del Recubrimiento mediante Electrodeposición cuando: a) 5V y 20 min b) 5V y 30 min

3.3 Análisis del Recubrimiento de Quitosano

3.3.1 Caracterización del Recubrimiento de Quitosano mediante SEM.

El primer análisis que se realizó para caracterizar la superficie recubierta con quitosano, fue verificando que la técnica de electrodeposición generase un cambio significativo en la morfología superficial del recubrimiento de HAp, es decir, observar la presencia de una capa de quitosano lo suficientemente importante para que mediante SEM se pueda apreciar una diferencia significativa entre la estructura de HAp y QT. En la Figura.9 se muestra la comparación entre la morfología de HAp (gráfica a) y QT (gráfica b). Se puede observar que efectivamente se creó una capa uniforme de quitosano, cubriendo completamente toda el área de la probeta y al mismo tiempo se aprecia que no hay zonas en las que se observe la capa de HAp.

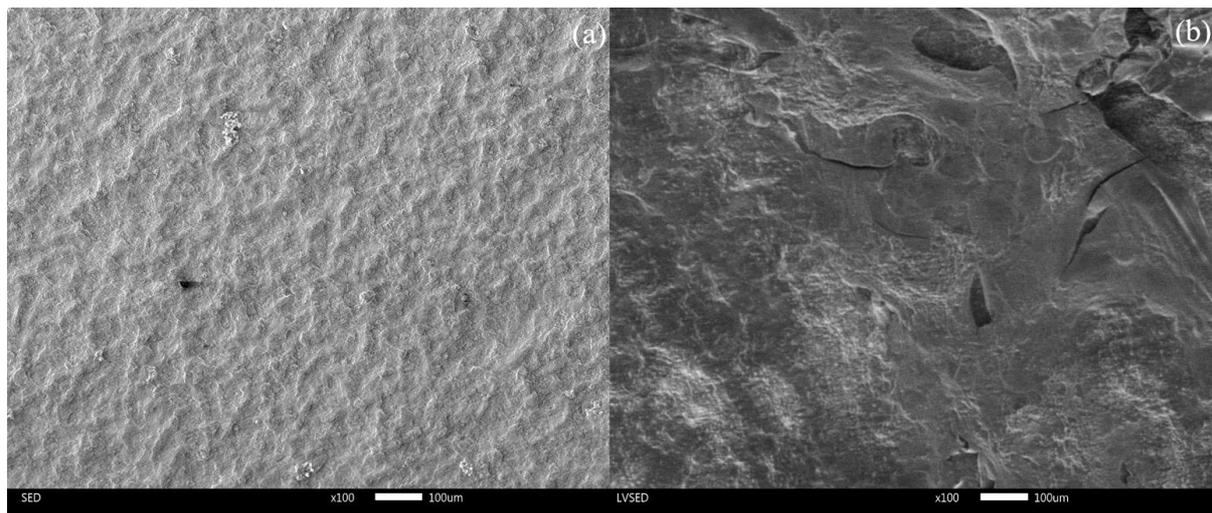


Figura 9. Comparación del Recubrimiento de HAp vs Electrodeposición vistos a 100x
a) HAp b) Electrodeposición de Quitosano LVSED, Barra de Calibración: 100µm

Luego de verificar que la técnica de electrodeposición es efectiva, se realizó la electrodeposición de las demás muestras, de acuerdo a las condiciones planteadas en la Tabla

3, el objetivo de este análisis es observar a qué condiciones se logra una mejor deposición de quitosano sobre la capa de hidroxiapatita.

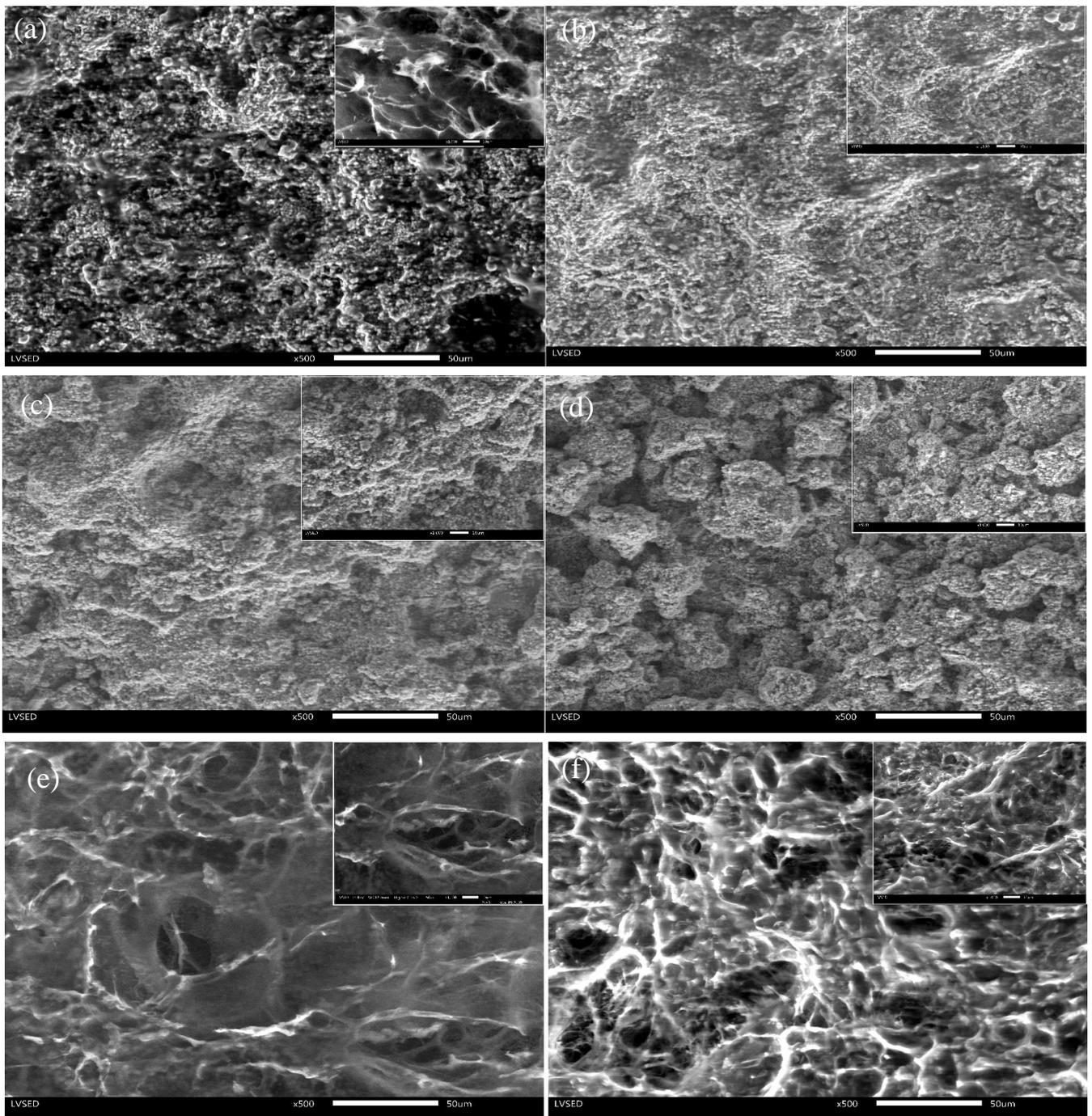


Figura 10. Caracterización de la Electrodeposición mediante SEM a 500x y 1000x. (a) 3V y 20min, (b) 3V y 30min, (c) 4V y 20min, (d) 4V y 30min (e) 5V y 20min, (f) 5V y 30min. LVSED, Barra de Calibración: 50 µm.

En la Figura.10 se muestra la caracterización del recubrimiento de Quitosano a diferentes condiciones de voltaje y tiempo. En la figura se comparó la morfología del recubrimiento, para observar el efecto que existe al incrementar el tiempo de aplicación de corriente y voltaje; al mismo tiempo se observó claramente que al aumentar el voltaje de la fuente, existe una diferencia en la morfología del quitosano depositado, y esto es más notorio al aplicar un voltaje de 5V, ya que se aprecia que el QT empezó a formar diferentes capas más gruesas y no solo se adhirió a la superficie de HAp, sino, empezó a formar una red porosa de material polimérico de manera homogénea. Este fenómeno es interesante de analizar, ya que se observó que este efecto fue más notario al aplicar 5V como condición de electrodeposición, generando una idea clara de cuáles serían las condiciones óptimas de voltaje y tiempo. En el caso de las muestras electrodepositadas a 4V, se pudo observar que el quitosano solo se adhirió a la superficie y de manera irregular, ya que existen zonas donde no hay presencia de QT e indica una deposición no homogénea. Esto no ocurrió en los sustratos depositados a 3V, ya que se aprecia un fenómeno parecido al que sucedió a 5V, donde se empezó a formar diferentes capas de Quitosano de manera regular a lo largo de la probeta.

El efecto de la variación del tiempo de electrodeposición es un factor importante ya que tiene una dependencia directa en la cantidad de Quitosano depositado y de su morfología. El cambio en la morfología más significativo ocurrió al aplicar 5V, ya que se aprecia que en la Fig.10 (e) y la Fig.10 (f), es notorio que el QT se depositó en mayor cantidad, creando así una capa con un mayor espesor y a la vez se genera una mayor fijación del Quitosano en la Hidroxiapatita, evidenciando así, una modificación en su microestructura mucho más relevante que al aplicar condiciones de 3V y 4V.

En estudios previos, donde se han utilizado técnicas de electrodeposición de quitosano sobre sustratos de Ti6Al4V, se ha demostrado que al aumentar el voltaje y tiempo de electrodeposición se incrementa la adherencia de las partículas de quitosano en la superficie de manera significativa (Álvarez, 2020). Esto se debe principalmente que a condiciones de voltaje menores a 3V, la deposición es escasa ya que el quitosano se adhiere en zonas muy localizadas, mas no sobre toda la superficie del material, evidenciando así, recubrimientos con una baja homogeneidad. La concentración de quitosano es un factor importante ya que influye en la estructura porosa y en la discontinuidad del recubrimiento. Se ha evidenciado que a concentraciones menores a 0,5 % de quitosano con condiciones de voltaje y tiempo más bajas a las planteadas en este estudio, generan recubrimientos con un alto grado de discontinuidad, debido a la baja tasa de adherencia del quitosano. La electrodeposición de quitosano a condiciones de 3V y 20 minutos es buen punto de partida para desarrollar recubrimientos biofuncionales a base de este biopolímero, pero se ha visto que a estas condiciones las muestras presentan delaminación de la capa de quitosano debido a la pobre fijación del recubrimiento en la superficie de HAp (Jiménez, 2020). En base a los estudios mencionados anteriormente, la morfología del recubrimiento puede optimizarse de manera importante al incrementar el voltaje de electrodeposición.

3.3.2 Análisis del Tamaño de Poro en los recubrimientos de HAp y QT.

Los recubrimientos porosos en materiales como el titanio pueden permitir que el hueso crezca dentro de los poros y de esta manera garantizar que las diferentes cargas mecánicas se transfieran al hueso que está presente en los poros (St. John, 2016) . La HAp además facilita que el hueso se una a la superficie logrando así una mejora en la fijación del implante, es por eso que la porosidad es un factor importante para el crecimiento de hueso y para aliviar los

diferentes esfuerzos que estará sometido el material (St. John, 2016) . Se realizó la medición de tamaño de poro en el recubrimiento de HAp debido a que el termorociado por HVOF es una técnica que genera recubrimientos con un alto grado de cristalinidad y un tamaño de poro pequeño, ya que si hay presencia de alta porosidad puede afectar en la resistencia mecánica de la Hidroxiapatita (Mancini et al., 2001). En la Figura.11 se observa que el tamaño de poro que se encuentra con una mayor frecuencia en las superficies de HAp está en un promedio de $(38 \pm 4.6) \mu m$. La porosidad es un variable importante en el recubrimiento de HAp ya que permite que el Quitosano electrodepositado sobre la superficie de HAp ingrese por los poros y exista una mejor fijación del biopolímero, pero a la vez no se busca tener valores altos de tamaño de poro ya que puede afectar en las propiedades mecánicas del recubrimiento de Hidroxiapatita. Por lo tanto, en base al histograma se puede observar que no existe la presencia de poros de gran tamaño que perjudiquen la integridad de nuestro recubrimiento.

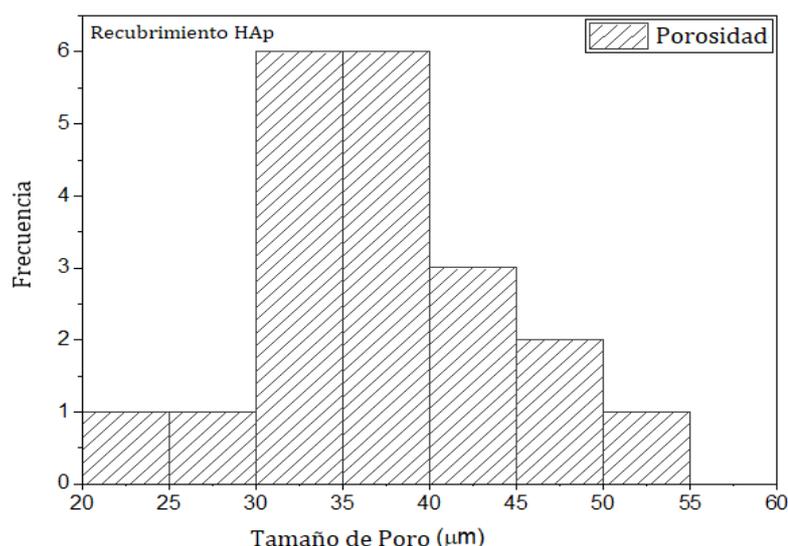


Figura 11. Histograma del Tamaño de Poro en el Recubrimiento de HAp

Como se muestra en la Figura.12 se realizó el mismo análisis del tamaño de poro en el caso del recubrimiento de quitosano. En la Figura.12 (a) se puede observar que la distribución

del tamaño de poro es variado dependiendo del voltaje aplicado; en el caso de las muestras electrodepositadas con 5V se observó que no hay poros con tamaños similares, sino presenta heterogeneidad en su porosidad llegando a valores de porosidad de hasta $50 \mu\text{m}$. Por otro lado, para las condiciones de 3V y 4V, se observa claramente que la frecuencia en su tamaño de poro es más normalizada y tienen una porosidad en un rango de $30\text{-}38 \mu\text{m}$. Para el caso de la Figura.12 (b) que es al electrodepositar el Quitosano durante 30 minutos, se obtuvo un efecto diferente en el tamaño de poro en comparación a la Figura.12 (a), ya que se generó una distribución de tamaño de poro más dispersa, donde exhibió tamaños de poros desde 18 a $50 \mu\text{m}$ y con diferente comportamiento al que se tuvo al electrodepositar 20 minutos.

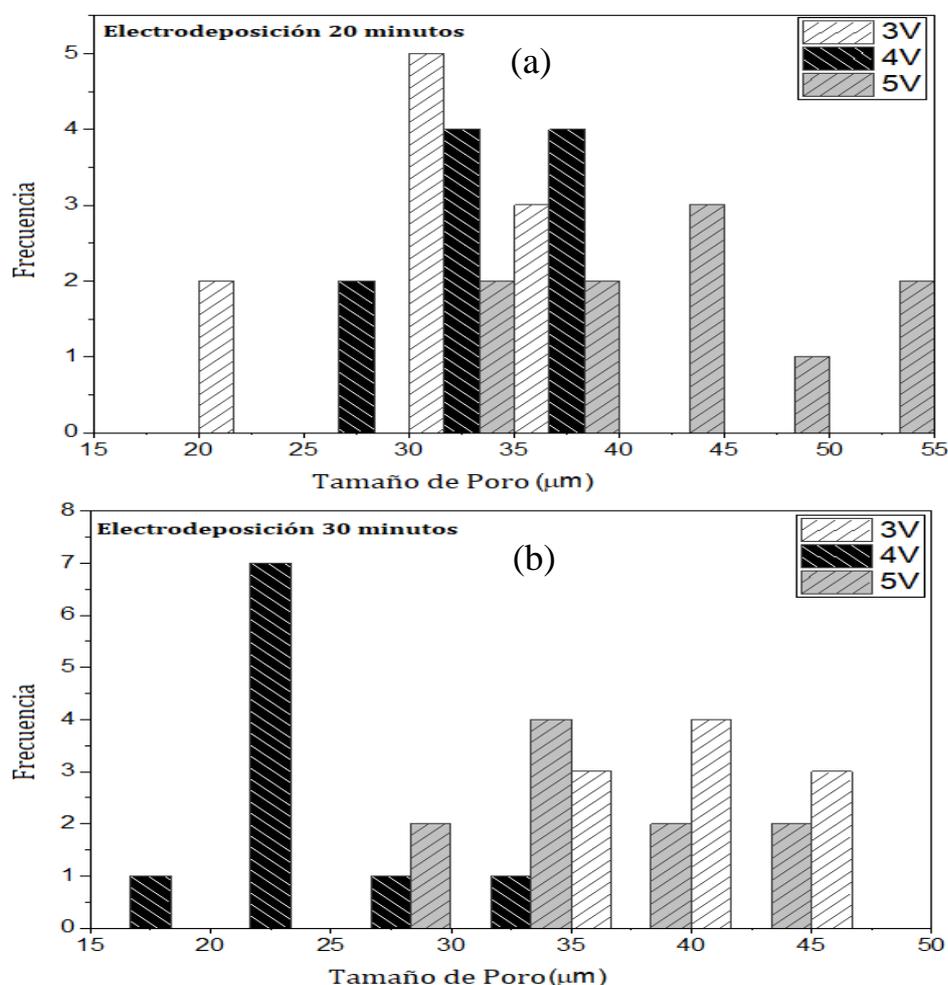


Figura 12. Histograma del Tamaño de Poro para el recubrimiento de Quitosano cuando el tiempo de Electrodeposición es: (a) 20 minutos, (b) 30 minutos.

En la Tabla.4 se puede observar los tamaños de poro promedio para cada condición de voltaje y tiempo. La tabla muestra la variación que se obtuvo en el tamaño de poro al modificar el tiempo de electrodeposición y claramente se apreció una disminución en el tamaño de poro al incrementar este parámetro. Esto se debe a que, al aumentar el tiempo de electrodeposición, como se muestra en la Figura.10 (e) y 10(f), el quitosano empieza a modificar su estructura y a formar capas más uniformes, donde claramente se obtuvo una morfología más homogénea, evidenciando así un cambio en su porosidad. El cambio en el tamaño de poro más significativo se obtuvo en la condición de 4V, donde para 20 y 30 minutos se logró una variación de aproximadamente $10 \mu m$, lo cual evidencia que el tiempo de electrodeposición tiene una alta dependencia en el tamaño de poro en el recubrimiento de quitosano.

Tabla 4. Tamaño Promedio de Poro para diferentes condiciones de Tiempo y Voltaje de Electrodeposición de Quitosano

Tamaño Promedio de Poro (μm)		
<i>Voltaje</i>	<i>20 minutos</i>	<i>30 minutos</i>
3V	31.77 ± 3.5	30.90 ± 3.7
4V	33.62 ± 2.8	23.31 ± 3.2
5V	41 ± 5.2	34.428 ± 4.3

Existen estudios previos donde se ha medido el tamaño de poro en hidrogeles de quitosano-alginato a una concentración (1 % v/v) que han sido depositados en superficies de titanio mediante electrodeposición a 20V y 20min. Se ha visto que el tamaño de poro promedio de estos hidrogeles se encuentra en $50 \mu m$ (Wang et al., 2014). En el caso de este estudio se obtuvo valores de tamaño de poro más pequeños, pero que entra en un rango aceptable para múltiples aplicaciones. Una de las aplicaciones más importantes es en la encapsulación y liberación controlada de fármacos o proteínas, ya que permite tener un mejor control en la

liberación. En el caso de la liberación de proteínas como la Albúmina de Suero Bovino o BSA, se ha observado que se puede controlar la liberación de esta proteína durante períodos de tiempo más largos cuando el tamaño de poro del hidrogel es mayor al diámetro de la proteína (50-100 nm) (Pastor et al., 2015). En base a este criterio, el tamaño de poro obtenido en los hidrogeles de quitosano, es apto para la encapsulación y liberación de Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) que puedan estimular el crecimiento de hueso y cartílago en la interface tejido/implante, para mejorar la osteointegración de las prótesis metálicas.

4 CONCLUSIONES

La aplicación de termorociado por HVOF presentó resultados favorables para recubrir la superficie metálica con hidroxiapatita. Los parámetros utilizados en el proceso de HVOF mostraron un buen desempeño, determinado por la HAp con la superficie del sustrato, y además se generó una baja porosidad con tamaños de poro de aproximadamente $(38 \pm 4.6) \mu m$. Por otra parte, el análisis de cristalinidad exhibió un alto grado de cristalinidad (68%) con una baja degradación, ya que no hubo presencia de fases secundarias de TCP, TTCP o CaO que afecten la integridad mecánica del recubrimiento. Por otra parte, el recubrimiento de Quitosano indicó que la variación en los parámetros de electrodeposición produce cambios significativos en la morfología de la superficie de HAp, donde al incrementar el voltaje de la fuente y el tiempo de aplicación, estimula la formación de múltiples capas o redes de material polimérico que se aglomeran uniformemente a lo largo de la probeta. Se determinó que las condiciones más adecuadas para la electrodeposición de QT se logran a 5V y 30 minutos como tiempo de electrodeposición. Además, se concluyó que la electrodeposición de quitosano funcionalizado es útil como método de evaluación de la homogeneidad del recubrimiento, y es un protocolo que puede ser utilizado previo a un análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Como punto final, se encontró que la variación en las condiciones de electrodeposición tiene una alta influencia en el tamaño de poro del recubrimiento de quitosano, indicando que a 20 minutos como tiempo de electrodeposición, se exhibe un rango de tamaño de poro muy marcado (entre 30-40 μm), a diferencia de lo que ocurrió para 30 minutos de electrodeposición, donde no hubo un rango fijo en la porosidad del recubrimiento, pero si presentó una disminución del tamaño de poro a esta condición.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, D. (2020). Aplicación de un Recubrimiento Funcional para Prótesis Metálicas, Basado en Quitosano. Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá, Ecuador.
- Balza, J. C., Zujur, D., Gil, L., Subero, R., Dominguez, E., Delvasto, P., & Alvarez, J. (2013). Sandblasting as a surface modification technique on titanium alloys for biomedical applications: Abrasive particle behavior. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 45(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/45/1/012004>
- Bumgardner, J. D., Chesnutt, B. M., Yuan, Y., Yang, Y., Appleford, M., Oh, S., Mclaughlin, R., Elder, S. H., & Ong, J. L. (2007). The integration of chitosan-coated titanium in bone: An in vivo study in rabbits. *Implant Dentistry*, 16(1), 66–79. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3180312011>
- Branemark PI. USA: Quintessence Books; 2005. The Osseointegration Book – From Calvarium to Calcaneus; p. 24.
- Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983–5990. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>

- Guilemany, J. M. (2005). *High Crystalline Degree Hydroxyapatite Coatings Using HVOF Spraying*.
- Harun, W. S. W., Asri, R. I. M., Alias, J., Zulkifli, F. H., Kadirgama, K., Ghani, S. A. C., & Shariffuddin, J. H. M. (2018). A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials. *Ceramics International*, *44*(2), 1250–1268. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.162>
- Henao, J., Cruz-bautista, M., Hincapie-Bedoya, J., Ortega-Bautista, B., Corona-Castuera, J., Giraldo-Betancur, A. L., Espinosa-Arbelaez, D. G., Alvarado-Orozco, J. M., Clavijo-Mejía, G. A., Trapaga-Martínez, L. G., & Poblano-Salas, C. A. (2018). HVOF Hydroxyapatite/Titania-Graded Coatings: Microstructural, Mechanical, and In Vitro Characterization. *Journal of Thermal Spray Technology*, *27*(8), 1302–1321. <https://doi.org/10.1007/s11666-018-0811-2>
- Jiménez, L. (2020). Analysis of a bioactive coating of hydroxyapatite applied by HVOF with an additional layer of chitosan for application in titanium prosthesis. Mechanical Engineering Department, Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá, Ecuador.
- Katti, K. S. (2004). Biomaterials in total joint replacement. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *39*(3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.002>
- Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, *26*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>
- Li, H., Khor, K. A., & Cheang, P. (2002). Titanium dioxide reinforced hydroxyapatite coatings deposited by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray. *Biomaterials*, *23*(1), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00082-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00082-5)

- Lima, R. S., Khor, K. A., Li, H., Cheang, P., & Marple, B. R. (2005). HVOF spraying of nanostructured hydroxyapatite for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A*, 396(1–2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.01.037>
- Olmstead, M. L. (2014). Total hip arthroplasty. *Current Techniques in Small Animal Surgery, Fifth Edition*, 18(2), 1043–1047. <https://doi.org/10.1201/b17702>
- Mancini, C. E., Berndt, C. C., Sun, L., & Kucuk, A. (2001). Porosity determinations in thermally sprayed hydroxyapatite coatings. *Journal of Materials Science*, 36(16), 3891–3896. <https://doi.org/10.1023/A:1017905818479>
- Pastor, E. L., Reguera-Núñez, E., Matveeva, E., & Garcia-Fuentes, M. (2015). Pore size is a critical parameter for obtaining sustained protein release from electrochemically synthesized mesoporous silicon microparticles. *PeerJ*, 2015(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.1277>
- Raj, V., & Mumjitha, M. S. (2015). Fabrication of biopolymers reinforced TNT/HA coatings on Ti: Evaluation of its Corrosion resistance and Biocompatibility. *Electrochimica Acta*, 153, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.10.055>
- Rodríguez, G. (2020). Elaboración de Hidrogeles Fluorescentes Basados en Quitosano-Almidón Oxidado. Departamento de Ingeniería Química, Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá, Ecuador.
- St. John, K. R. (2016). Mechanical Biocompatibility of Dental Materials. In *Biocompatibility of Dental Biomaterials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100884-3.00002-3>
- Tsuchiya, A., Sotome, S., Asou, Y., Kikuchi, M., Koyama, Y., Ogawa, T., Tanaka, J., & Shinomiya, K. (2008). Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model.

Journal of Medical and Dental Sciences, 55(1), 91–99.

<https://doi.org/10.11480/jmds.550111>

Wang, Y., Guo, X., Pan, R., Han, D., Chen, T., Geng, Z., Xiong, Y., & Chen, Y. (2015).

Electrodeposition of chitosan/gelatin/nanosilver: A new method for constructing biopolymer/nanoparticle composite films with conductivity and antibacterial activity.

Materials Science and Engineering C, 53, 222–228.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.031>

Wang, Z., Zhang, X., Gu, J., Yang, H., Nie, J., & Ma, G. (2014). Electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer composite coatings on titanium substrates.

Carbohydrate Polymers, 103(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.007>

Zujur, D., & Álvarez Barreto, J. (2016). Prótesis en artroplastia total de cadera y

recubrimientos bioactivos de quitosano para mejorar su desempeño. *Revista Ingeniería*

Biomédica, 10(19), 33–43. <https://doi.org/10.24050/19099762.n19.2016.1030>

Zujur, Denise. (2013). *EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS BIOMIMÉTICOS ÓSEOS A BASE DE QUITOSANO FOTOSENSIBLE SOBRE Ti6Al4V*.

Zujur, Denise, Moret, J., Rodriguez, D., Cruz, L., Lira, J., Gil, L., Dominguez, E., & Alvarez-

Barreto, J. F. (2015). A novel photocrosslinkable and cytocompatible chitosan coating

for Ti6Al4V surfaces. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, 13(3),

e210–e219. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000227>