

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 278**

21 Número de solicitud: 201430616

51 Int. Cl.:

**A61C 13/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**25.04.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**26.11.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2015/070345**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (66.7%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES y  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA MARTÍN, José Miguel;  
PALMERO ACEBEDO, Alberto;  
ÁLVAREZ MOLINA, Rafael;  
VALLET-REGÍ, María;  
ARCOS NAVARRETE, Daniel y  
IZQUIERDO BARBA, Isabel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **IMPLANTES BIOCOMPATIBLES DE TITANIO NANOESTRUCTURADO CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS**

57 Resumen:

Implantes biocompatibles de titanio nanoestructurado con propiedades antibacterianas.

Se describe un nuevo implante basado en titanio, formado por un recubrimiento de titanio fabricado sobre biomateriales con aplicación en implantología ósea. Las características nanotopográficas de estos implantes inhiben la adhesión bacteriana y la formación de biofilm bacteriano en superficie, presentando de forma simultánea propiedades adecuadas para la adhesión, extensión y proliferación de las células formadoras de hueso. Adicionalmente la invención comprende un método de fabricación del implante mediante técnicas de incidencia oblicua y su uso en implantología ósea.

**ES 2 552 278 A1**

## IMPLANTES BIOCOMPATIBLES DE TITANIO NANOESTRUCTURADO CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

### DESCRIPCIÓN

5

#### SECTOR DE LA TÉCNICA Y OBJETO DE LA INVENCION

La invención se enmarca en el campo de los materiales de recubrimiento y adhesivos para aplicaciones médicas, de ingeniería médica o ingeniería sanitaria en el sentido más amplio.

10 La invención también se enmarca en el campo de los nanomateriales con aplicación médica.

El objeto de la invención es un implante compuesto de un recubrimiento de titanio depositado sobre un sustrato que comprende un biomaterial de elección quirúrgica con propiedades osteointegradoras e inhibidoras de la formación de *biofilm* bacteriano, así como métodos de fabricación de los implantes mediante técnicas de incidencia oblicua, preferentemente por pulverización catódica y su uso en implantología ósea.

15

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

20 El titanio y sus aleaciones son ampliamente utilizados en implantología ósea debido a su excepcional biocompatibilidad, excelentes propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión. Esta alta resistencia a la corrosión reside fundamentalmente en la rápida formación de una capa de óxido de titanio sobre su superficie, conocida como corrosión en seco o pasivado del titanio. La formación de óxido de titanio se produce espontáneamente por oxidación de la superficie del metal al entrar en contacto con el oxígeno atmosférico. La capa de pasivado dota a los implantes basados en titanio de excelentes propiedades anticorrosivas y propiedades osteointegradoras.

25

La mayoría de las infecciones en implantes ortopédicos metálicos son causadas por bacterias del tipo *Staphylococcus*. Entre ellos el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) representa la principal especie patogénica en el caso de biomateriales metálicos tales como acero inoxidable, CrCo, Ti y sus aleaciones. Cuando las bacterias se adhieren a la superficie del implante, segregan una matriz extracelular de naturaleza polimérica denominada *biofilm*, que les dota de una elevada resistencia a los antibióticos (*F. Götz et al, Molecular Microbiology* **43**, 1367, 2002). La formación de este *biofilm* obliga casi siempre a la retirada de las prótesis, pues de otro modo la infección del implante puede dar lugar a infecciones crónicas y, en casos extremos, incluso a la muerte del paciente por septicemia.

30

35

En la actualidad el problema de la infección en implantes se intenta prevenir con varias estrategias, por ejemplo implantando rosarios de polimetilmetacrilato cargados con antibióticos de amplio espectro. Esta estrategia tiene la limitación de que los rosarios requieren de una segunda intervención para ser retirados. Por otra parte, una vez infectado el implante, la estrategia a seguir es la administración vía sistémica de elevadas dosis de antibióticos con los consiguientes problemas de toxicidad. En cualquier caso, cuando las bacterias consiguen formar el *biofilm* bacteriano, se hacen muy resistentes al tratamiento con antibióticos vía sistémica y el implante debe ser retirado para evitar infecciones crónicas y la septicemia. Por todo ello, abordar el problema de la infección desde su primer estadio

40

45

evitando la adhesión bacteriana, supone un importante avance en la prevención de la infección de implantes óseos.

5 En lo relativo a implantes ortopédicos y dentales, la formación de nanoestructuras mediante diversas técnicas (anodización, deposición en fase vapor, etc.) se ha descrito en el campo con la finalidad de favorecer la adhesión de células formadoras de hueso (osteoblastos) así como de mejorar su comportamiento una vez adheridos (diferenciación, formación de matriz extracelular, etc.). Así por ejemplo, se han sintetizado recubrimientos nanoestructurados sobre implantes mediante diversas técnicas y con diferentes formas, un ejemplo son  
10 nanotubos de TiO<sub>2</sub> fabricados mediante técnicas de anodización (M. Ma, *et al*, *J. Biomedical Material Research Part A* **100**, 278, 2012), pero también las hidroxiapatitas nanoestructuradas mediante la hidrólisis de precursores sólidos, las aleaciones metálicas obtenidas por polvometalurgia a baja temperatura, las nanoestructuras de titanio obtenida por nanotopografía química o las nanoestructuras de titanio obtenidas por oxidación  
15 superficial.

Por otra parte, también se han preparado nanoestructuras sobre Ti que inhiben la adhesión bacteriana (D Campoccia, *Biomaterials* **34**, 8533, 2013; K. Anselme, *Acta Biomaterialia* **6**, 3824, 2010). Por ejemplo, en algunos casos, el TiO<sub>2</sub> presente en superficie ha demostrado  
20 cierta capacidad bactericida después de ser irradiado con luz UV.

Hay varios trabajos que describen nanotopografías que conservan su comportamiento respecto a osteoblastos pero inhiben la colonización bacteriana simultáneamente (Colon *et al*. *J Biomedical Materials Research. A* **78**, 595, 2006 y Ploux L. *et al*, *Langmuir* **25**, 8161, 2009). En ambos casos, los estudios están hechos sobre materiales sin aplicación clínica hasta el momento. En M. Kazemzadeh-Narbat *et al*, *Biomaterials* **34** 5969 2013 se consiguen ambos efectos (biocompatibilidad con osteoblastos y actividad antimicrobiana) utilizando titanio obtenido mediante procesos de anodización, pero se basan en la incorporación de fármacos en las capas crecidas, por lo que su actividad antimicrobiana no  
30 se debe a la nanoestructura crecida, sino al medicamento incorporado.

Una técnica utilizada ampliamente en microelectrónica que permite la formación de nanoestructuras con gran variedad de propiedades como topografías, composiciones, etc., es la denominada pulverización catódica (o *sputtering* en inglés) (P.J. Kelly *et al*, *Vacuum*  
35 **56**, 159, 2000). Esta técnica es bien conocida desde hace décadas por crecer láminas delgadas muy compactas y con baja rugosidad. En ésta, un bloque sólido, también llamado blanco, de un material determinado (en este caso de titanio) se coloca en el interior de un reactor o cámara de vacío con un gas inerte en su interior (normalmente se emplea gas de argón). Al inyectar potencia electromagnética a través del blanco mediante una fuente de  
40 excitación, se genera un plasma gaseoso, rico en iones energéticos, que pulverizan la superficie del blanco, emitiéndose átomos en una dirección preferentemente perpendicular al blanco, con energías cinéticas del orden de los 10 eV. Estos átomos, al llegar a una superficie en el interior del reactor paralela al blanco, denominada sustrato, se van acumulando y aglomerando sobre una superficie, generando una película delgada.  
45 Dependiendo de la presión de operación en la cámara, que es debida al gas inerte introducido se puede controlar la energía con la que dichos átomos llegan a la superficie. A altas presiones (por encima de 1 Pa en condiciones estándar), las colisiones son

numerosas, por lo que los átomos llegan al sustrato con baja energía (décimas o centésimas de eV). A bajas presiones, sin embargo, la energía de llegada es muy similar a la de salida del blanco (régimen balístico), generando películas delgadas altamente compactas.

5 La pulverización catódica es un proceso muy utilizado en la formación de películas delgadas sobre materiales, de hecho la pulverización catódica se emplea industrialmente en múltiples aplicaciones: fabricación de discos duros, de espejos, de los recubrimientos internos de las bolsas de comestibles, etc. Frente a técnicas que involucran algún tipo de reacción química, como síntesis química, anodización, fotolitografía, etc., la pulverización catódica es una  
10 técnica de vacío, por lo que no se generan residuos agresivos con el medioambiente, y además es eficiente desde un punto de vista energético ya que permite la fabricación a bajas temperaturas (temperatura ambiente). Frente a otras técnicas físicas en vacío, como la evaporación térmica o la evaporación asistida mediante cañón de electrones, la pulverización catódica se utiliza ampliamente en la industria y permite el crecimiento del  
15 material nanoestructurado en grandes superficies con diferentes morfologías.

En los últimos años, la pulverización catódica también se está empleando en geometrías de ángulo oblicuo, ésta es la llamada pulverización catódica en incidencia oblicua (*sputtering at glancing angle* o *GLAD sputtering* en la literatura) (J. C. Sit *et al*, *Journal of Materials Research* **14** (4), 1197, 1999). En este caso, tras la generación del plasma en la cámara, el sustrato donde se van acumulando los átomos ya no se coloca paralelo al blanco, sino formando con éste un ángulo de inclinación superior a 60°, el llamado ángulo GLAD, lo que provoca que los átomos lleguen al sustrato con incidencia oblicua. Esta configuración induce procesos de sombra en la superficie de la capa delgada en crecimiento que generan  
25 estructuras inclinadas.

Hasta ahora no se han preparado recubrimientos sobre implantes óseos con un biomaterial que pueda ser utilizado para recubrir implantes o prótesis y que estén formados por nanotopografías de Ti que, simultáneamente, permitan la adhesión y proliferación de  
30 osteoblastos, pero inhiban la colonización bacteriana. Estos estudios siempre se han hecho por separado con otras técnicas y la mayoría de ellos, con bacterias que tampoco suponen una incidencia significativa en las infecciones de las prótesis.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

35 Un primer aspecto de la invención es un implante que tiene un recubrimiento de titanio depositado sobre un sustrato caracterizado porque

- 40 - el sustrato comprende un biomaterial con una rugosidad cuadrática media inferior a 5 nm en un área de  $4 \mu\text{m}^2$ ,
- el recubrimiento tiene una pureza superior al 95% y comprende titanio nanoestructurado formado por titanio metálico y una capa de óxido de titanio,
- el titanio nanoestructurado tiene forma nanocolumnar donde el diámetro de las nanocolumnas es de 30 a 100 nm y la altura varía entre 100 y 300 nanómetros, el  
45 espacio entre nanocolumnas varía entre 50 y 150 nanómetros con una inclinación de la nanocolumna respecto a la vertical del sustrato de entre 0° y 30°.

El biomaterial del sustrato puede tener al menos uno de los materiales siguientes:

- titanio comercialmente puro con pureza superior al 99% de grado médico para implantes periodontales,
- aleaciones metálicas de grado médico como CrCo, acero inoxidable, Ti6Al4V para aplicaciones ortopédicas, craneales y maxilofaciales

El biomaterial del sustrato puede estar conformado en estructuras que comprenden discos, tornillos, clavos, vástagos, placas de osteosíntesis y demás dispositivos de fijación de fracturas, generalmente fabricadas en acero inoxidable.

- 10 Otro aspecto de la invención es el procedimiento de obtención del implante que comprende depositar el recubrimiento sobre el sustrato utilizando técnicas en incidencia oblicua (GLAD), preferentemente en un sistema de pulverización catódica.

La pulverización catódica puede ser de tipo magnetrón.

El procedimiento puede comprender las siguientes etapas:

- 15 a) introducción del sustrato en la cámara del sistema de pulverización catódica,
- b) cierre de la cámara y realización de vacío,
- c) introducción de gas en la cámara,
- d) excitación electromagnética de las partículas del gas presentes en la cámara mediante una fuente,
- 20 e) choque de las partículas presentes en la cámara contra un blanco de titanio,
- f) depósito del material desprendido del blanco sobre el sustrato,

- 25 caracterizado por que el producto de la presión de operación ( $P_g$ ) por la distancia blanco – sustrato (L), cumple la condición de régimen balístico para la pulverización de Ti, dada por  $p_g L < 12 \text{ Pa cm}$ ; y el sustrato forma con el blanco un ángulo de inclinación superior a  $60^\circ$ .

En un caso particular el vacío alcanzado es inferior a  $10^{-4} \text{ Pa}$ , en la cámara se cumple que el cociente  $L/d$ , siendo d el diámetro del blanco y L la distancia blanco-sustrato es superior a 3.5.

- 30 El tercer aspecto de la invención es el uso del implante en implantología ósea.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento humano o animal que comprende las siguientes etapas:

- insertar el implante mediante cirugía en un cuerpo humano o animal, preferentemente mediante cirugía ortopédica, craneal, dental y/o maxilofacial.

- 35 En una realización particular el implante puede ser de uso temporal o de uso permanente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 40 La invención se basa en que los inventores han conseguido un nuevo tipo de recubrimientos de titanio sobre biomateriales metálicos de importancia quirúrgica que presentan un

comportamiento selectivo frente a bacterias y osteoblastos. Las características nanotopográficas de estos recubrimientos inhiben la adhesión bacteriana y la formación de *biofilm* bacteriano en superficie, presentando de forma simultánea propiedades adecuadas para la adhesión, extensión y proliferación de las células formadoras de hueso.

5

Un objeto de la invención es un implante que comprende un recubrimiento de titanio depositado sobre un sustrato caracterizado porque

10

- el sustrato comprende un biomaterial con una rugosidad cuadrática media inferior a 5 nm en un área de 4  $\mu\text{m}^2$ ,

- el recubrimiento tiene una pureza superior al 95% y comprende titanio nanoestructurado formado por titanio metálico y una capa de óxido de titanio,

15

- el titanio nanoestructurado tiene forma nanocolumnar donde el diámetro de las nanocolumnas es de 30 a 100 nm y la altura varía entre 100 y 300 nanómetros, el espacio entre nanocolumnas varía entre 50 y 150 nanómetros con una inclinación de la nanocolumna respecto a la vertical del sustrato de entre 0° y 30°,

20

El sustrato es decisivo en la formación del recubrimiento, ya que su pureza, material, topografía, etc influyen en las propiedades estructurales del recubrimiento que es depositado encima. Si no se utiliza un sustrato adecuado no se forman el recubrimiento con las propiedades necesarias para que funcione como implante.

25

En una realización particular el biomaterial del sustrato comprende al menos uno de los materiales siguientes:

- titanio comercialmente puro con pureza superior al 99% de grado médico, para implantes periodontales,

- aleaciones metálicas de grado médico como CrCo, acero inoxidable, Ti6Al4V para aplicaciones ortopédicas, craneales y maxilofaciales

30

Estos biomateriales tienen una enorme importancia en la fabricación de prótesis articulares modulares. Las aleaciones de Ti6Al4V son el biomaterial de elección para fabricar el componente de la prótesis implantado en el canal medular del hueso, pues presenta excelente osteointegración y un módulo elástico alrededor de 110 GPa lo que permite transmitir carga mecánica desde el material al hueso. Este valor supone la mitad con respecto al del acero inoxidable y al CrCo. La menor rigidez del Ti6Al4V evita situaciones de protección contra la carga, las cuales se asocian con la pérdida de hueso en la región que rodea al implante y con el posterior aflojamiento de las prótesis. Por el contrario, para aquellos componentes que forman parte del par de fricción en prótesis articulares, las aleaciones de CrCo o acero inoxidable son las de elección por su mejor comportamiento a la fricción.

40

En una realización más particular el biomaterial del sustrato está conformado en forma de dispositivos implantables que comprenden discos, tornillos, clavos, vástagos, placas de osteosíntesis así como otros dispositivos de fijación de fracturas

45

El recubrimiento puede tener capas adicionales de material, por ejemplo una capa entre el recubrimiento y el sustrato que facilite la adhesión del titanio nanoestructurado crecido encima.

5 La superficie del implante es la superficie del recubrimiento y viene dada por la formación en nanocolumnas del titanio nanoestructurado. Esta superficie inhibe la formación de *biofilm* bacteriano. Así mismo, la adhesión bacteriana sobre el recubrimiento es muy inferior respecto a la observada en los biomateriales sin recubrir. Concretamente, los estudios microbiológicos realizados en esta invención con *S. aureus* muestran que los recubrimientos  
10 son superficies efectivas para inhibir la adhesión de este patógeno. La inhibición de la adhesión bacteriana evita la posterior formación de colonias y el posterior desarrollo del *biofilm* bacteriano.

15 Independientemente del tipo celular, procariota en el caso de las bacterias o eucariota en caso de los osteoblastos, existen una serie de etapas comunes para la colonización de superficies por parte de ambos tipos. La adhesión celular a un sustrato es un proceso que se lleva a cabo secuencialmente por parte de la célula en diferentes etapas: i) reconocimiento de la superficie, ii) formación de contactos iniciales, y su posterior desarrollo en puntos focales, y iii) expansión y desarrollo celular (S. Faghilhi, *et al*, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* **91** 656 2009). En este caso, la posibilidad de controlar la topología de la superficie, no sólo en el tamaño de las nanocolumnas sino también en su espaciado y química de superficie, permite diseñar superficies con un comportamiento selectivo en base a las características diferenciales entre ambos tipos de células.  
20

25 Los osteoblastos son células con dimensiones laterales entre 10 y 50  $\mu\text{m}$ . Poseen una membrana celular flexible que les permite adaptarse a diferentes nanotopografías. Los osteoblastos requieren la adsorción previa de integrinas en la superficie de material para adherirse a ella. Los recubrimientos descritos en esta invención muestran que la adsorción  
30 de integrinas es suficiente para facilitar la adhesión, extensión y proliferación de osteoblastos, con la misma eficacia que lo hacen sobre superficies pulidas de Ti6Al4V de grado médico. Por el contrario, las bacterias no necesitan de la adsorción previa de proteínas en superficie para colonizarlas. Por otra parte, las bacterias tienen en general una forma característica y son menos deformables. En concreto *S. aureus* muestra unas  
35 dimensiones de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y su pared bacteriana es mucho más rígida que las membranas de las células eucariotas. Estas características diferenciales respecto a los osteoblastos, traen como resultado que *S. aureus* presente elevada sensibilidad a la nanotopografía. La rugosidad y la corta distancia entre nanocolumnas, ejercen sobre *S. aureus* un doble efecto que limita su adhesión. Por una parte, las bacterias tienen acceso a  
40 un número muy limitado de puntos de anclaje, pues su pequeño tamaño y rigidez solo les permite entrar en contacto con el área superior de un limitado número de nanocolumnas para desarrollar puntos focales de adhesión. Por otra parte, el aire atrapado entre las nanocolumnas ejerce un efecto de baja humectabilidad análogo al de la hoja de la flor de loto, que dificulta aún más la adhesión de *S. aureus* y el desarrollo de la matriz polimérica  
45 extracelular que genere el *biofilm* bacteriano.

Sorprendentemente, mientras que en las condiciones de este trabajo, *S. aureus* desarrolla un *biofilm* en muestras de sustratos de Ti6Al4V comercial de grado médico tras varios días de cultivo (3 días para el caso particular de un sustrato de Ti6Al4V), la superficie del implante, que en este caso particular es la superficie del recubrimiento depositado sobre esos mismos sustratos, o nano-Ti6Al4V, muestra un comportamiento selectivo dependiendo del tipo de célula. Mientras que los osteoblastos se adhieren y proliferan sobre la superficie de nano-Ti6Al4V en la misma extensión que sobre Ti6Al4V, la adhesión de *S. aureus* se ve fuertemente impedida y la formación de *biofilm* inhibida cuando se cultiva sobre la superficie nanoestructurada.

Respecto al comportamiento frente a osteoblastos, las características nanoestructurales del titanio nanoestructurado, como son la alta densidad de nanocolumnas y el corto espaciado entre ellos (con un valor medio de 100 nm), hacen que no modifiquen su comportamiento con respecto a superficies pulidas de Ti6Al4V. En este sentido, el mayor tamaño de los osteoblastos, su flexibilidad y la adhesión de integrinas sobre la capa de pasivado de óxido de titanio que presenta las nanocolumnas, permiten un excelente desarrollo celular sobre estos recubrimientos, de modo análogo al de las aleaciones de Ti6Al4V de grado médico.

En conjunto, esta propiedad de los recubrimientos sobre los sustratos, permite la osteointegración de los implantes, evitando la posible infección que puede surgir en un periodo relativamente corto de tiempo tras el implante, y que generalmente obliga a la retirada y sustitución de las prótesis.

El segundo objeto de la invención es un procedimiento para obtener el implante, en adelante procedimiento, que comprende depositar el recubrimiento sobre el sustrato utilizando técnicas en incidencia oblicua (GLAD), preferentemente en un sistema de pulverización catódica.

El sistema de pulverización catódica puede ser de tipo magnetrón, esto es utilizar, al menos, un magnetrón, es decir, emplea imanes que concentren la ionización del gas en las proximidades del blanco, lo que hace más rara la ionización en el resto de la cámara de vacío y permite trabajar con menores presiones de gas necesarias para obtener la estructura del recubrimiento.

En una realización particular el depósito se realiza en un sistema de pulverización catódica y comprende las siguientes etapas:

- a) introducción del sustrato en la cámara del sistema de pulverización catódica
- b) cierre de la cámara y realización de vacío,
- c) introducción de gas en la cámara,
- d) excitación electromagnética de las partículas del gas presentes en la cámara mediante una fuente,
- e) choque de las partículas presentes en la cámara contra un blanco de titanio,
- f) depósito del material desprendido del blanco sobre el sustrato,

caracterizado por que el producto de la presión de operación ( $P_g$ ) por la distancia blanco – sustrato ( $L$ ), cumple la condición de régimen balístico para la pulverización de Ti, dada por  $p_g L < 12 \text{ Pa cm}$ ; y el sustrato forma con el blanco un ángulo de inclinación superior a  $60^\circ$ .

- 5 En una realización particular el procedimiento se caracteriza por que el vacío alcanzado es inferior a  $10^{-4} \text{ Pa}$ , en la cámara se cumple que el cociente  $L/d$  es superior a 3.5, siendo  $d$  el diámetro del blanco y  $L$  la distancia blanco-sustrato

10 La elección de las condiciones del depósito GLAD es crítica pues no se forman las mismas nanoestructuras. La técnica de pulverización catódica en incidencia oblicua permite la formación de nanocolumnas cuyas dimensiones y espaciado dependen de la presión de operación en la cámara, de la inclinación del sustrato con respecto al flujo de átomos proveniente del blanco, de la geometría del sistema de depósito, del sustrato y de la duración del depósito.

- 15 Cuando se trabaja a bajas presiones los átomos de titanio que formarán el material nanoestructurado llegan a la superficie con gran energía, haciendo que las estructuras nanocolumnares crezcan con gran relación de aspecto y disminuya la superficie horizontal efectiva, de tal manera que las bacterias disponen de menos superficie para anclarse. De forma similar, el valor del cociente  $L/d$  asegura que el haz proveniente del blanco que  
20 formará el titanio nanoestructurado está suficientemente colimado para poder formar las nanocolumnas.

25 Los blancos de titanio utilizados en pulverización catódica suelen ser de alta pureza, normalmente superior al 99% ya que no tiene sentido trabajar en un reactor de vacío si luego el blanco tiene impurezas en la mayoría de aplicaciones.

30 La pulverización catódica puede generar la excitación electromagnética mediante medios que comprenden al menos uno de los siguientes: DC (excitación en continua), RF (excitación alterna en el rango de las radiofrecuencias) o DC pulsado (excitación con pulsos de corriente continua).

35 El depósito del recubrimiento sobre los sustratos da lugar a una topografía superficial formada por nanocolumnas. El titanio nanoestructurado crece durante el depósito en la superficie del sustrato cubriendo la superficie con nanocolumnas con un alto grado de densidad, i.e. un gran grado de nanomotivos por unidad de área, con espaciado entre nanocolumnas medio de 100 nm.

40 El implante formado presenta una serie de ventajas respecto al estado de la técnica: la técnica propuesta (pulverización catódica con bajas presiones e incidencia oblicua) es más eficiente que otras técnicas como la anodización no sólo desde el punto de vista energético, pues se lleva a cabo a temperatura ambiente y sin generar residuos, sino también porque permite un control más preciso sobre la morfología del recubrimiento y evita tratamientos químicos; además permite crecer los recubrimientos sobre grandes superficies de formas  
45 variadas, y por un procedimiento escalable industrialmente; al llevarse a cabo a temperatura ambiente, permite sus síntesis sobre superficies que únicamente pueden ser procesadas a bajas temperaturas, tales como materiales poliméricos; inhibe la adhesión bacteriana y la

formación de *biofilm* bacteriano en superficie y presenta propiedades adecuadas para la adhesión, extensión y proliferación osteoblástica.

5 El tercer objeto de la invención es el uso del implante en implantología ósea ya que se permite simultanear comportamientos contrarios frente a osteoblastos y bacterias, concretamente frente a *S. aureus* que es la principal causante de la infección de prótesis metálicas.

10 Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento humano o animal que comprende las siguientes etapas:

- insertar el implante mediante cirugía en un cuerpo humano o animal, preferentemente mediante cirugía ortopédica, craneal, dental y/o maxilofacial.

En una realización particular el implante puede ser de uso temporal o de uso permanente.

### 15 DESCRIPCIÓN FIGURAS:

**Figura 1:** Imágenes del implante obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (las imágenes de la izquierda son cortes transversales, a la derecha vistas cenitales) que presentan nanocolumnas obtenidas en diferentes condiciones de depósito mediante pulverización catódica en incidencia oblicua. A) Ángulo GLAD 70° y presión de operación en la cámara o presión de argón 0.15 Pa. B) Ángulo GLAD 80° y presión de argón 0.15 Pa. C) Ángulo GLAD 85° y presión de argón 0.15 Pa. D) Ángulo GLAD 60° y presión de argón 0.5 Pa.

25 **Figura 2:** Imágenes de superficies que no presentan nanocolumnas obtenidas mediante microscopia electrónica (a la izquierda cortes transversales, a la derecha vistas cenitales) obtenidas en diferentes condiciones mediante pulverización catódica en incidencia oblicua: A) Ángulo GLAD 60° y presión de argón 0.15 Pa. B) Ángulo GLAD 60° y presión de argón 1 Pa.

30 **Figura 3:** Diagramas de difracción de rayos X de muestras de nano-Ti6Al4V (arriba) y Ti6Al4V (abajo) adquiridos por incidencia rasante ( $\Omega = 0.5^\circ$ ). Las estrellas (\*) indican los máximos de difracción correspondientes a la aleación Ti6Al4V. Se indican los índices de Miller para la fase rutilo del TiO<sub>2</sub>.

35 **Figura 4:** Espectro infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT) de nano-Ti6Al4V (abajo) y Ti6Al4V (arriba) obtenidos por reflectancia total atenuada (ATR).

40 **Figura 5:** Imágenes SEM de: (A) Ti6Al4V, (B) nano-Ti6Al4V, el área seleccionada con una elipse indica una estimación del tamaño del osteoblasto. (C) nano-Ti6Al4V; el área seleccionada con un círculo indica una estimación del tamaño del *S. aureus*; (D) imagen SEM de una sección transversal de nano-Ti6Al4V mostrando las nanocolumnas.

**Figura 6:** Imágenes de AFM de: A) Ti6Al4V B) nano-Ti6Al4V. La escala de grises de la derecha indica la altura de los motivos, y tiene un máximo de 46nm y 380 nm para Ti6Al4V y nano-Ti6Al4V respectivamente.

5 **Figura 7:** Evaluación de la humectabilidad superficial A) Fotografía de una gota de agua sobre una muestra de Ti6Al4V (B) Imagen de una gota de agua sobre una muestra de nano-Ti6Al4V. (C) Evolución del ángulo de contacto en función del tiempo para ambas muestras.

10 **Figura 8:** (A) Adhesión de los osteoblastos tras 90 minutos sobre muestras de nano-Ti6Al4V y Ti6Al4V. (B) Actividad mitocondrial (test MTT) tras tres días de cultivo sobre Ti6Al4V y nano-Ti6Al4V.

15 **Figura 9:** Imágenes SEM obtenidas después de 24 horas de cultivo con células osteoblásticas sobre un sustrato de (A) y (C) Ti6Al4V; y (B) y (D) nano-Ti6Al4V. En C) se indican con elipses algunos de los anclajes formados por las células.

20 **Figura 10:** Conteo de colonias de *S. aureus* formadas tras 90 minutos de cultivo sobre superficies de nano-Ti6Al4V y Ti6Al4V. Con \* se indica diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$

**Figura 11:** Imágenes de microscopio de fluorescencia confocal tras 90 minutos de cultivo con bacterias vivas y muertas de *S. aureus* (A) y (B) Ti6Al4V; (C) y (D) nano-Ti6Al4V.

25 **Figura 12:** Imágenes SEM de muestras de (A) Ti6Al4V y (B) nano-Ti6Al4V tras 24 horas de cultivo con *S. aureus*. El inset en (a) es la superficie de una muestra Ti6Al4V antes del cultivo.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

30

**Ejemplo 1: Implante obtenido por el depósito de recubrimiento por pulverización catódica en incidencia oblicua sobre un biomaterial.**

En este ejemplo se indica cómo se ha formado el implante.

35

Utilizando pulverización catódica en incidencia oblicua se ha depositado un recubrimiento formado por titanio nanoestructurado sobre un disco de aleación Ti6Al4V pulido mecánicamente a espejo (rugosidad cuadrática media inferior a 5 nm medida en un área de  $4 \mu\text{m}^2$ ), de 1 cm de diámetro y 2 mm de espesor. La cámara tiene una presión base (previa a la introducción del gas) inferior a  $5 \times 10^{-7}$  Pa (ultra-alto vacío) y la distancia blanco - sustrato es de 22 cm. El blanco de 5 cm de diámetro y 5 mm de espesor utilizado era de titanio con una pureza de 99.999 %, y tenía encima una chimenea cilíndrica de 5 cm de diámetro y 9 cm de longitud (esta chimenea sirve principalmente para evitar contaminación cruzada con otros blancos en la cámara, pero además ayuda a la colimación del flujo atómico direccionando el flujo de material hacia la superficie del sustrato). El parámetro L/d tenía un valor de 4.4. Durante el depósito se utilizó una presión en el reactor o presión de operación de la cámara, dada por la presión del gas argón de entre 0.15 y 3 Pa y una

45

excitación DC con potencia constante de 300 W. La temperatura del sustrato se mantuvo por debajo de los 350 K. El ángulo de inclinación se varió entre 0° y 85°. Se ha operado dentro del régimen balístico cumpliendo que  $p_dL$  es inferior a 12 en todos los casos.

- 5 El implante obtenido se observó utilizando SEM, en la tabla 1 se pueden observar cuando se forman nanocolumnas en función de la presión de operación en la cámara, que es debida al gas inerte introducido, y el ángulo de inclinación del sustrato respecto a la vertical del sustrato:

10

P (Pa)	Ángulo de inclinación					
	0°	45°	60°	70°	80°	85°
0.15	X	X	X	C	C	C
0.5	X	X	C			
1	X	X	X			
1.5	X	X	X			
3	X					

**Tabla 1:** Relación de recubrimientos obtenidos mediante pulverización catódica en incidencia oblicua.

- 15 Las celdas que contienen la letra C indican las situaciones donde se han observado nanocolumnas, la letra X indica situaciones donde no se han formado nanocolumnas.

En la Figura 1 se muestran varios casos representativos de nanocolumnas observadas mediante microscopía electrónica de barrido (o SEM, por las siglas del inglés *Scanning Electron Microscopy*), mientras que en la Figura 2 se indican casos donde no se forman las nanocolumnas.

En el caso de obtención de titanio nanoestructurado con forma nanocolumnar las nanocolumnas obtenidas tienen un diámetro de 30 a 100 nm, una separación entre 50 y 150 nanómetros, y una inclinación respecto a la vertical del sustrato de entre 0° y 30°.

**Ejemplo 2: Uso del implante en implantología ósea.**

En este ejemplo se muestra como el implante obtenido en las condiciones del ejemplo 1 tiene propiedades osteointegradoras inhibitoras de la formación de *biofilm* bacteriano.

El implante ha sido obtenido según el procedimiento del ejemplo 1 utilizando una presión de argón de 0.15 Pa y un ángulo GLAD de 80°. La temperatura del sustrato se mantuvo por debajo de los 350 K.

35

En este caso particular, la superficie del implante es la superficie del recubrimiento y está formada por titanio nanoestructurado que forma nanocolumnas con dimensiones en el rango de 100 a 300 nm de altura y entre 30 a 100 nm en diámetro. Las nanocolumnas crecen durante el depósito en la superficie de Ti6Al4V cubriendo la superficie con un alto grado de

densidad, i.e. un gran grado de nanomotivos en la unidad de área con un espacio medio de 100 nm.

5 Se han realizado estudios por difracción de rayos X (representados en diagramas de rayos X o DRX) con un difractómetro Philips Model X'Pert en el rango  $2\theta$  de 20 – 80. Para obtener información preferentemente de la superficie del disco, se utilizó el método de incidencia rasante usando un ángulo rasante  $\omega$  de 0.5°. En la Figura 3 se muestran los diagramas de difracción de rayos X obtenidos por incidencia rasante para un sustrato de Ti6Al4V comercial (en adelante Ti6Al4V) sin el recubrimiento y para el recubrimiento objeto de la invención o nano-Ti6Al4V. Los máximos de difracción para Ti6Al4V se pueden asignar a la fase hexagonal  $\alpha$ -Ti (la fase principal de las aleaciones de Ti6Al4V) con grupo espacial P63/mmc. El diagrama de difracción de rayos X para nano-Ti6Al4V muestra los máximos de difracción correspondientes a la fase  $\alpha$ -Ti junto con una fase secundaria de rutilo TiO<sub>2</sub> con grupo espacial P42/m. Se han realizado espectros por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-FT) utilizando un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus equipado con un dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR) Goldengate. En la Figura 4 se muestra el espectro de Ti6Al4V y de nano-Ti6Al4V observándose en ambas muestras bandas de absorción correspondientes a enlaces Ti-O-Ti en un amplio rango de frecuencias que van desde de 950 a 500 cm<sup>-1</sup>, lo cual es indicativo de las capas de TiO<sub>2</sub> en la superficie del Ti6Al4V y de nano-Ti6Al4V. Así mismo, se observan bandas correspondientes al modo de tensión del enlace O-H, asignables a la presencia de grupos Ti-OH en superficie.

Finalmente, en el sustrato se observan las bandas del modo fonón (entre 1100 y 1400 cm<sup>-1</sup>) del Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, cuya presencia es característica en la superficie de la aleación Ti6Al4V. Esta banda no aparece en el material nano-Ti6Al4V lo que indica que el sustrato ha sido eficazmente recubierto por las nanocolumnas de titanio. La presencia de máximos de difracción en el diagrama de rayos X correspondientes a una fase tipo rutilo de TiO<sub>2</sub> en nano-Ti6Al4V y la presencia de bandas de absorción en el infrarrojo asignables a enlaces Ti-O-Ti, evidencian la presencia de una capa de TiO<sub>2</sub> que recubrirían las nanocolumnas de Ti crecidas sobre el sustrato de Ti6Al4V.

La estructura del implante se puede ver en la Figura 5. Para ello se realizaron medidas con un SEM. La superficie inicial del sustrato de Ti6Al4V no presenta rugosidad apreciable a la observación por SEM (Figura 5A), lo que se corresponde con una superficie pulida a espejo. Sin embargo, la superficie de nano-Ti6Al4V en la misma escala aparece totalmente cubierta de una nanorugosidad como consecuencia del depósito de Ti sobre el sustrato de Ti6Al4V debido al crecimiento de nanocolumnas. Las medidas de microscopía de fuerza atómica (o AFM del inglés *Atomic Force Microscopy*) de ambas superficies (Figura 6) muestran la diferencia en rugosidad, en el Ti6Al4V es de 3nm (valor cuadrático medio o RMS del inglés *Root Mean Square*) en un área de 4  $\mu\text{m}^2$ , mientras que en el nano-Ti6Al4V el valor de la rugosidad medida es de 57 nm en un área de 4  $\mu\text{m}^2$ .

El ángulo de contacto se midió por el método de la gota-pendiente en un equipo de ángulo de contacto CAM 200 KSV a 25 °C tomando fotos cada 1 segundo. Los estudios por ángulo de contacto (Figura 7) indican un aumento significativo de la hidrofobicidad tras el proceso de recubrimiento. Los ángulos de contacto inicial, tras 1 segundo, fueron 56° and 102° para Ti6Al4V y nano-Ti6Al4V, respectivamente. El ángulo de contacto para nano-Ti6Al4V

permaneció constante en el tiempo, indicando una baja humectabilidad, indicativo de superficies hidrofóbicas, mientras que el ángulo de contacto de Ti6Al4V disminuyó hasta 44° durante los primeros 8 segundos, indicativo de una alta humectabilidad característica de las aleaciones de Ti6Al4V.

5

#### *Cultivo de osteoblastos*

Previamente al cultivo in vitro de osteoblastos, las muestras fueron esterilizadas y secadas en seco a 150° durante 12h. Se usó una línea celular de osteosarcoma humano (HOS) obtenida a través de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, no. 87070202). Las células se cultivaron en medio completo consistente en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) suplementado con 2 mM L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation, USA), 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina (Life technologies limited, Scotland), 100 g mL<sup>-1</sup> estreptomycin (Life technologies limited, Scotland), y 10% de suero fetal bobino (FBS) (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) a 37°C en atmósfera húmeda de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>. Las células HOS fueron rutinariamente tripsinizadas y subcultivadas. Posteriormente las células HOS se sembraron en diferentes placas de 24 pocillos con una densidad de siembra de 2.5x 10<sup>5</sup> células por mL en medio completo bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo para cada uno de los ensayos.

20

#### *Estadística*

Los datos obtenidos de los cultivos de osteoblastos y bacterianos se expresan como la media ± la desviación estándar de experimentos realizados sobre tres muestras diferentes. El análisis estadístico se lleva a cabo con el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 11.5. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias entre grupos se determinaron por evaluación post hoc utilizando el test de Scheffe. Para todas las evaluaciones estadísticas, se consideró un valor de diferencia como significativamente estadístico para p < 0,05.

30

#### *Adhesión celular de osteoblastos*

Para los estudios de adhesión de los osteoblastos sobre la superficie del implante, esto es en este caso la superficie del recubrimiento, las muestras se incubaron bajo condiciones estándar de cultivo durante 90 min. Después se lavaron las muestras tres veces en PBS; tras lo cual las células se separaron mediante un tratamiento con tripsina durante 10 min. Tras centrifugación las células se resuspendieron en PBS y se contaron en una cámara Neubauer. En la Figura 8, se indican los resultados de la biocompatibilidad in vitro realizados con HOS sobre la superficie del recubrimiento. Para ello se consideran los resultados de adhesión inicial (90 minutos) y proliferación de las células HOS tras 3 días de cultivo, mediante la cuantificación de la actividad mitocondrial. Los datos de las Figuras 8A y 8B se expresan en valores medios ± desviación standard de medidas llevadas a cabo sobre tres muestras diferentes. La adhesión inicial de los osteoblastos (90 minutos) no muestra diferencias significativas entre Ti6Al4V, nanoTi6Al4V, y el control (plástico de la placa de cultivo).

45

#### *Proliferación celular de osteoblastos*

La proliferación celular se determinó en función de la actividad celular mitocondrial. Para ello las células HOS se sembraron en la superficie del material en placas de 24 pocillos con

una densidad de  $10^5$  células por mL en el medio completo y se incubaron en condiciones standard. La determinación de la proliferación celular se realizó utilizando el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich, USA) a diferentes períodos de tiempo tras el sembrado. Como control se utilizó el plástico de la placa de cultivo. La determinación cuantitativa se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV-VIS llevando a cabo a lectura a 570 nm. La actividad mitocondrial se relaciona directamente con la absorbancia a dicha longitud de onda. La actividad mitocondrial de HOS es casi idéntica para las dos superficies y no muestra diferencias respecto al control tras 3 días de cultivo, como se observa en la Figura 8B.

#### *Ensayos de extensión celular de osteoblastos*

El grado de extensión celular y la morfología de los osteoblastos se observaron mediante microscopía SEM. Las células adheridas se lavaron tres veces en PBS y se fijaron con 2.5% glutaraldehído (50% wt. Sigma-Aldrich, USA) en PBS durante 45 min. La deshidratación de las muestras se realizó reemplazando lentamente el medio, usando series de etanol con concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90%) durante 30 min con una deshidratación final en etanol absoluto durante 60 min, que permitió a las muestras secarse a temperatura ambiente en vacío. Las muestras de Ti6Al4V y nano-Ti6Al4V se montaron en portas y se recubrieron con oro para la visualización en el SEM.

En la Figura 9 se muestra la superficie tras un día de cultivo de células HOS sobre la superficie del recubrimiento. La superficie aparece totalmente cubierta por las células mostrando una buena adhesión, proliferación y grado de extensión. Las micrografías obtenidas a mayores aumentos muestran los elementos de anclaje formados por las células. La Figura 9d muestra un detalle de las nanocolumnas que quedan debajo de la capa de osteoblastos.

#### *Cultivos bacterianos con S. aureus*

Los estudios preliminares de adhesión bacteriana in vitro se han realizado utilizando una cepa ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) como modelo de bacteria bajo las condiciones estáticas comúnmente recogidas en la literatura (Montanaro L, *et al*, *Future Microbiology* 2011, 6 (11): 1329-49.) Las muestras se esterilizaron mediante calor seco a 150 °C durante 12 h. Las bacterias de *S. aureus* crecieron hasta su fase media logarítmica en medio de crecimiento Todd Hewitt (THB) Sigma–Aldrich, USA) a 37 °C bajo agitación magnética a 100 rpm, hasta que la densidad óptica medida a 600 nm alcanzase 1.0. En este punto se recolectaron las bacterias del cultivo por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS estéril manteniendo el pH 7.4 y se resuspendió en PBS a una concentración de  $6 \times 10^8$  células. $\text{ml}^{-1}$ . Posteriormente se incubó a 37 °C bajo agitación magnética a 100 rpm para diferentes tiempos de incubación, en presencia de los biomateriales objeto de estudio.

#### *Ensayos de adhesión de S. aureus*

El tiempo de incubación con las bacterias suspendidas fue de 90 minutos. Posteriormente las muestras se retiraron asépticamente de la suspensión bacteriana y se aclararon tres veces en PBS para eliminar las bacterias libres. La cuantificación de las bacterias unidas a la superficie del material nanoestructurado se ha realizado mediante el siguiente método, cada pieza se puso en un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de PBS estéril. A continuación

se sonicó durante 30 s asumiendo que el 99.9 de% de las bacterias que quedaban eran separadas de la superficie. Después se tomaron 100 ml de cada producto obtenido tras la sonicación y se cultivaron en discos de Tryptic Soy Agar (TSA) (Sigma Aldrich, USA), seguido de incubación durante una noche a 37° C. La determinación de las unidades de formadoras de colonia (CFU) resultantes de la suma de los tres procesos de sonicación permitió determinar el número de bacterias originales adheridas a las piezas. Los cultivos bacterianos de *S. aureus* realizados sobre las superficies de Ti6Al4V (Figura 10) no muestran diferencias significativas respecto del control tras 90 minutos de exposición. Sin embargo en el caso de nano-Ti6Al4V, la adhesión de *S. aureus* es tres veces menor respecto de Ti6Al4V.

#### *Microscopía confocal de S. aureus*

Tras 90 minutos de incubación en PBS, las muestras se tiñeron durante 15 minutos con el kit de viabilidad bacteriano de luz de fondo Invitrogen Live/Dead. Se han realizado estudios de microscopia confocal con un microscopio Biorad MC1025. La fluorescencia SYTO 9 (bacterias vivas, verde) se excita a una longitud de onda de 480/500 nm, emitiendo fluorescencia a 500 nm. La fluorescencia de yoduro de propidio (bacterias muertas/rojas) se excitó a 490/635 nm y se midió la fluorescencia emitida a 618 nm. En la Figura 11 se muestran las imágenes obtenidas con microscopia confocal tras 90 minutos de cultivo. Las imágenes muestran una menor adhesión bacteriana sobre nano-Ti6Al4V, en total acuerdo con el conteo mostrado en la Figura 11. No se han observado diferencias significativas en el ratio vivas/muertas cuando se compararon las superficies de Ti6Al4V y nano-Ti6Al4V. Este hecho indica que la actividad antibacteriana de los recubrimientos se ejerce gracias a las propiedades antiadherentes del mismo, sin que se observen efectos bactericidas frente a *S. aureus*.

#### *Microscopía SEM de S. aureus*

El estudio por SEM se llevó a cabo preparando las muestras de forma análoga a la descrita para los estudios con osteoblastos. En la Figura 12 se ven las superficies de Ti6Al4V y nano-Ti6Al4V tras 24 horas de cultivo con *S. aureus*. La Figura 12A corresponde la superficie de la muestra Ti6Al4V y se puede observar a las bacterias rodeadas de una matriz extracelular identificada como *biofilm* bacteriano y que cubre a la superficie pulida del sustrato. Con el fin de destacar la presencia del *biofilm* bacteriano, la figura 12 contiene un *inset* en el que se observa cómo es la superficie limpia de biofilm antes del cultivo bacteriano mientras, que por el contrario, la superficie de la muestra nano-Ti6Al4V muestra una micrografía en la que las bacterias presentes no han podido formar biofilm, permitiendo ver la nanoestructura de la muestra nano-Ti6Al4V.

## REIVINDICACIONES

- 1 Implante que comprende un recubrimiento de titanio depositado sobre un sustrato caracterizado porque
- 5
- el sustrato comprende un biomaterial con una rugosidad cuadrática media inferior a 5 nm en un área de  $4 \mu\text{m}^2$ ,
  - el recubrimiento tiene una pureza superior al 95% y comprende titanio nanoestructurado formado por titanio metálico y una capa de óxido de titanio,
  - 10 - el titanio nanoestructurado tiene forma nanocolumnar donde el diámetro de las nanocolumnas es de 30 a 100 nm y la altura varía entre 100 y 300 nanómetros, el espacio entre nanocolumnas varía entre 50 y 150 nanómetros con una inclinación de la nanocolumna respecto a la vertical del sustrato de entre  $0^\circ$  y  $30^\circ$ .
- 15 2 Implante según la reivindicación 1 donde el biomaterial del sustrato comprende al menos uno de los materiales siguientes
- titanio comercialmente puro con pureza superior al 99% de grado médico para implantes periodontales,
  - aleaciones metálicas de grado médico como CrCo, acero inoxidable, Ti6Al4V para
  - 20 aplicaciones ortopédicas, craneales y maxilofaciales,
- 3 Implante según la reivindicación 2 donde el biomaterial del sustrato comprende Ti6Al4V.
- 4 Implante según cualesquiera de las reivindicaciones 2 a 3 donde el biomaterial del
- 25 sustrato está conformado en estructuras que comprenden discos, tornillos, clavos, vástagos, placas de osteosíntesis y demás dispositivos de fijación de fracturas, generalmente fabricadas en acero inoxidable.
- 5 Procedimiento de obtención del implante de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende depositar el recubrimiento sobre el sustrato utilizando técnicas en incidencia oblicua (GLAD).
- 30 6 Procedimiento según la reivindicación 5 donde el depósito se realiza en un sistema de pulverización catódica.
- 7 Procedimiento según la reivindicación 6 donde el sistema de pulverización catódica comprende un magnetrón.
- 8 Procedimiento según la reivindicación 7 donde el depósito comprende las siguientes
- 35 etapas:
- a) introducción del sustrato en la cámara del sistema de pulverización catódica,
  - b) cierre de la cámara y realización de vacío,
  - c) introducción de gas en la cámara,
  - d) excitación electromagnética de las partículas del gas presentes en la cámara
  - 40 mediante una fuente,
  - e) choque de las partículas presentes en la cámara contra un blanco de titanio,
  - f) depósito del material desprendido del blanco sobre el sustrato,

caracterizado por que el producto de la presión de operación ( $P_g$ ) por la distancia blanco – sustrato (L), cumple la condición de régimen balístico para la pulverización de Ti, dada por  $p_g L < 12 \text{ Pa cm}$ ; y el sustrato forma con el blanco un ángulo de inclinación superior a  $60^\circ$ .

5

9 Procedimiento según la reivindicación 8 caracterizado por que el vacío alcanzado es inferior a  $10^{-4} \text{ Pa}$ , en la cámara se cumple que el cociente  $L/d$  es superior a 3.5, siendo d el diámetro del blanco y L la distancia blanco-sustrato

10 Uso del implante definido en las reivindicaciones 1 a 4 en implantología ósea.

10 11 Uso según la reivindicación 10 en implantes de uso temporal o de uso permanente.

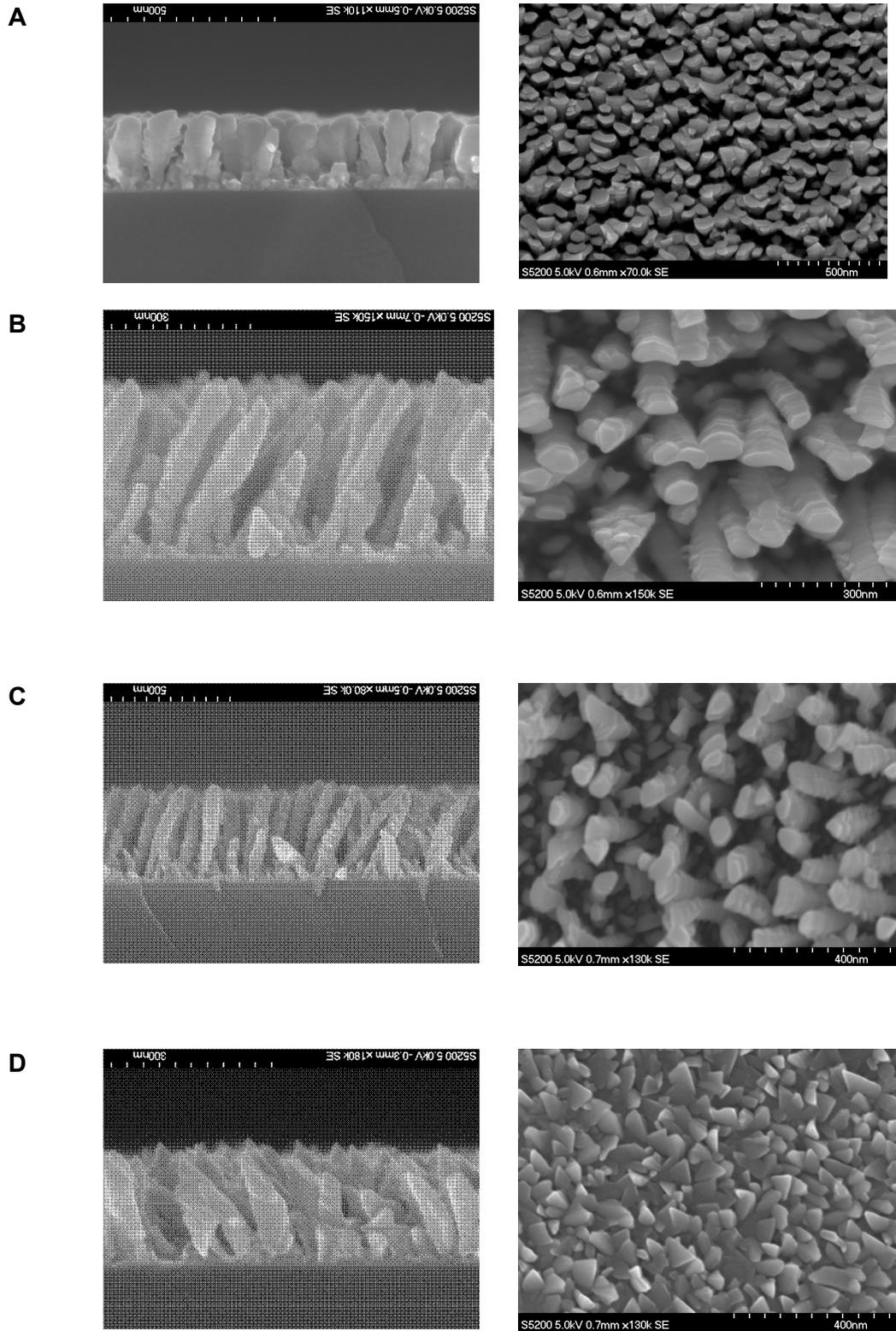


Figura 1

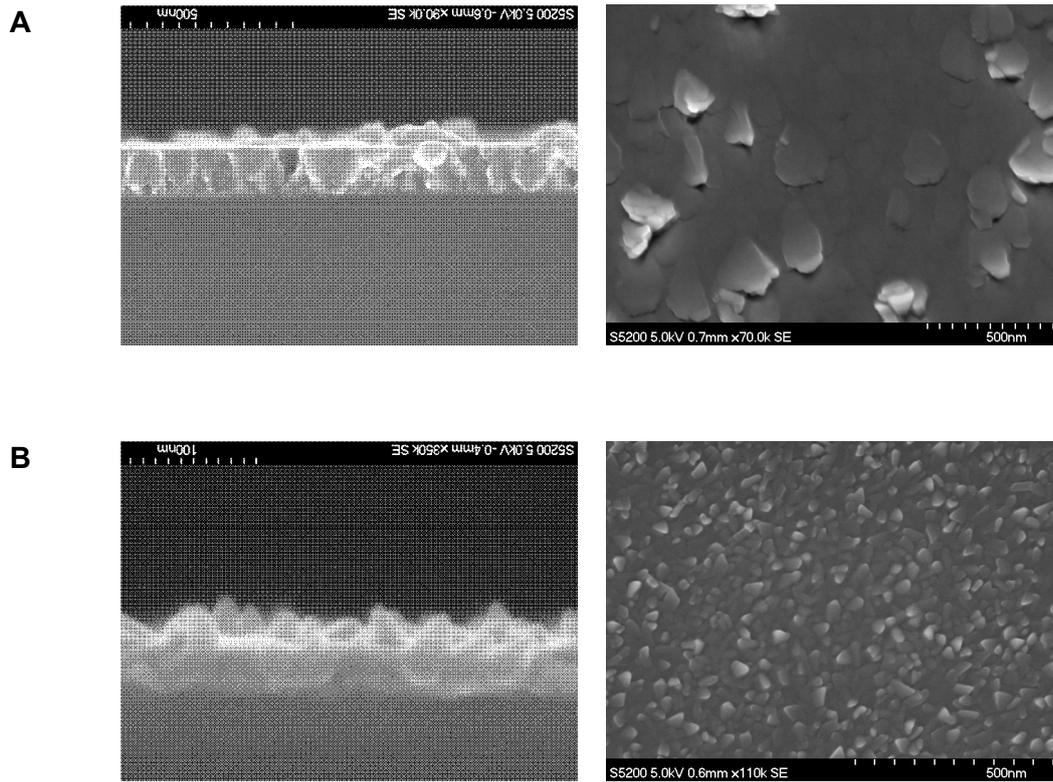


Figura 2

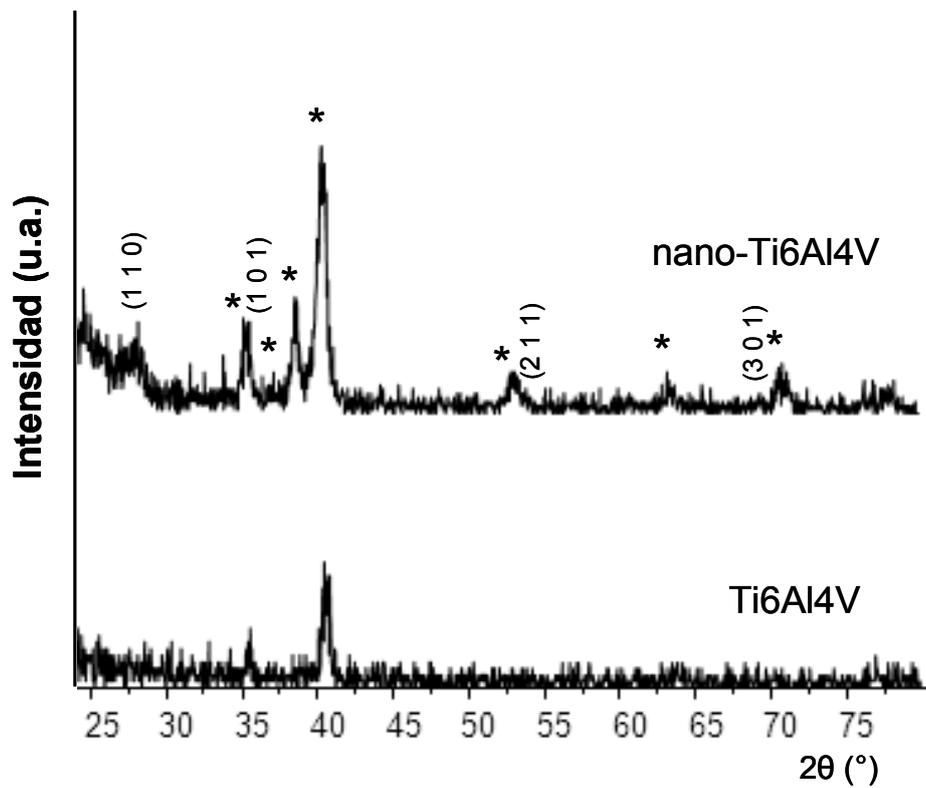


Figura 3

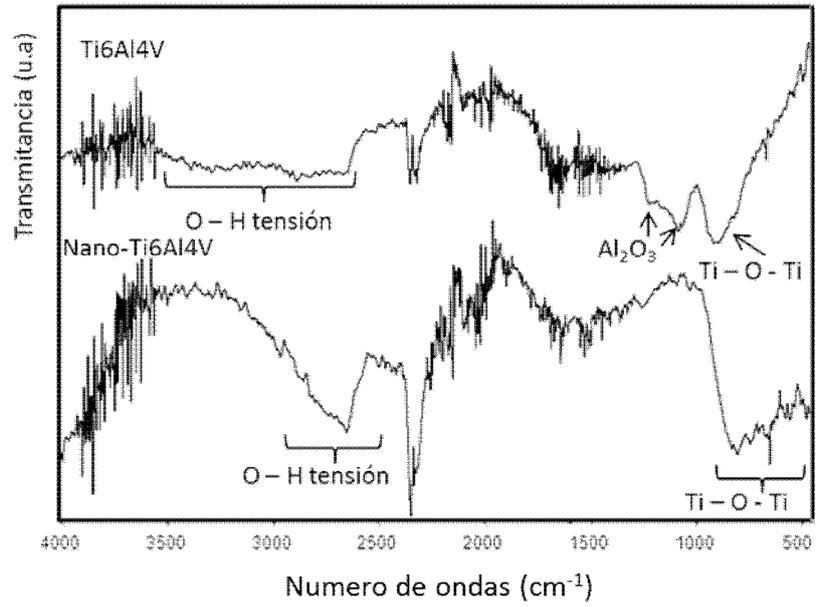


Figura 4

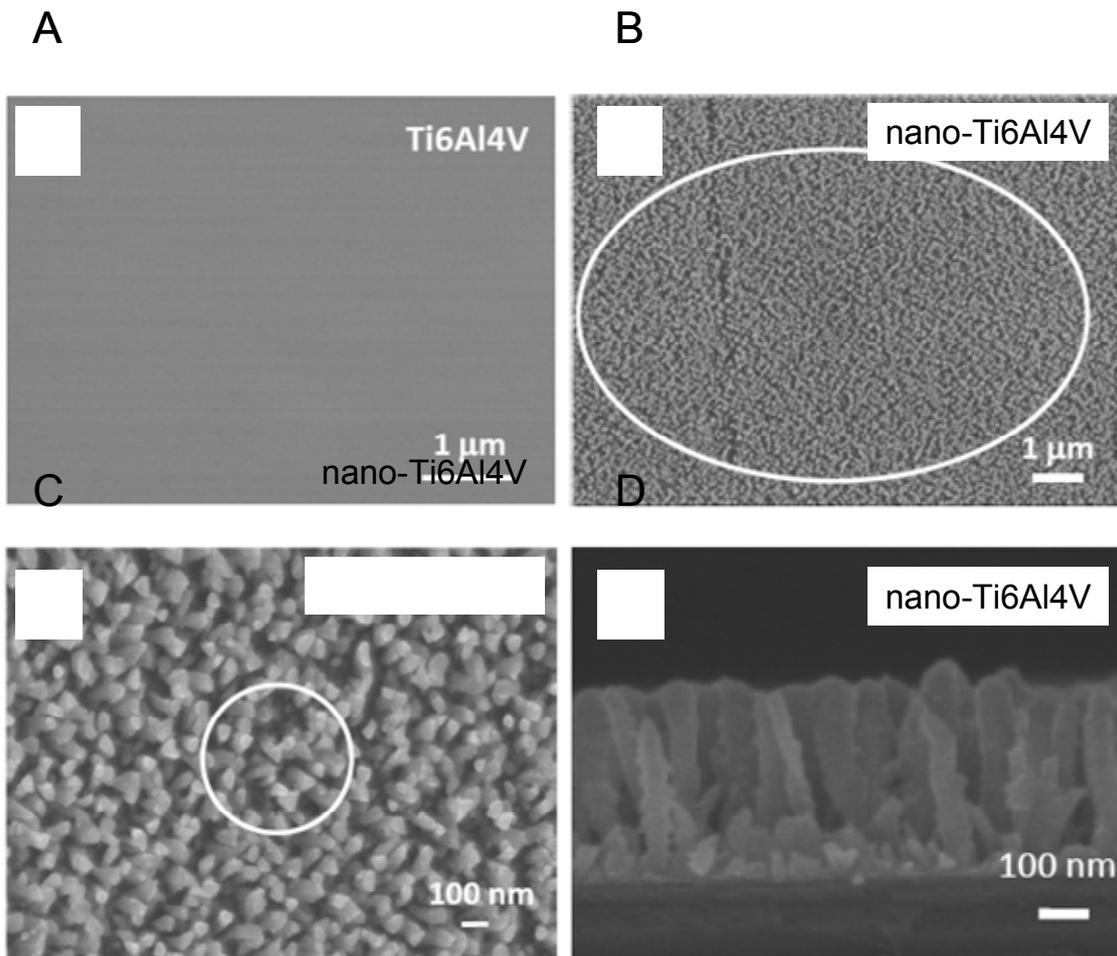


Figura 5

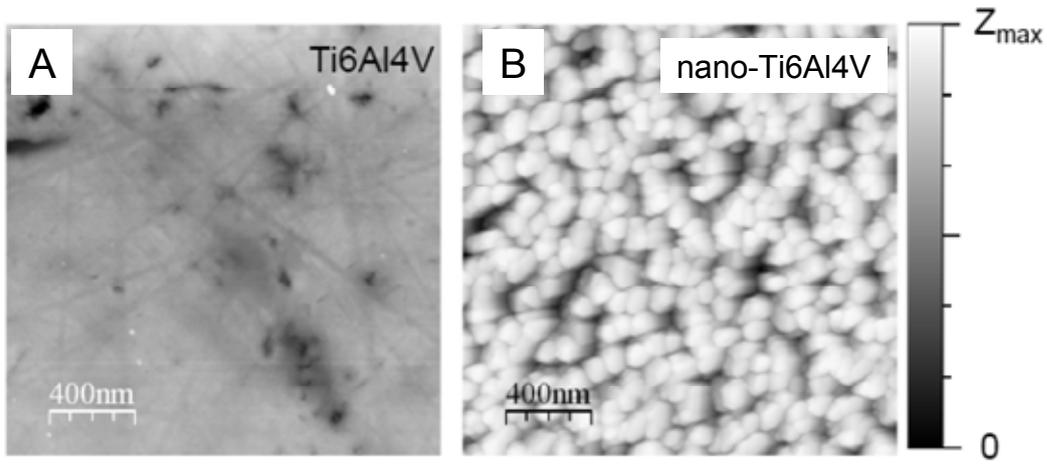


Figura 6

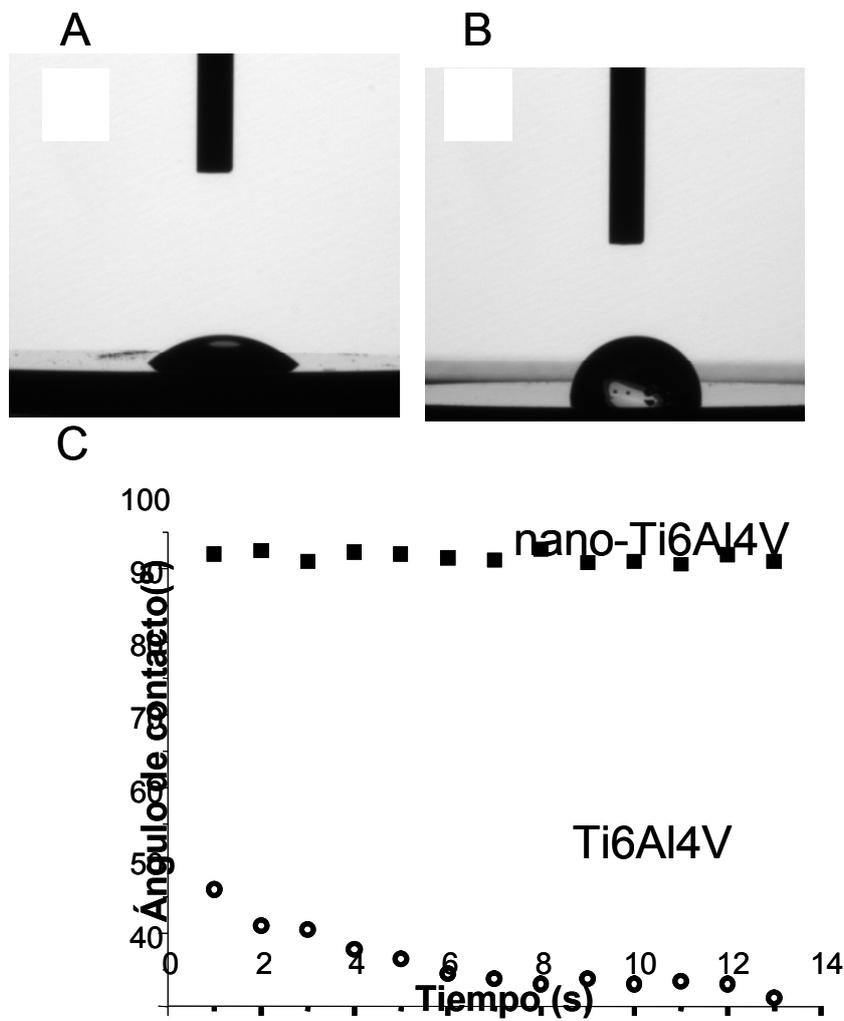


Figura 7

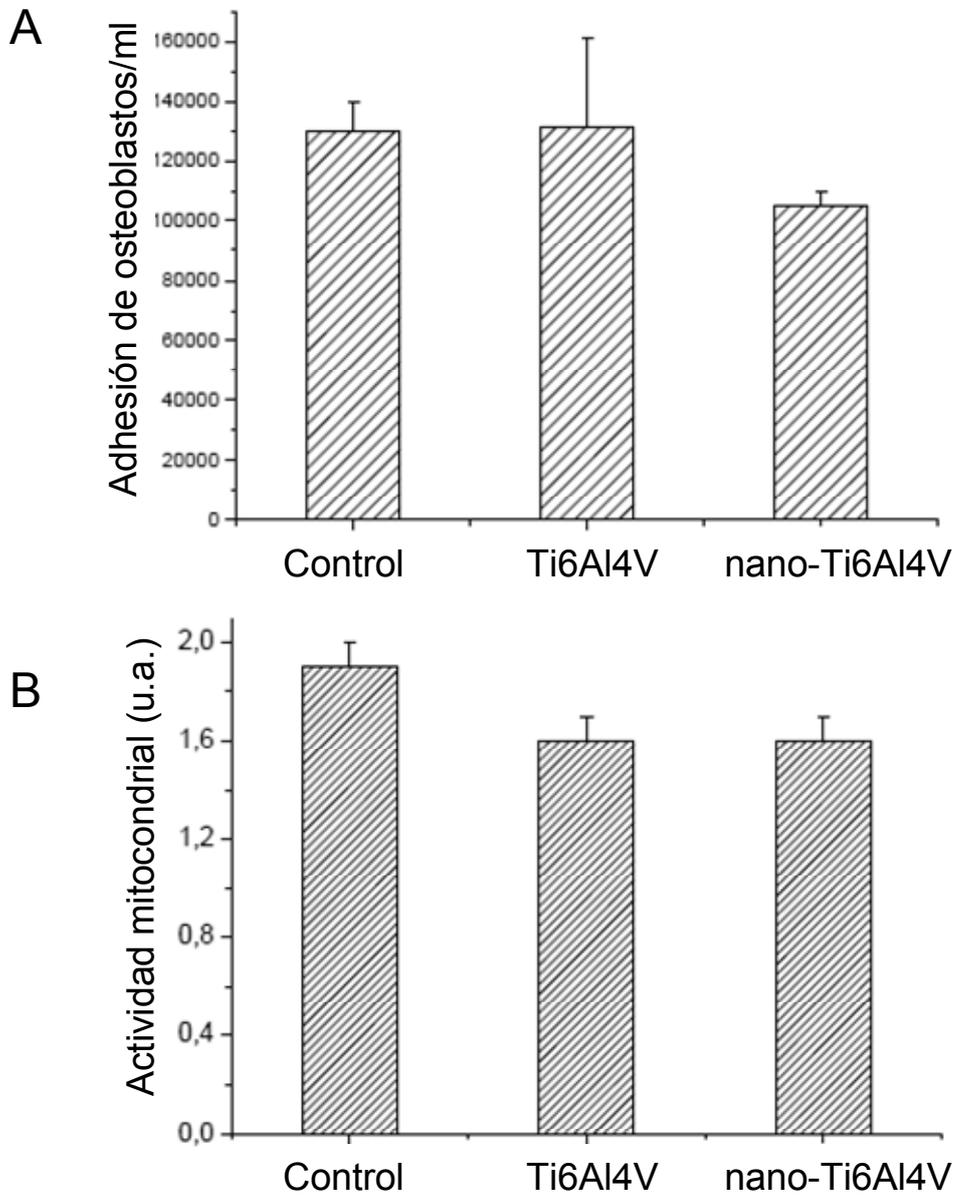


Figura 8

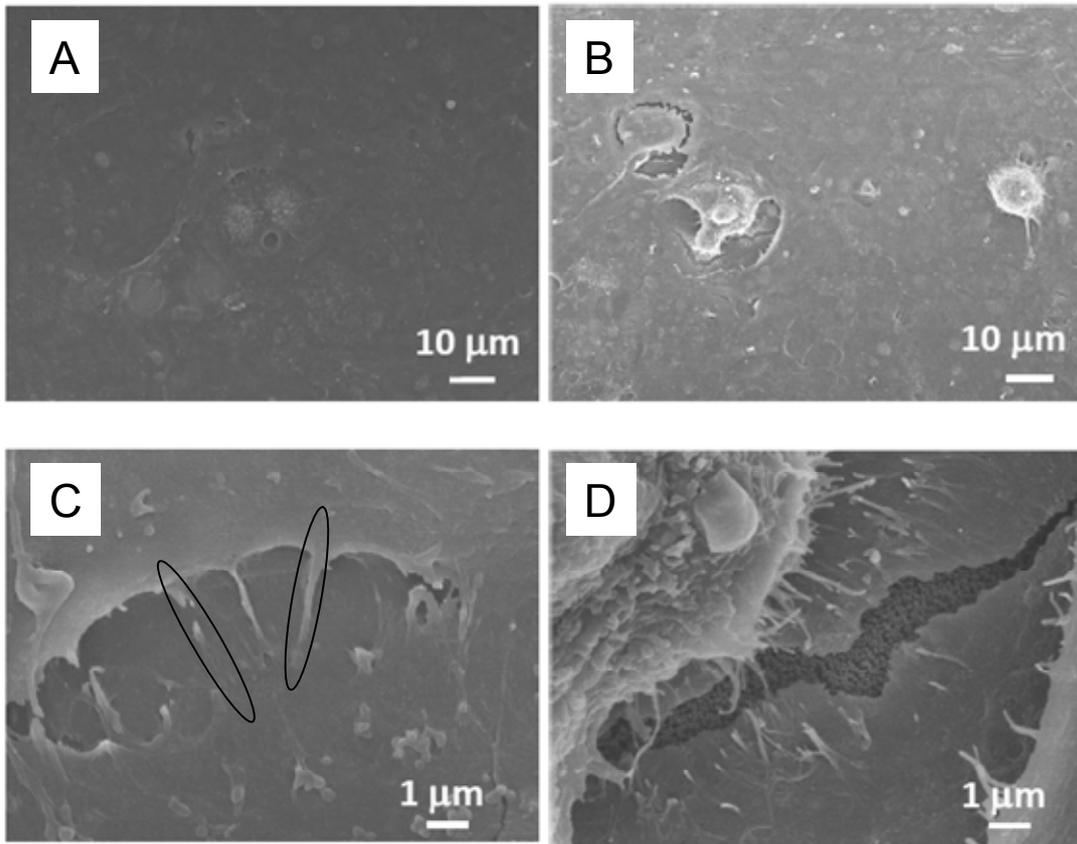


Figura 9

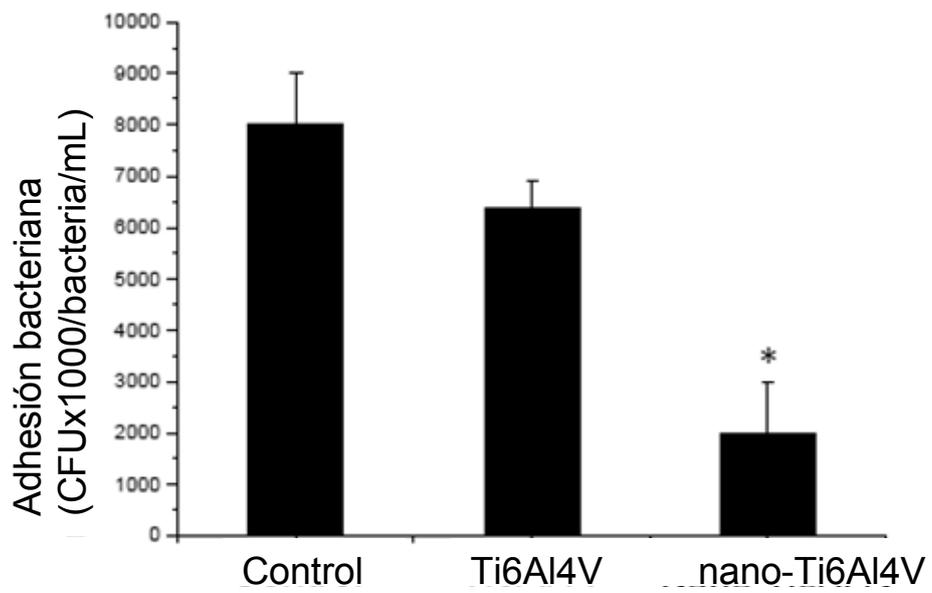


Figura 10

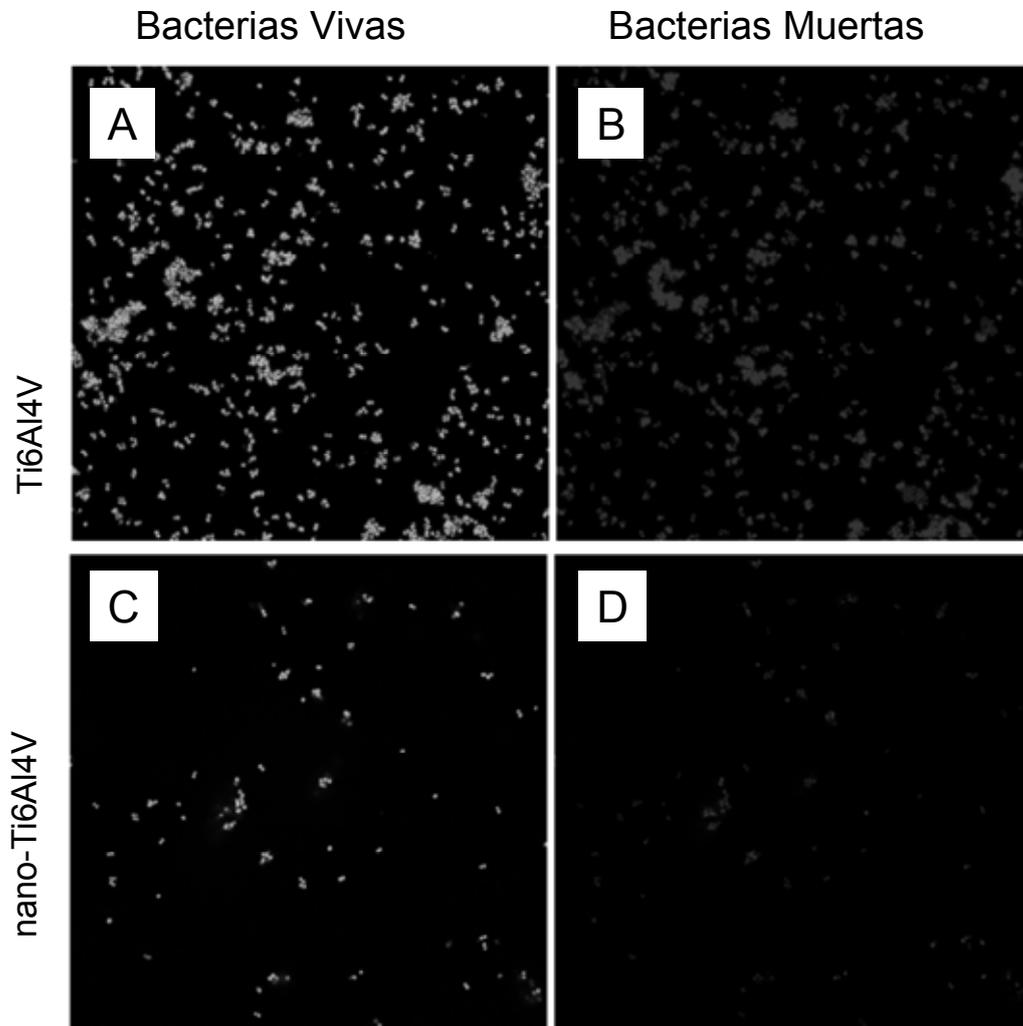


Figura 11

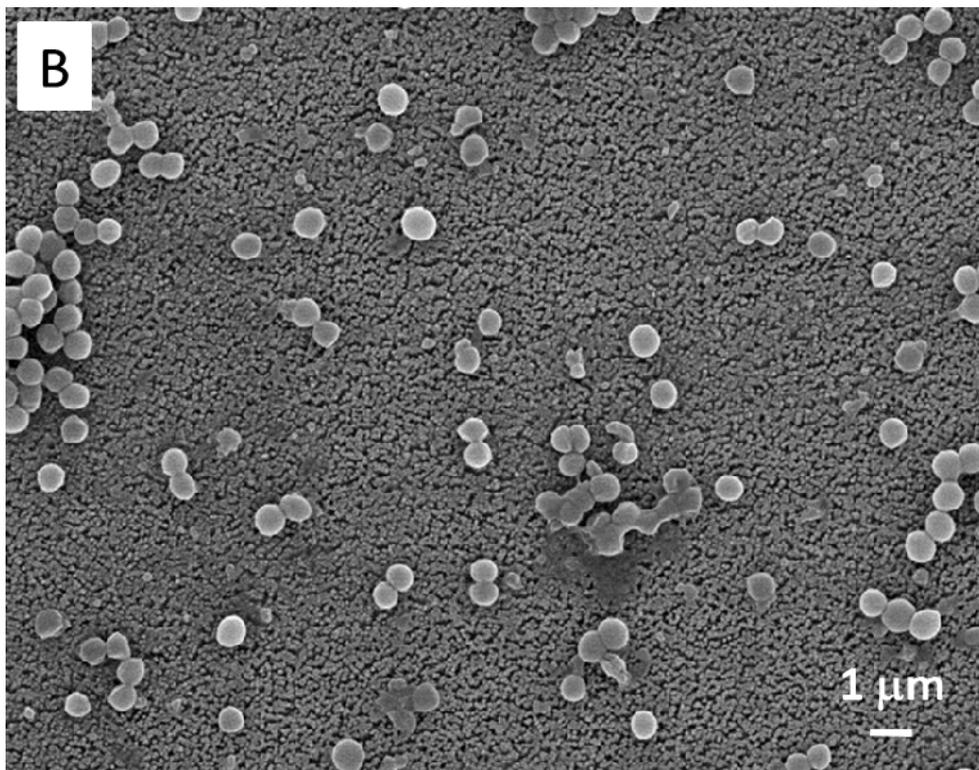
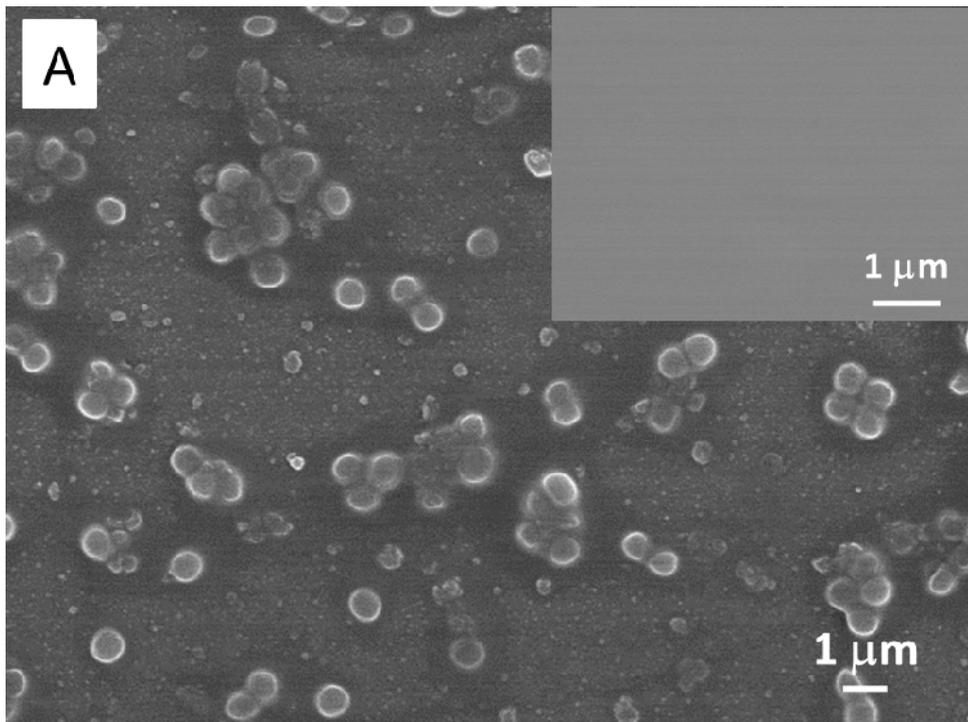


Figura 12