



I N T E M A

# Estudio *in vitro* de implantes temporarios de aleación de magnesio (AZ91) modificados superficialmente mediante anodizado.

---

Autora: Martina Belén Gómez

Directora: Dra. Josefina Ballarre

Co-Directora: Dra. Silvia Ceré

Ingeniería en Materiales, UNMdP

División Electroquímica Aplicada, INTEMA-CONICET-UNMDP

Abril, 2019



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## Contenido

1	Resumen.....	5
2	Objetivos.....	6
3	Introducción.....	7
3.1	Materiales para implantes .....	7
3.1.1	Metales para aplicaciones biomédicas .....	8
3.1.2	Corrosión implantes metálicos.....	9
3.1.3	Magnesio como biomaterial.....	11
3.2	Anodizado .....	14
3.3	Técnicas de caracterización.....	15
3.3.1	Perfilometría y rugosidad.....	15
3.3.2	Procesamiento digital de imágenes.....	18
3.3.3	Espectroscopia Raman .....	18
3.3.4	Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	19
3.3.5	Ensayos electroquímicos .....	19
4	Experimental.....	24
4.1	Materiales y soluciones .....	24
4.1.1	Sustrato .....	24
4.1.2	Solución fisiológica simulada (SBF) .....	25
4.2	Caracterización de las muestras.....	26
4.2.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	26
4.2.2	Perfilometría y rugosidad.....	27
4.2.3	Procesamiento digital de imágenes.....	27
4.2.4	Curvas potenciodinámicas.....	29
4.3	Estudios <i>in vitro</i> .....	30

4.3.1	Ensayo de bioactividad <i>in vitro</i> .....	30
4.3.2	Microscopía – Espectroscopía Raman.....	31
4.3.3	Ensayos electroquímicos .....	31
5	Análisis de resultados y discusión .....	34
5.1	Caracterización superficial .....	34
5.1.1	SEM .....	34
5.1.2	Rugosidad.....	35
5.1.3	Procesamiento digital de imágenes.....	36
5.2	Estudios <i>in vitro</i> de inmersión prolongada .....	40
5.2.1	Análisis visual.....	40
5.2.2	Espectroscopía Raman .....	42
5.2.3	Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) .....	45
5.2.4	Polarización potenciodinámica.....	49
5.3	Discusión final .....	53
6	Análisis económico.....	54
7	Conclusiones .....	56
8	Trabajo a futuro .....	57
9	Referencias .....	58

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras Josefina Ballarre y Silvia Ceré por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, acompañándome desde el primer momento y siempre predispuestas a responder todas mis inquietudes y consultas.

Al grupo de electroquímica aplicada, donde compartí el día a día con excelentes compañeros y me hicieron sentir siempre cómoda y bienvenida.

A Juan Pastore y Francisco Buchelly, del Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes, quienes colaboraron en el análisis de resultados.

A mis amigas de toda la vida, ellas no solo me acompañan desde el primer día, si no que me alientan en cada proyecto a seguir adelante, dándome siempre sus consejos y sacándome una risa en todo momento.

A los amigos que me llevo de la facu. Entre mates y estudio hicieron de esta etapa algo inolvidable, gracias por el apoyo incondicional.

Y por último a mi familia, que siempre con la palabra de aliento justa, y una sonrisa supieron llevarme adelante en este camino y en todos los que emprendo en la vida.

Párrafo aparte para mi mamá, Lore. Ella es la persona que me enseñó a nunca rendirme y a dedicarme a mis objetivos con pasión como lo hizo ella toda la vida, dejándome siempre en claro que era capaz de alcanzar cada meta que me proponga. Gracias por tu amor infinito.

## 1 Resumen

La utilización del magnesio y sus aleaciones como potenciales implantes temporarios ha sido ampliamente analizada. Sin embargo, la rápida velocidad de degradación del magnesio en el medio fisiológico ha traído dificultades a la hora de aplicar estos materiales terapéuticamente. En este trabajo se analizó el comportamiento de la aleación AZ91 con un tratamiento superficial de anodizado para su posible utilización como implante temporario. Dicho tratamiento, se realizó con el objetivo de disminuir la velocidad de disolución inicial de la aleación y obtener un aumento en la bioactividad inicial. La morfología y rugosidad superficial fueron analizadas mediante SEM y ensayos de rugosidad, mientras que la liberación inicial de hidrógeno gaseoso al medio fue analizada mediante una técnica de procesamiento de imágenes digital complementada con la obtención de curvas potenciodinámicas en los primeros momentos de inmersión de la muestra en solución fisiológica simulada (SBF). La caracterización *in vitro* consistió en la inmersión de muestras con y sin tratamiento de anodizado durante uno, siete y treinta días en SBF a 37°C, seguido de un análisis de los depósitos mediante espectroscopia Raman. La caracterización electrodinámica fue realizada mediante las técnicas de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y la obtención de curvas de polarización.

En el análisis a tiempos iniciales de inmersión, se presentó una disminución en el volumen de hidrógeno liberado al medio en las muestras anodizadas con respecto a las muestras sin tratamiento. Asimismo, en los estudios de caracterización superficial se hallaron depósitos de fosfatos a tiempos menores de inmersión para las muestras anodizadas. En cuanto al comportamiento electroquímico, no se observaron diferencias entre las muestras con y sin tratamiento previo.

## 2 Objetivos

El objetivo general de este proyecto es estudiar el comportamiento *in vitro* de un tratamiento de anodizado sobre aleación de magnesio AZ91 en medio fisiológico simulado, para su posible utilización como implante temporario.

Como objetivos particulares se plantea:

- Caracterizar *in vitro* la disolución y generación de subproductos de degradación de la aleación AZ91 con terminación superficial pulida, en SBF.
- Generar óxidos por anodizado sobre muestras planas de magnesio AZ91.
- Caracterizar *in vitro* las películas superficiales generadas por anodizado mediante ensayos de bioactividad.
- Analizar la resistencia a la corrosión del sistema modificado, mediante ensayos típicos de corrosión: curvas potenciodinámicas, espectroscopia de impedancia electroquímica en SBF y a diferentes tiempos de inmersión.

### 3 Introducción

Para diseñar un material cuya función es sustituir con éxito el tejido de un organismo vivo, se debe considerar la estructura jerárquica del mismo<sup>1</sup>. La matriz ósea posee componentes orgánicos e inorgánicos que contribuyen por partes casi iguales al peso seco.

El tejido óseo puede describirse como un material compuesto, formado por fibras de colágeno resistentes y flexibles, reforzadas con nano cristales de fosfatos. Las proteínas de colágeno de aproximadamente 200 nm de longitud y 2-3 mm de diámetro se auto ensamblan formando estructuras fibrosas de aproximadamente 500 nm de diámetro. En el agrupamiento, las fibras de colágeno dejan espacios que son ocupados por monocristales de 10-20 nm de longitud y 2-3 nm de diámetro de mineral hidroxiapatita. La hidroxiapatita (HAP) es un cerámico parcial o totalmente cristalino, formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . La misma es la encargada de otorgar dureza a la matriz del hueso<sup>2</sup>.

Cuando se presenta un daño en un hueso, es necesaria la utilización de prótesis ortopédicas para cumplir con la función de sostén de la estructura ósea durante la recuperación del mismo.

#### 3.1 Materiales para implantes

Los materiales para implantes pueden ser de diversos tipos: metálicos, cerámicos, poliméricos, compuestos. Su elección dependerá de la aplicación que se le quiera dar, del paciente, de la disponibilidad en el mercado, entre otros factores. Los materiales a utilizar deben cumplir con la condición de biocompatibilidad, que se define formalmente como la habilidad de un material de obtener una respuesta biológica apropiada para una aplicación determinada en el cuerpo<sup>3</sup>. De allí se desprende que no todos los materiales pueden ser biológicamente apropiados para todas las aplicaciones médicas. Todos los biomateriales utilizados como reemplazo de tejido duro o blando deben satisfacer los siguientes requerimientos<sup>4</sup>:

- Biocompatibilidad: baja toxicidad intrínseca, reactividad con macromoléculas o reacciones inflamatorias.
- Bio-funcionalidad: por ejemplo, cumplir con los requisitos mecánicos adecuados a la aplicación.



- Poseer resistencia a la corrosión o degradación adecuada para mantener las propiedades mecánicas.
- Bioadhesión: la unión química, electroestática, mecánica o una combinación de las anteriores entre la prótesis y el tejido circundante debe mantenerse luego de un apropiado proceso de curación.
- Prevención de adhesión bacteriana.

Los materiales para implantes intracorpóreos se pueden clasificar en “permanentes” o “temporarios” en función de cuánto tiempo permanecen en el cuerpo. En el caso de los implantes permanentes, se utilizan principalmente para el sistema musculo-esquelético, lentes intraoculares, miembros artificiales unidos permanentemente e implantes dentales.

La utilización de implantes biodegradables es una de las áreas en desarrollo más importantes de la medicina<sup>5</sup>. Un implante biodegradable puede disolverse y absorberse gradualmente luego de la implantación. Utilizar materiales que se degradan en el entorno fisiológico elimina la necesidad de una segunda cirugía para remover el implante, lo cual es un gran beneficio en términos de reducción de morbilidad asociada a una intervención quirúrgica y a su vez una disminución de gastos en salud.

En el caso particular de los implantes temporarios para aplicaciones ortopédicas, además de la biocompatibilidad, es necesario el cumplimiento de otras dos condiciones presentadas a continuación:

- i- Estabilidad adecuada durante el proceso de curación de la fractura. Se requiere que el material posea la resistencia mecánica suficiente para mantener la estructura de la pieza fracturada hasta que se lleve a cabo la formación del callo o la cura de la fractura
- ii- Degradación del implante y regeneración completa de la estructura ósea en el lapso de doce a quince meses. Es necesaria una moderada y homogénea degradación en equilibrio con el proceso de curación ósea.

### 3.1.1 Metales para aplicaciones biomédicas

Los metales son materiales inorgánicos que poseen enlaces metálicos no direccionales con electrones de alta movilidad. Además de su capacidad para conducir electricidad, los metales son resistentes a la tracción y a la compresión y pueden ser procesados en formas complejas con relativa

facilidad. Los implantes a base de metales se utilizan principalmente ya sea para la sustitución total de articulaciones como la cadera, la rodilla o el hombro, como para la fijación de fracturas en forma de clavos, tornillos o stents. Además, en el campo de la cirugía odontológica se utiliza el titanio como placas y tornillos para la fijación de coronas dentales<sup>6</sup>.

Los metales son los más adecuados para aquellas aplicaciones en donde el material es sometido a cargas, debido a que poseen una buena combinación de resistencia mecánica y a la fractura. Sin embargo, la mayoría de las aleaciones metálicas quirúrgicas convencionales son sensibles a la corrosión, generando productos que pueden ser considerados potencialmente peligrosos para el cuerpo humano.

En el desarrollo de este trabajo se analizará la utilización de una aleación de magnesio para ser utilizada como material para implantes temporarios para prótesis ortopédicas.

### 3.1.2 Corrosión implantes metálicos

La corrosión es un proceso electroquímico destructivo resultado de la reacción entre un metal o una aleación metálica y el ambiente. Durante este proceso se vuelve al metal a su estado termodinámicamente más estable.

Todo proceso de corrosión involucra la transferencia de carga eléctrica entre dos electrodos en contacto con soluciones conductoras. El proceso consta de una reacción de oxidación, en el ánodo, y una reacción de reducción, en el cátodo, involucrando transferencia de carga de electrones y dando lugar a la degradación del metal que se comporta como ánodo. Dicha degradación ocurre en la superficie del metal, liberando iones del metal en un estado de oxidación mayor, y liberando electrones al seno del metal, que migran a la superficie donde reaccionan con especies en el electrolito (por ejemplo, la reducción de  $H^+$  o de  $H_2O$ ). En las Eq. 1 y 2 se presentan como ejemplo la oxidación de un metal M en un medio ácido y la correspondiente reducción de protones. Un esquema de este proceso se presenta en la Figura 1.



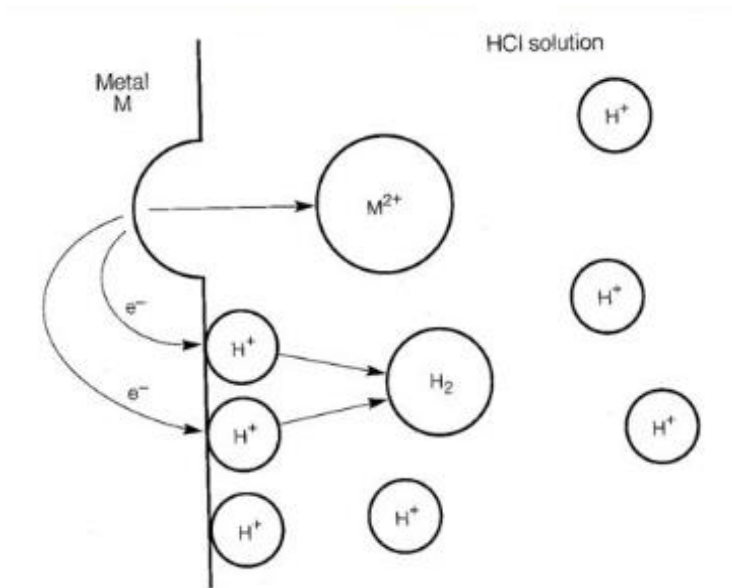


Figura 1. Diagrama de disolución del metal M en un medio ácido.

En un electrolito acuoso la superficie del metal alcanza un potencial  $E_{corr}$  o potencial mixto, que depende de la habilidad y la velocidad con la que los electrones pueden ser intercambiados por las reacciones catódicas y anódicas. A medida que el potencial aumenta de  $E_{corr}$  a un potencial mayor, la velocidad de corrosión generalmente aumenta ya que el mismo crece como fuerza impulsora de la corrosión. Muchos metales presentan una zona de pasivación luego de alcanzado un determinado potencial ( $E_p$ ) donde el óxido formado en la superficie del material actúa como una barrera a la reacción anódica. Dependiendo del potencial o del poder oxidante de la solución una aleación puede existir en el estado pasivo por encima de  $E_{pp}$  o en el estado activo debajo de la misma. En la Figura 2 se puede observar el comportamiento típico de un metal M que presenta pasivación en un determinado medio corrosivo<sup>7</sup>.

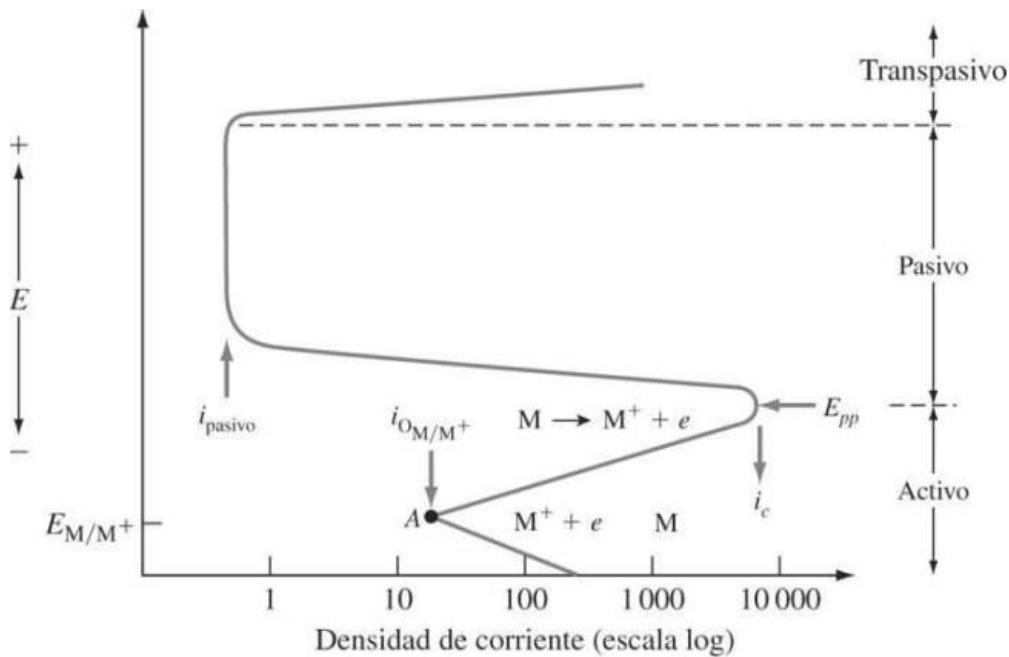


Figura 2. Curva de polarización típica de un metal M en un medio corrosivo.

### 3.1.3 Magnesio como biomaterial

El uso de aleaciones de magnesio como prótesis biodegradable inició al poco tiempo del descubrimiento del magnesio elemental por Sir Davy en 1808. A partir de ello, se realizaron cirugías para tratar diversos tipos de fracturas hasta mitad del siglo XIX, donde debido a efectos adversos generados por la falta de control en la liberación de hidrógeno durante la degradación de las prótesis, no hubo más reportes de su uso en implantes ortopédicos. A partir del 2010 con el desarrollo de la tecnología de aleaciones y modificación superficial resurgió el interés en la aplicación del Mg como implante biodegradable<sup>8</sup>.

Una de las principales ventajas del Mg es que la liberación del mismo durante la degradación no generaría efectos adversos en el paciente, por el contrario, un déficit de magnesio está asociado con la aparición de osteoporosis.

Por otra parte, su bajo peso y densidad le otorgan propiedades mecánicas muy similares a las del hueso humano como se presenta en la Tabla 1. El módulo elástico del magnesio es cercano al del hueso lo que representa una ventaja respecto a otros materiales metálicos utilizados como

implantes. Esto se debe a que evita el llamado *stress shielding*, es decir, la diferencia entre módulos elásticos de la prótesis y el hueso que hace que la carga sea absorbida por el material, impidiendo la remodelación del hueso<sup>9</sup>. Además, el magnesio se une fuertemente a los fosfatos, por lo que influye en la deposición de la hidroxiapatita incentivando la formación de tejido óseo<sup>10</sup>.

Propiedad	Magnesio	Hueso natural
Densidad(g/cm <sup>3</sup> )	1.74-2.0	1.8-2.1
Módulo Elástico, E (GPa)	41-45	3-20
Tensión de fluencia en compresión (MPa)	65-100	130-180
Tenacidad a la fractura (MPam <sup>1/2</sup> )	15-40	3-6

Tabla 1. Propiedades del Magnesio y del hueso natural.

En ambientes fisiológicos, el magnesio y sus aleaciones se degradan de acuerdo a las siguientes reacciones:

- Reacción anódica:  $Mg \rightarrow Mg^{2+} + 2e^{-}$  (Ec.3)
- Reacción catódica:  $2H_2O + 2e^{-} \rightarrow H_2 \uparrow + 2OH^{-}$  (Ec.4)
- Formación de producto de corrosión:  $Mg^{2+} + 2OH^{-} \rightarrow Mg(OH)_2$  (Ec.5)

Como puede observarse en la reacción catódica, uno de los productos de corrosión que se libera en el medio es hidrógeno gaseoso. Una producción elevada de dicho gas en un corto periodo de tiempo conlleva a inflamación y dolor en la zona de implantación, ya que el cuerpo humano no puede absorber o metabolizar el H<sub>2</sub> generado si su concentración es mayor que 0.01 mL cm<sup>-2</sup> por día<sup>11</sup>.

Se ha demostrado que, a una baja concentración, los productos de degradación del Mg no tienen efectos adversos sobre la viabilidad de los osteoblastos. Por otro lado, también se determinó, que cambios en el pH local pueden influenciar negativamente la viabilidad de las células, lo cual es una desventaja ya que existe un aumento del pH asociado a la disolución de Mg<sup>12</sup>. Sin embargo, se ha

proporcionado evidencia preliminar de que el Mg podría eliminar las condiciones fisiopatológicas asociadas con la lesión producida durante la intervención quirúrgica si la tasa de degradación del implante se controla adecuadamente. Es así que, controlando la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  y por lo tanto el pH local dentro del tejido y la acumulación de gas hidrógeno, ambos críticos para la bioactividad y biocompatibilidad del implante, se puede lograr el uso exitoso de Mg como material biodegradable.<sup>13</sup>

La velocidad de disolución de las aleaciones de magnesio puede ser potencialmente controlada por cambios en la metalurgia, la microestructura y los tratamientos de superficie. Una de las herramientas para mejorar la resistencia del magnesio es el uso de aleantes en la composición.

#### *3.1.3.1 Aleación de magnesio AZ91D*

En el desarrollo del presente trabajo se utilizará aleación de magnesio AZ91D. Las iniciales de esta aleación corresponden a sus dos principales aleantes: 9% en peso de Al y 1% en peso de Zn. Generalmente se agrega la letra mayúscula D al final del nombre para identificar la composición de la aleación como la registrada en ASTM, la cual presenta una microestructura compuesta mayoritariamente por fase alfa (matriz de Mg metálico) y puede presentar un porcentaje de fase beta (intermetálico  $Mg_{17}Al_{12}$ ). En estas aleaciones, el aluminio se agrega con el objetivo de mejorar la respuesta a la corrosión al actuar como elemento pasivante y de aumentar la colabilidad y resistencia mecánica de la aleación<sup>14</sup>. Puede encontrarse tanto en solución sólida en la matriz, como en forma de precipitado en la fase  $Mg_{17}Al_{12}$ . En ambas formas puede disminuir la velocidad de corrosión de la aleación, y esto dependerá de la proporción, tamaño y distribución de cada fase<sup>15, 16</sup>. El Zn, en cambio, se agrega para incrementar la tolerancia y reducir los efectos de las impurezas, en el caso de que el límite de tolerancia se haya superado. También se encuentra presente en solución sólida en  $\alpha$ , y de existir, en  $\beta$ <sup>17</sup>. Luego, la distribución de los elementos de aleación presentes y la microestructura resultante en la aleación, influyen la resistencia a la corrosión y morfología de la misma<sup>18</sup>.

La selección de elementos de aleación en aleaciones biodegradables de magnesio debe tener en cuenta su biocompatibilidad acompañado de una mejora en sus propiedades mecánicas. La adición de elementos de aleación puede mejorar la resistencia del magnesio en términos de endurecimiento por solución sólida y refinamiento de grano.

### 3.2 Anodizado

El anodizado es un proceso electrolítico que puede producir una película de óxido estable y protector con espesor ajustable de nanómetros a micrómetros en varios metales incluido el magnesio y sus aleaciones. En una celda electrolítica se genera corriente directa mediante una fuente de poder que proporciona corriente uniforme desde el ánodo metálico (electrodo de trabajo) hasta el cátodo (contraelectrodo), que inicia el crecimiento de una capa de óxido en la superficie del metal<sup>19, 20</sup>. Este proceso puede ser a corriente constante o a potencial constante, en este trabajo se utilizó este último.

El proceso de anodizado se realiza tanto para controlar la velocidad de corrosión del material como para modificar las propiedades superficiales del mismo, modificándose su rugosidad, topografía, composición superficial y mojabilidad de la superficie.

El comportamiento durante el anodizado del magnesio y sus aleaciones y las características del film resultante son fuertemente influenciados por los parámetros de proceso: magnitud del voltaje y corriente aplicados, la duración, el electrolito, temperatura, etc<sup>21</sup>.

Cuanto menor cantidad de defectos presentes en el recubrimiento, mejor será la resistencia a la corrosión. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que siempre existen defectos en el óxido ya sea por separación de fases metalúrgicas, por pre-tratamientos mecánicos, por la geometría de la pieza o por la estructura porosa inherente del proceso de anodizado. En la Figura 3 se presenta un esquema de la microestructura de un recubrimiento realizado mediante anodizado y su versión simplificada.

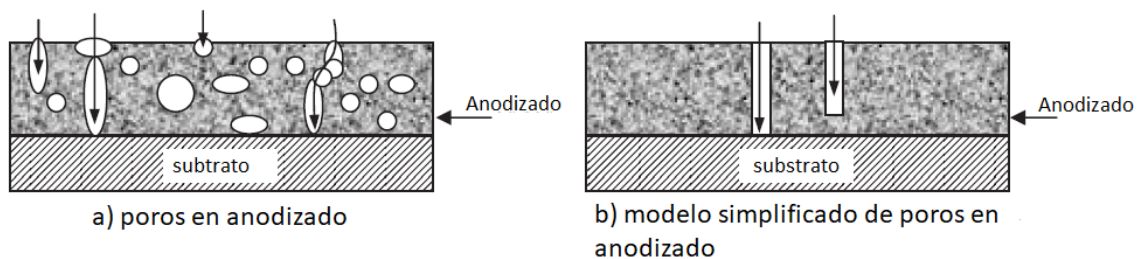


Figura 3. Esquema de la microestructura de un recubrimiento realizado mediante anodizado (a) y su versión simplificada (b) (Blawert, Dietzel, Ghali, Song "Anodizing treatments for magnesium alloys and their effect on corrosion resistance in various environments" *Advanced engineering materials*, 2006).

Estos defectos presentes en la microestructura del anodizado, pueden dar lugar a corrosión localizada en la superficie del sustrato<sup>22</sup>.

### 3.3 Técnicas de caracterización

A continuación, se presentan aquellas técnicas principales utilizadas para la caracterización de las muestras estudiadas en el presente trabajo.

#### 3.3.1 Perfilometría y rugosidad

Todas las superficies reales, por más perfectas que sean, presentan particularidades que son marca del método empleado para su obtención, por ejemplo: torneado, fresado, rectificado, etc. Las superficies se presentan como un conjunto de irregularidades con espaciamiento regular o irregular que tienden a formar un patrón o textura que forman la topografía de un material. Dicha característica es un factor muy importante con influencia sobre la morfología, auto-orientación y proliferación de las células en torno al biomaterial. Las superficies rugosas, texturadas o porosas pueden estimular la adhesión celular y la formación de matriz extracelular, así como también disponen de mayor superficie para la adhesión de proteínas<sup>23</sup>. Es por ello de vital importancia tener conocimiento de la perfilometría y rugosidad de la superficie en estudio.

El equipo más utilizado para medir topografía superficial es el rugosímetro, cuyo principio de funcionamiento está esquematizado en la siguiente figura.



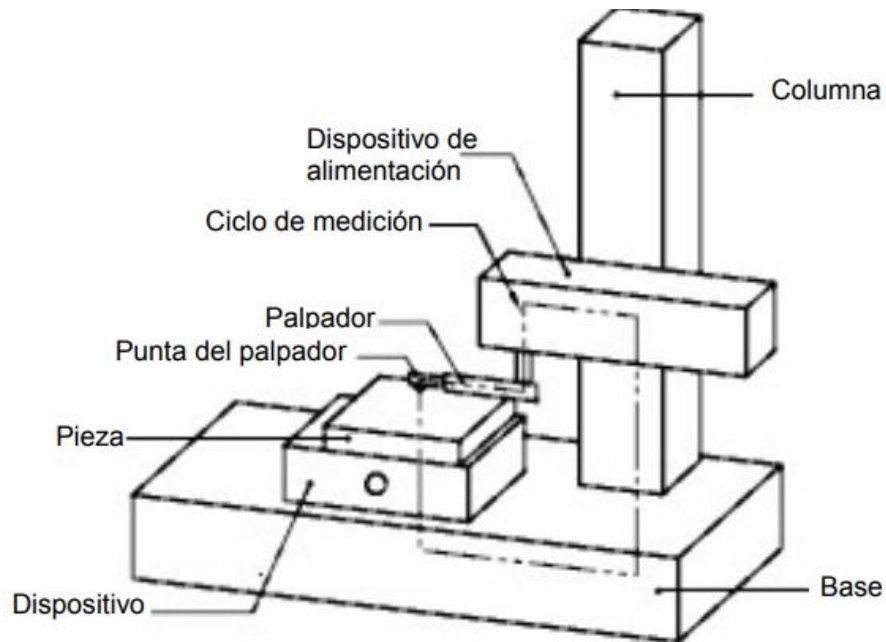


Figura 4. Principio funcionamiento rugosímetro.

Sobre una base se coloca un dispositivo de nivelación/sujeción/alineación sobre el que se coloca la pieza a medir, un palpador con una punta cónica con un radio esférico muy pequeño recorre una corta distancia sobre la que se desea medir la rugosidad, el palpador es movido por el dispositivo de alimentación que está montado sobre una columna. Mediante un transductor estos movimientos verticales son convertidos en una señal eléctrica que se amplifica y se ven plasmados en un gráfico.

Dos parámetros muy utilizados para la medición de la rugosidad son  $R_a$  y  $R_z$ .

El parámetro  $R_a$  también conocido como rugosidad media aritmética, está definido como la media aritmética de los valores absolutos de las coordenadas de los puntos del perfil de rugosidad en relación a la línea media dentro de la longitud de medición  $L_m$  como se muestra en la Figura 5:

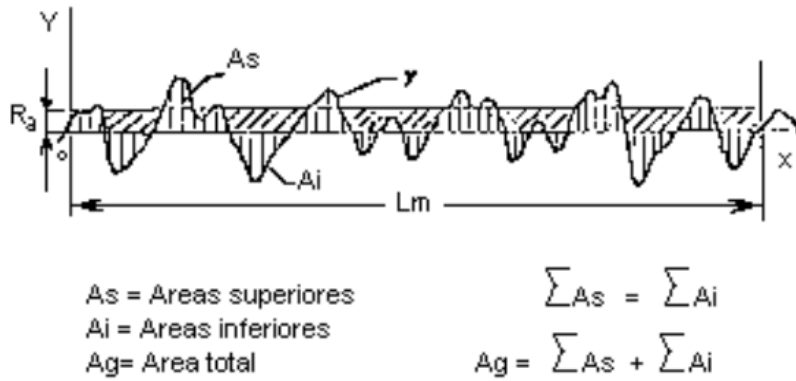


Figura 5. Obtención del parámetro Ra.

El parámetro Ra es muy utilizado cuando es necesario el control de la rugosidad dada la facilidad de obtención del resultado, sin embargo, no define la forma de la irregularidad de un perfil, de esa forma se pueden obtener un valor de Ra prácticamente igual para superficies con procesos de acabado diferentes. Es por ello que utilizan también otros parámetros como son la rugosidad parcial y la rugosidad media.

La rugosidad parcial ( $Z_i$ ) es igual a la suma de las ordenadas (en valor absoluto) de los puntos más alejados de la línea media dentro de cada módulo como se muestra en la figura. En la representación gráfica del perfil, esquematizada en la Figura 6, este valor corresponde a la distancia entre los puntos máximo y mínimo del perfil dentro del recorrido correspondiente a cada módulo de medición  $l_e$ .

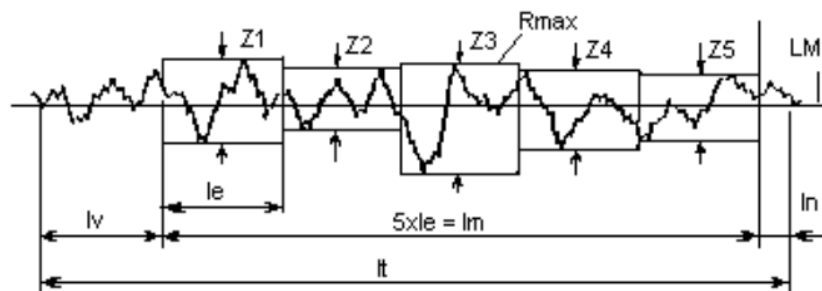


Figura 6. Obtención del parámetro Z.

La rugosidad media ( $R_z$ ) es la media aritmética de los valores de rugosidad parcial  $Z_i$  correspondientes a cada uno de los cinco módulos integrantes de la longitud de medición.

El gran interés que se tiene en el conocimiento de la rugosidad superficial radica en el hecho de que esta influye en la interacción que el implante posee con el tejido óseo, pero fundamentalmente, porque afecta la capacidad que tiene la apatita para formarse sobre el material en estudio. Además, la topografía de la superficie de un implante es un factor muy importante con influencia directa sobre la morfología, auto-orientación y proliferación de las células en torno al biomaterial<sup>24</sup>.

### 3.3.2 Procesamiento digital de imágenes

Se utilizaron técnicas de procesamiento digital de imágenes con el soporte del Laboratorio de Procesamiento Digital de imágenes del ICYTE-CONICET-UNMDP, para cuantificar el volumen de burbujas que se desprenden de una superficie durante un lapso de tiempo.

Para la obtención de los parámetros sobre la secuencia de imágenes binarias que contienen las siluetas, se lleva a cabo un seguimiento de objetos a través del tiempo. Los objetos a seguir se modelan como puntos a través del cálculo de su centroide; no se considera su apariencia respecto a descriptores de brillo y textura local, sino que se monitorean sus características cinemáticas como su posición y velocidad. Tras la ocurrencia del primer desplazamiento significativo del centroide de cada burbuja respecto de su posición inicial, se considera que la burbuja se desprendió del metal y se mide en el instante previo las características geométricas de la burbuja, principalmente su radio. Los datos obtenidos para todas las burbujas se almacenan en registros y al terminar el video se calculan los valores promedio para las medidas de interés: radio, área de la silueta, volumen de las burbujas y cantidad de burbujas por unidad de tiempo.

### 3.3.3 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que se basa en el principio de que ocurre un cambio en la longitud de onda de la luz cuando el haz de luz es desviado por moléculas. Se trata de una técnica de caracterización superficial no destructiva donde se obtiene información acerca de los compuestos presentes.

El espectro Raman se obtiene irradiando una muestra con una potente fuente laser de radiación monocromática visible, ultravioleta o infrarroja y con un espectrómetro adecuado que registra la radiación dispersada. Para que una radiación sea activa en el efecto Raman debe cambiar la polarizabilidad de la molécula. Es decir, la nube electrónica de la molécula debe deformarse más fácilmente en un extremo que en el otro durante la vibración o la rotación. Los cambios de frecuencia en la luz dispersada son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. Los modos de vibración de las moléculas orgánicas e inorgánicas ocurren en un rango de  $4000 - 100 \text{ cm}^{-1}$ <sup>25</sup>.

Esta técnica permite la caracterización de los compuestos presentes en las muestras, permitiendo la identificación de indicadores de bioactividad (ej. hidroxiapatita).

### 3.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) consiste en la aceleración de un haz de electrones procedentes de un filamento, el cual es localizado mediante lentes electromagnéticas hacia una muestra. De la interacción que se produce entre los electrones con el objeto de estudio, se desprenden una serie de señales que son recogidas y amplificadas, permitiendo obtener información morfológica de la muestra<sup>26</sup>.

Es una técnica que aporta imágenes de gran resolución y por lo tanto permite la observación de los detalles de la superficie de la muestra.

### 3.3.5 Ensayos electroquímicos

#### 3.3.5.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica

La técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), es un método electroquímico utilizado en estudios de corrosión. Se trata de un ensayo no destructivo si se lleva a cabo en el entorno del potencial de corrosión. El principio de su funcionamiento se basa en la respuesta del potencial a pequeños cambios de amplitud de potencial a una amplitud de frecuencia muy variable.

La respuesta de la corriente dependiente del tiempo  $I(t)$  de la superficie de un electrodo frente a un potencial variable  $V(t)$  puede expresarse como una impedancia dependiente de la frecuencia angular  $Z(\omega)$ .

$$Z(\omega) = V(t) / I(t)$$

Donde,

$$V(t) = V_0 \sin(\omega t)$$

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \theta)$$

$\theta$  = ángulo de fase entre  $V(t)$  y  $I(t)$ .

La impedancia  $Z(\omega)$  puede expresarse en términos de real  $Z'(\omega)$  e imaginaria  $Z''(\omega)$ , cuyo comportamiento se ve en los gráficos obtenidos mediante esta técnica:

Gráfico de Bode: representan módulo de la impedancia ( $|Z|$ ) vs logaritmo de la frecuencia ( $\log f$ ) y el ángulo de fase ( $\theta$ ) vs  $\log f$ .

Gráfico de Nyquist: es en el plano complejo y corresponde a graficar la opuesta de la componente imaginaria de la impedancia total ( $-Z''$ ) vs la componente real de la impedancia total ( $Z'$ ).

En la Figura 7 se presentan representaciones esquemáticas de dichos gráficos.

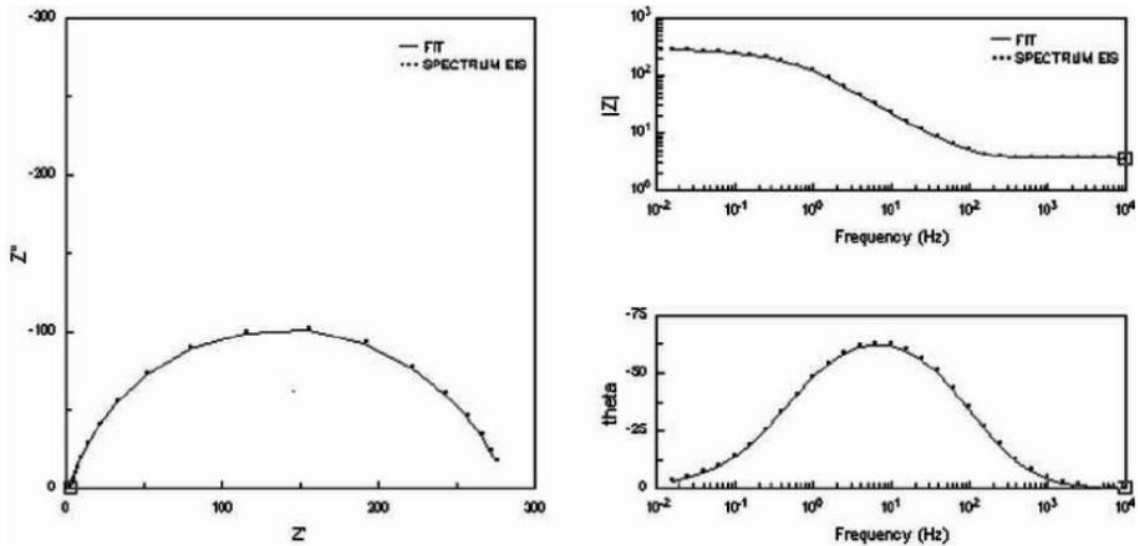


Figura 7. Representaciones de gráficos de Nyquist (izquierda) y de Bode (derecha).

En el caso de los estudios de corrosión que utilizan EIS, los espectros de impedancia obtenidos suelen ser analizados mediante circuitos eléctricos equivalentes compuestos por componentes tales como resistencias (R), capacitancias (C), inductancias (L), etc, que deben correlacionarse con el sistema físico bajo estudio. Estos circuitos son denominados “circuitos eléctricos equivalentes” y de ellos se obtienen valores de diferentes parámetros eléctricos. Dichos valores son utilizados para obtener información de mecanismos de corrosión y caracterizar las películas formadas sobre los materiales.

En el gráfico de Nyquist se presenta un semicírculo con frecuencia creciente en el sentido contrario a las agujas del reloj. A frecuencias muy elevadas la componente imaginaria desaparece y deja solo la resistencia a la solución. Así también, a frecuencias muy bajas, la resistencia que queda es la resistencia a la polarización. Al mismo tiempo, el gráfico de Bode presenta resultados análogos<sup>27</sup>.

La interpretación de los datos experimentales de los espectros de impedancia con un modelo eléctrico que describe la interface metal/recubrimiento, permite un mejor entendimiento del deterioro que sufren los sistemas bajo análisis. Los elementos presentes en los circuitos eléctricos equivalentes propuestos para modelar las impedancias deben estar en concordancia con los eventos físicos que pudieran tener lugar. De todas las combinaciones de elementos posibles, se selecciona la más simple que permita explicar el paso de corriente existente desde el electrolito hacia el metal base. Con este objetivo, se utilizan elementos de fase constante (CPE por sus siglas en inglés) en lugar de capacitancias en los casos en los que los valores de ángulo de fase ( $\theta$ ) adopta valores diferentes a  $-90^\circ$ . La impedancia para el elemento CPE, llamada  $Z_{CPE}$ , puede escribirse como<sup>28</sup>:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(i\omega)^\alpha} \quad (\text{Ec.6})$$

Donde Q (pseudocapacitancia) y  $\alpha$  son los parámetros del CPE, independientes de la frecuencia, i es la densidad de corriente y  $\omega$  la frecuencia.

El CPE es, en general, atribuido a la reactividad y/o inhomogeneidad superficial, rugosidad o geometría del tipo fractal, porosidad del electrodo y a distribuciones de corriente y potencial asociadas con la geometría del electrodo<sup>29</sup>. Como Q no puede representar la capacitancia cuando

$\alpha < 1$ , puede relacionarse con la capacidad efectiva ( $C_{eff}$ ) del recubrimiento analizado, aplicando una distribución superficial de elementos que conllevan a la siguiente ecuación<sup>30</sup>:

$$C_{eff} = Q^{\frac{1}{\alpha}} \left( \frac{R_{sol} \cdot R_{rec}}{R_{sol} + R_{rec}} \right)^{\frac{1-\alpha}{\alpha}} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde  $R_{SOL}$  es la resistencia de la solución del medio empleado como electrolito y  $R_{rec}$  es la resistencia del recubrimiento.

### 3.3.5.1.1 Test Kramers-Kronig linear

El análisis de Kramers-Kronig genera un gráfico del residuo entre la parte real y la parte imaginaria de la impedancia obtenida experimentalmente. Las relaciones de Kramers-Kronig estudian la validez de las medidas de impedancia (EIS).

La teoría de transformación de K-K afirma que los datos reales e imaginarios de impedancia deben contener la misma información. Los valores imaginarios, pueden obtenerse de los reales, y los valores reales pueden obtenerse de los imaginarios mediante la transformación de Kramers-Kronig como se muestra en el siguiente esquema<sup>31</sup>:

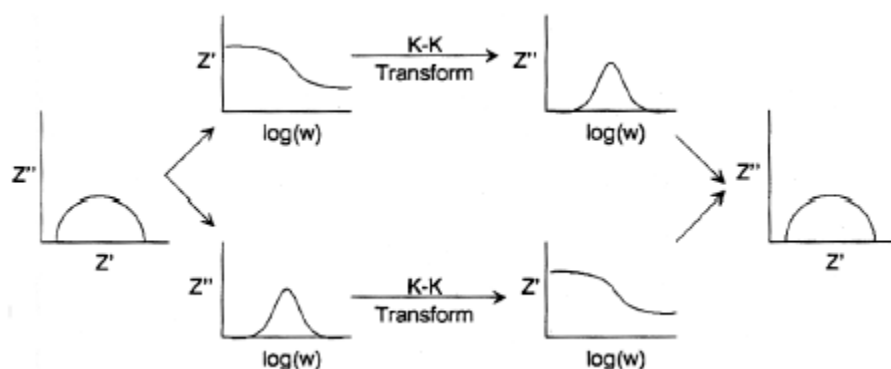


Figura 8. Esquema de transformación Kramers-Kronig.

El espectro transformado final, debe ser idéntico al original. Si los espectros no son iguales, esto sugiere un problema con los datos originales.

### 3.3.5.2 Curvas de polarización

Un material conductor en un electrolito adquiere un potencial de corrosión o potencial mixto una vez que se estabiliza, y en su superficie coexisten las reacciones anódicas y catódicas. Sin embargo, las corrientes asociadas a estas reacciones son exactamente iguales en magnitud pero de sentido inverso, por lo que no hay una corriente neta que medir ya que la velocidad de oxidación es igual a la velocidad de reducción. Para poder realizar una curva de polarización se aplica un sobrepotencial positivo o negativo respecto al potencial de corrosión, y una de las reacciones se ve favorecida frente a la otra. En las curvas obtenidas mediante polarización potenciodinámica se registra la respuesta de la corriente en función del potencial aplicado. El ensayo comienza barriendo el potencial lentamente a potenciales menores al  $E_{corr}$ . Y luego, a potenciales mayores a la  $E_{corr}$  se obtiene una polarización anódica, es decir que se corroe el sustrato. Por último, al alcanzar un determinado valor límite de potencial, el barrido se invierte. Los resultados obtenidos se grafican como potencial ( $E$ , V) vs la densidad de corriente (en escala logarítmica, en  $A/cm^2$ ) como puede observarse en la Figura 2.

Las curvas de polarización obtenidas mediante este ensayo aportan información acerca del proceso de corrosión en una condición simulada que puede correlacionarse con el comportamiento electroquímico que tendrá el material *in vivo*. La técnica es una técnica destructiva.



## 4 Experimental

### 4.1 Materiales y soluciones

#### 4.1.1 Sustrato

Se utilizó una aleación de magnesio AZ91D en forma de chapas de 0,8 cm por 2,5 cm de área rectangular. El proveedor de la aleación fue Shaanxi, China. En la Tabla 2, se presenta la composición química de la aleación.

Elemento	Mg	Al	Zn	Mn	Ni	Fe
Valores en % p/p	89.663	9	1	0.33	0.002	0.005

Tabla 2. Composición química aleación magnesio AZ91D.

En la Figura 9 se muestra la geometría utilizada.



Figura 9. Geometría de Magnesio AZ91 utilizada.

Para tener una superficie repetitiva y homogénea se procedió a lijar las muestras con papeles abrasivos, aumentando la graduación del medio agresivo desde una lija de SiC de granulometría 400 al agua, luego una de 600, 1000 y 1200 siempre teniendo en cuenta el cambio de orientación a 90 grados en cada cambio de lija. Este tratamiento se realizó para retirar el óxido formado previo a la recepción del material y obtener sustratos con una rugosidad uniforme. Luego se procedió a limpiar la muestra con agua y se colocó en el contacto de la celda de anodizado para iniciar el proceso.

#### 4.1.1.1 Anodizado

Durante el proceso de anodizado se utilizó una celda de polietileno (Figura 10) de dos electrodos: un contra-electrodo de platino y la aleación de magnesio como electrodo de trabajo, conectado a una fuente CONSORT modelo ev 231.

Para este estudio se utilizó como electrolito una solución de KOH 5mol/L a un potencial constante de 5 V durante 40 minutos. Para llegar a definir estos parámetros, se analizaron diferentes electrolitos (NaOH y KOH) así como también diferentes tiempos de anodizado y potenciales (3 y 5 V).



Figura 10. Celda utilizada para la realización del anodizado.

Finalmente, una vez efectuado el anodizado, el sustrato fue retirado con una pinza y lavado con etanol para ser posteriormente secado con flujo de aire caliente.

#### 4.1.2 Solución fisiológica simulada (SBF)

La Solución Fisiológica Simulada (Simulated Body Fluid, en inglés, SBF) consiste en una solución con una concentración de iones inorgánicos similar a la del plasma humano como puede apreciarse en la Tabla 3. Para realizar los ensayos de inmersión en este trabajo se utilizó la versión revisada de la SBF<sup>32</sup>.

Medio / Conc. Iones	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plasma humano	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Tabla 3. Concentración de iones en plasma humano y en SBF.

Para preparar 1L de SBF se utilizó agua de ionizada como solvente y se agregaron los reactivos (presentados en la Tabla 4) en un matraz aforado, agitándolo de manera que no se formen precipitados.

NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NaCO <sub>3</sub>	TRIS *
8.053 g	0.224 g	0.278 g	0.305 g	0.174 g	0.353 g	6.057 g

\*TRIS: Hidroximetilaminometano (CH<sub>3</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>

Tabla 4. Reactivos utilizados en preparación de SBF.

Por último, se utilizó HCl concentrado para ajustar el pH entre 7.25 y 7.35. La SBF debió ser preservada en una botella de vidrio dentro de la heladera.

## 4.2 Caracterización de las muestras

En esta sección se detallarán los parámetros utilizados para la caracterización electroquímica, de superficie de bioactividad y morfológica de las muestras desnudas y anodizadas.

### 4.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron imágenes de las muestras con y sin anodizado mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con un microscopio JEOL JSM-6460LV (Japón) para observar la superficie de las muestras y cambio con el anodizado

#### 4.2.2 Perfilometría y rugosidad

La textura superficial fue registrada mediante un rugosímetro de marca Taylor Hobson de 25 mm de longitud de exploración. Con la utilización de este equipo se pudo apreciar rápidamente el efecto que generó el anodizado en la superficie del sustrato.

#### 4.2.3 Procesamiento digital de imágenes

Para la obtención de imágenes durante la inmersión del sustrato en SBF se utilizó un sistema como el que muestra en la Figura 11.

En primer lugar, se procede a la filmación de la superficie del material al momento de su inmersión en solución fisiológica simulada utilizando una cámara de alta precisión.

Posteriormente, se utiliza un software apropiado donde cada imagen es procesada mediante técnicas de morfología matemática en niveles de gris para resaltar las burbujas. Luego, se aplica una umbralización para obtener las siluetas de las burbujas y se refina la detección aplicando operaciones de morfología matemática binaria.



Figura 11. Disposición de elementos en la toma de imágenes para procesamiento digital.

La disposición de los elementos utilizada permitió obtener el aumento deseado para el correcto procesamiento digital posterior de las imágenes.

En la Figura 12, se presenta una captura del software utilizado para la determinación cuantitativa del volumen de burbujas de hidrógeno liberados para un área determinada.

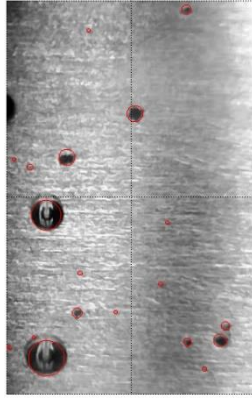


Figura 12. Captura del software utilizado.

A partir de la delimitación de áreas en función de variables como forma, contraste claro-oscuro se obtuvieron las siguientes variables a cada tiempo:

- Volumen de burbujas presente: hace referencia al volumen de burbujas presente en el área en estudio en el instante que se toma la medición.
- Tasa de liberación: este parámetro corresponde al volumen de burbujas que deja de estar en el área en estudio con respecto al tiempo anterior.
- Volumen liberado: corresponde a la tasa de liberación total de burbujas hasta el tiempo determinado.

#### 4.2.4 Curvas potenciodinámicas

Complementariamente al análisis digital de imágenes, se realizaron ensayos para la obtención de curvas potenciodinámicas en muestras desnudas y anodizadas (tres en total), **sin tiempo previo de inmersión en SBF**, con el objetivo de analizar el comportamiento electroquímico del sustrato en el primer instante en contacto con la solución. Luego de una estabilización del potencial de corrosión de 60 segundos para cada muestra, se obtuvieron las curvas de potenciodinámicas con una velocidad de barrido de 2 mV/s comenzando a un potencial 0.5 V por debajo del Potencial de corrosión hasta un potencial final de -2V.

### 4.3 Estudios *in vitro*

Para determinar las propiedades de corrosión de los sistemas se realizaron ensayos electroquímicos de inmersión en SBF luego de diferentes tiempos de inmersión.

Debe tenerse en cuenta que los ensayos *in vitro* debieron realizarse luego de como mínimo un día de inmersión en SBF dado que en trabajos previos de grupo<sup>33</sup> se midió la estabilidad de la aleación AZ91 en soluciones fisiológicas simuladas y se llegó a la conclusión que luego de veinticuatro horas de inmersión el potencial de equilibrio era estable.

#### 4.3.1 Ensayo de bioactividad *in vitro*

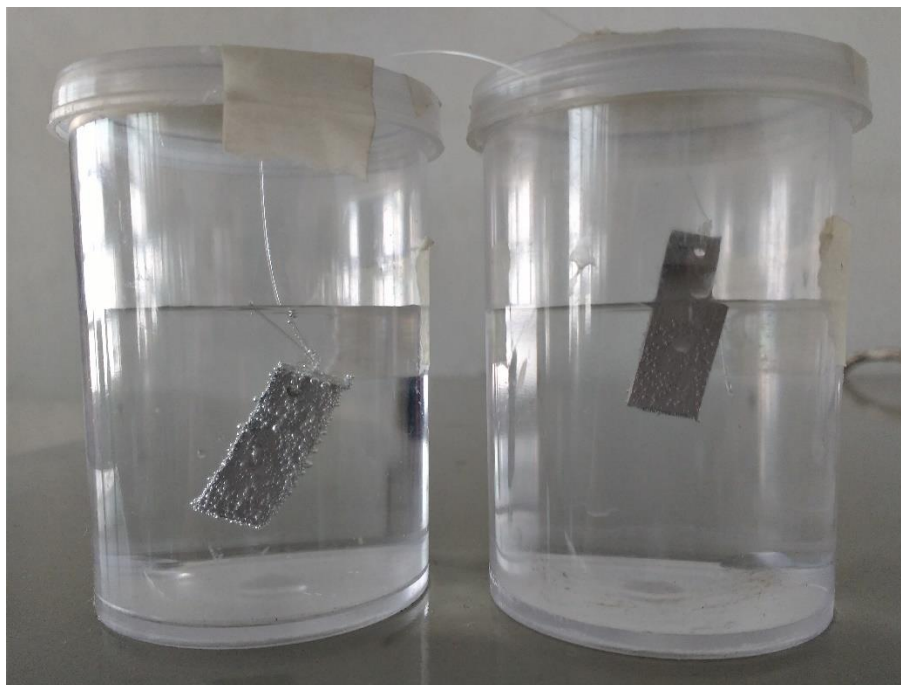
Para analizar la bioactividad *in vitro* se procedió a poner en inmersión en SBF muestras desnudas y anodizadas por uno, siete y treinta días dentro de la estufa a 37°C (para simular las condiciones del cuerpo humano). Este ensayo se realizó por cuadruplicado para cada condición. Estas muestras fueron utilizadas para ensayos electroquímicos y para análisis de los productos de degradación y depósitos por Microscopia Raman, y se compararon con los resultados obtenidos para el material sin inmersión cuando correspondía.

Para la realización de este ensayo se siguió el protocolo establecido por Kokubo<sup>23</sup> donde se especifica el volumen necesario de SBF en ml para el área de las muestras en mm<sup>2</sup> según la siguiente ecuación:

$$V_s = S_a / 10$$

Donde  $V_s$  es el volumen de SBF en ml y  $S_a$  es el área aparente de la muestra (mm<sup>2</sup>). En este caso se utilizó un volumen de 80mL (conservativo).

En el caso de las muestras desnudas se sumergió la totalidad de la muestra en la SBF como se muestra en la Figura 13. Para las muestras anodizadas se mantuvo en inmersión la parte anodizada de la muestra.



**Figura 13. Muestra desnuda (izquierda) y anodizada (derecha) en inmersión en SBF.**

#### 4.3.2 Microscopía – Espectroscopía Raman

Mediante esta técnica pudieron identificarse las diferentes fases presentes en el sustrato desnudo y luego del anodizado. Además, se analizó la presencia de productos de degradación luego de la inmersión en medio fisiológico y la aparición de depósitos de hidroxiapatita.

Para dicho análisis se utilizó un equipo Reflex confocal (Renishaw RM 2000, UK). El láser con el que se contó fue de 785 nm, potencias de 1, 5 y 10 % y un aumento de 50x. El barrido se realizó desde  $100\text{ cm}^{-1}$  hasta  $1400\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Ensayos electroquímicos

Para la realización de los ensayos electroquímicos se utilizó la unidad electroquímica Gamry Reference 600 Potenciostat/Galvanostat/ZRA (Gamry Instruments, USA) y una celda de polietileno con un electrodo de referencia calomel saturado (ECS) en KCl., un contraelectrodo de platino y como electrodo de trabajo el material a analizar.



Previamente al inicio del ensayo se procedió a desoxigenar la SBF mediante el burbujeo durante 10 minutos con nitrógeno gaseoso, con el objetivo lograr una concentración de oxígeno semejante a la del plasma humano.

Al igual que los ensayos de inmersión, todos los ensayos electroquímicos se realizaron con inmersión de las muestras en SBF y por cuadruplicado, con el objetivo de verificar reproducibilidad de las condiciones a cada tiempo de inmersión.

En la Figura 14 se puede observar la disposición de la celda de trabajo utilizada.

Se registraron potenciales de circuito abierto durante 1200 segundos para registrar la estabilidad en el mismo. A continuación, se realizaron ensayos de espectroscopía de impedancia electroquímica y finalmente se realizó una polarización potenciodinámica, luego de 600 segundos de registro del potencial entre ensayos.



Figura 14. Celda utilizada para ensayos electroquímicos.

#### *4.3.3.1 Espectroscopía de impedancia electroquímica*

En este trabajo el barrido de frecuencias utilizado fue de una frecuencia inicial de 2000 Hz a una frecuencia final de 0.025 Hz, modulando el potencial a  $\pm 10$  mV rms en torno al potencial de corrosión. Se tomaron 10 puntos por década.

#### *4.3.3.2 Polarización potenciodinámica*

Se realizó la curva de polarización barriendo el potencial a una velocidad de barrido de 1mV/s, comenzando a 0.15 mV por debajo del potencial de corrosión (curva catódica) y alcanzando un potencial 0.5 mV mayor que el potencial de corrosión (curva anódica) para luego regresar al potencial de corrosión y dar por finalizado el ensayo.

## 5 Análisis de resultados y discusión

### 5.1 Caracterización superficial

#### 5.1.1 SEM

Para la caracterización de la superficie se tomaron imágenes de la misma desnuda y anodizada (Figura 15) a distintos aumentos con un microscopio electrónico de barrido. En todos los casos se utilizaron muestras sin inmersión en SBF.

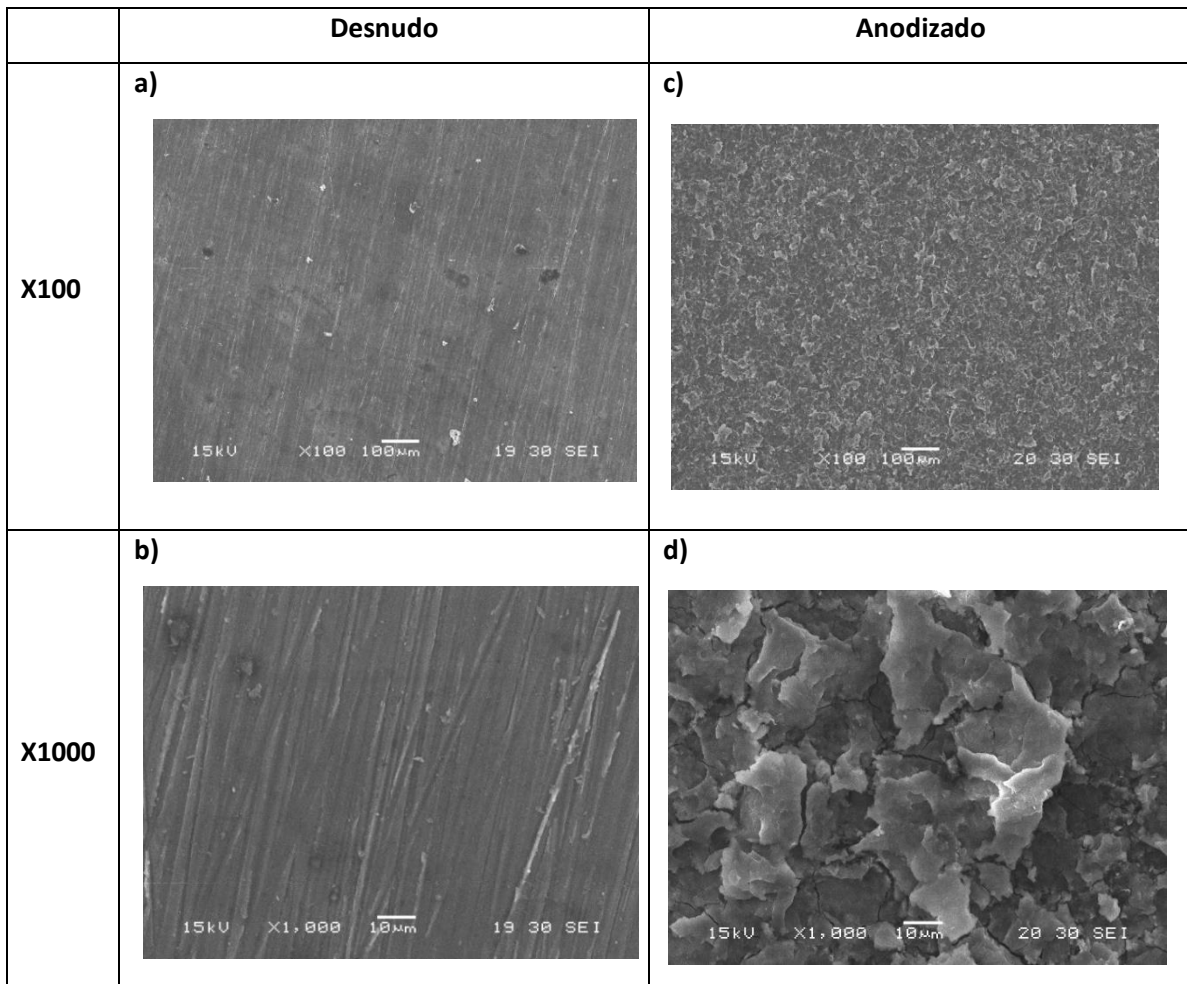


Figura 15. Imágenes SEM para: a) muestra AZ91 desnuda con zoom x100 b) muestra AZ91 desnuda con zoom x1000 c) muestra anodizada con zoom x100 d) muestra anodizada con zoom x1000.

En las fotografías correspondientes a las muestras desnudas **(a) y b))** pueden observarse las líneas de pulido y el sentido de las mismas. Luego del tratamiento de anodizado la superficie de la aleación de magnesio AZ91 (figuras **c) y d))** se encuentra cubierta de capas de óxido en forma de micro láminas. Puede observarse una superficie completamente cubierta y con una morfología bastante regular. Puede observarse también como se presentan grietas y fisuras en la película formada.

### 5.1.2 Rugosidad

En las Figuras 16 y 17 se pueden observar los perfiles de rugosidad para las muestras desnuda y anodizada, sin inmersión en SBF. En todos los casos, se sustrajo una línea de base para compensar el efecto de la inclinación o alabeo del sustrato.

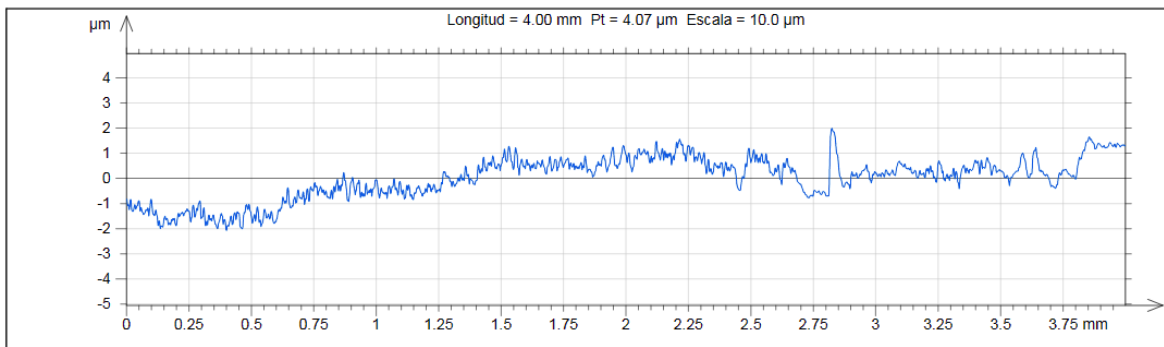


Figura 16. Perfil de rugosidad del AZ91 desnudo sin inmersión en SBF.

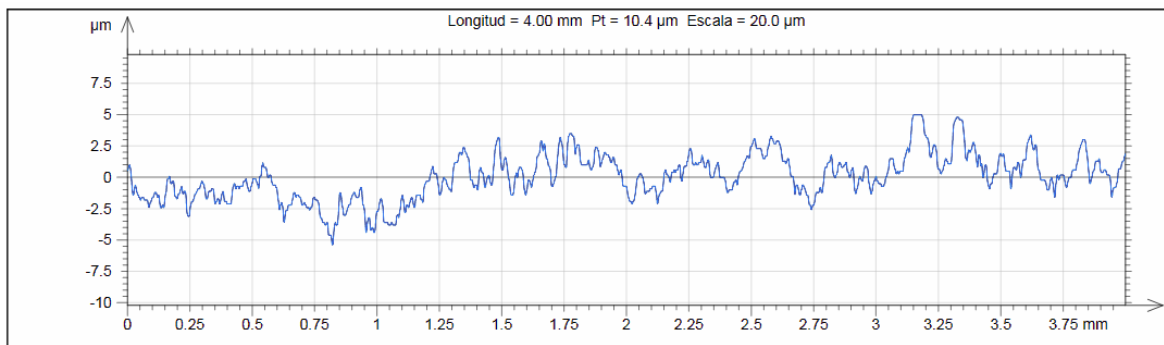


Figura 17. Perfil de rugosidad del AZ91 anodizado sin inmersión en SBF.

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de rugosidad obtenidos para la muestra desnuda y la anodizada.

	Ra ( $\mu\text{m}$ )	Rz ( $\mu\text{m}$ )
Mg desnudo	0.17 +- 0.05	1.23
Mg anodizado	0.88 +- 0.01	4.75 +- 0.02

Tabla 5. Parámetros de rugosidad.

Teniendo en cuenta el rango de valores de Ra esperados según bibliografía se llega a los siguientes resultados<sup>34</sup>:

- Los valores de Ra de la aleación de magnesio desnuda (0.172  $\mu\text{m}$ ) corresponden con el intervalo de valores esperados para un pulido liso (0.1-0.4)  $\mu\text{m}$ .
- Los valores de Ra esperados según bibliografía para la muestra anodizada, son de aproximadamente 0.8  $\mu\text{m}$ , que se asimila al valor obtenido en este trabajo para el Mg anodizado (0.88  $\mu\text{m}$ ). Los valores de Ra hallados para las muestras anodizadas demuestran que hay un aumento significativo de la rugosidad media luego del tratamiento.

Por su parte, los valores obtenidos de Rz (que se define como la diferencia entre los 5 puntos más altos y los 5 puntos de mayor profundidad), son mayores para las muestras anodizadas que para las desnudas, esto puede corresponderse con el hecho de que la morfología del óxido es en forma de láminas superpuestas, por lo que se produce una mayor distancia entre las alturas mayores y los puntos de mayor profundidad que en el caso del magnesio desnudo, donde este parámetro es propio del pulido realizado a las muestras.

### 5.1.3 Procesamiento digital de imágenes

Para realizar una medida indirecta de la degradación de las muestras ensayadas, se midió la cantidad de hidrógeno gaseoso desprendido por la reacción catódica producto de la reducción del agua. Existen diferentes métodos planteados en bibliografía para analizar la liberación de H<sub>2</sub>, los cuales están relacionados con la captura del gas y la medida de su volumen o la presión que se genera al recolectarlo<sup>35, 36 37</sup>.

El método que proponemos en este proyecto está basado en el análisis de imágenes (videos) donde se sucede la generación y liberación de burbujas de gas en la superficie del material a analizar (tanto

AZ91 desnudo como anodizado). Dicho análisis se realiza mediante programas realizados ad hoc por el Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes, del ICYTE.

Para un primer análisis de los resultados obtenidos mediante el uso del programa, se seleccionaron los primeros 20 segundos de inmersión de una muestra desnuda y una anodizada. Dicha selección se debe a que los primeros segundos de inmersión son los más críticos en cuanto al volumen de hidrógeno liberado. Dado que las áreas utilizadas por el software para la cuantificación de volumen de hidrógeno liberado fueron diferentes para cada caso, se procedió a dividir el mismo por el área seleccionada, dando como resultado el volumen de hidrógeno liberado por unidad de área en centímetros cuadrados, permitiendo así, la comparación entre las distintas muestras analizadas. En la Tabla 6 se presentan los resultados promedio y finales para una muestra desnuda y una anodizada a los mismos tiempos de inmersión en SBF.

	<b>Tasa de liberación promedio</b> $\left(\frac{ml}{cm^2 * s}\right)$	<b>Volumen liberado</b> $\left(\frac{ml}{cm^2}\right)$
<b>Muestra desnuda</b>	1.04E-03	2.09E-02
<b>Muestra anodizada</b>	6.70E-05	1.35E-03

**Tabla 6. Valores de liberación de H<sub>2</sub> obtenidos para muestra desnuda y anodizada.**

Se puede observar que tanto la tasa de liberación promedio como el volumen total liberado de hidrógeno gaseoso es aproximadamente 15 veces mayor en el caso de la muestra desnuda que en la muestra anodizada. Esta primera aproximación a los resultados, es un fiel reflejo de lo que sucede a lo largo del tiempo de muestra utilizado para estas áreas seleccionadas. En la Figura 18, pueden observarse los valores de volumen de hidrógeno liberado acumulado en el tiempo para las muestras desnuda y anodizada.

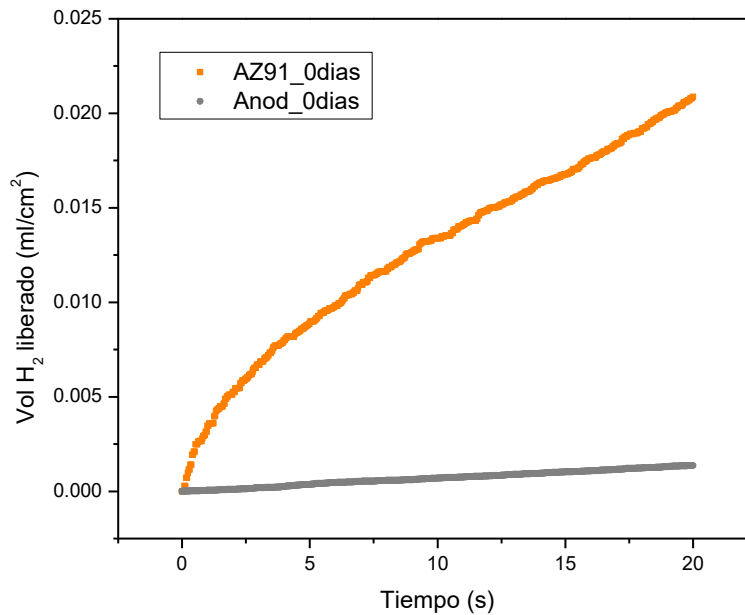


Figura 18. Volumen de H<sub>2</sub> liberado en función del tiempo para la muestra desnuda y anodizada.

Asumiendo un porcentaje aproximado de defectos del 0.5% del área de la muestra anodizada, se procedió a analizar un área de defecto en particular, para tener conocimiento de la liberación de hidrógeno en dicha zona. Para ello, se seleccionó un área de 0.0094 cm<sup>2</sup> en el rango de los 43 a los 63 segundos de inmersión de la muestra en solución con la presencia de un defecto y se obtuvo un valor de tasa de liberación promedio de  $6.38E-04 \frac{ml}{cm^2 * s}$ . En la Tabla 7 se muestra una captura de los videos utilizados para cada muestra por el software para la cuantificación de H<sub>2</sub> (g).




Área seleccionada (cm <sup>2</sup> )		
0.0346	0.0197	0.0094
		
<b>Muestra desnuda</b>	<b>Muestra anodizada</b>	<b>Muestra anodizada - Defecto</b>

Tabla 7. Capturas de los videos utilizados para la cuantificación de H<sub>2</sub> (g).

En la Tabla 8 se presenta el cálculo de la tasa de liberación promedio para el área en inmersión total de la muestra desnuda y de la muestra anodizada, teniendo en cuenta su correspondiente porcentaje de defectos aproximado.

	<b>Desnudo</b>	<b>Anodizado</b>
<b>Tasa de liberación promedio (<math>\frac{ml}{s}</math>)</b>	4.31E-03	2.90E-04

Tabla 8. Tasa de liberación promedio muestra desnuda y anodizada.

Queda en evidencia que la tasa de liberación total de hidrógeno gaseoso para el área en inmersión en SBF es aproximadamente 14 veces mayor en el caso de la muestra desnuda con respecto a la anodizada, aun considerando los defectos presentes en la muestra tratada.

Complementariamente, se obtuvieron curvas potenciodinámicas de una muestra anodizada y una muestra desnuda presentadas en la Figura 19. Dichos ensayos fueron realizados en SBF y a tiempos iniciales de inmersión. Esto quiere decir que no se dejaron las muestras en inmersión en SBF a temperatura corporal, sino que se analizaron ni bien se sometieron a la inmersión. Puede observarse



que los valores de densidad de corriente son menores para las muestras anodizadas, esto puede atribuirse a un efecto de reducción del área expuesta, ya que la capa generada por el tratamiento de anodizado actúa como barrera para la difusión de agua, oxígeno y/o iones desde la solución al sustrato. A su vez, la muestra desnuda presenta un potencial de corrosión mayor y una pendiente en la curva catódica (asociada a la velocidad de liberación de hidrógeno gaseoso al medio) mayor.

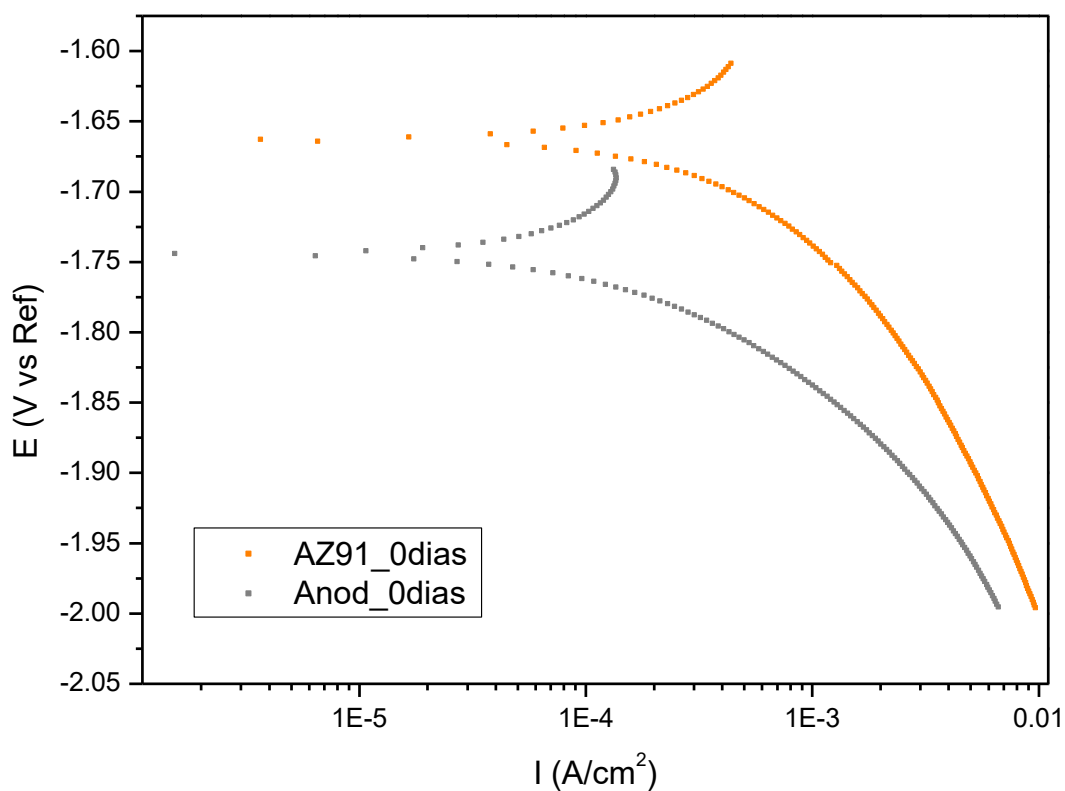


Figura 19. Curvas potenciodinámicas – Muestra desnuda y anodizada en SBF sin inmersión previa.

## 5.2 Estudios *in vitro* de inmersión prolongada

### 5.2.1 Análisis visual

En la Tabla 9 se presentan fotografías de fragmentos (1.5 x 0.8 cm) de las probetas desnudas y anodizadas sin inmersión previa y luego de uno, siete y treinta días de inmersión en SBF.

	Días de inmersión en SBF			
Tratamiento de la probeta	0	1	7	30
Desnuda				
Anodizada				

Tabla 9. Probetas desnudas y anodizadas luego de inmersión en SBF.

A tiempo cero, es decir, antes de poner la muestra en inmersión, puede observarse la capa de óxido existente sobre el sustrato en las muestras anodizadas, dando lugar a una zona oscura y opaca propia del óxido a diferencia del caso desnudo, donde la muestra se observa con el brillo característico del magnesio pulido.

Luego de un día de inmersión en SBF, se puede observar en la muestra desnuda una degradación predominante del lado derecho, mientras que en la parte que estuvo en inmersión de la muestra anodizada, la degradación se presenta de forma más uniforme a lo largo de la superficie, pero con menor intensidad.

Una vez alcanzados los siete días de inmersión, se puede apreciar una degradación general en ambos casos. En la muestra anodizada, la capa de óxido sigue estando presente, pero con corrosión general en toda el área.

A los treinta días de inmersión, ambas muestras presentan gran cantidad de material perdido, disminuyendo la integridad de la pieza.

## 5.2.2 Espectroscopía Raman

Las muestras fueron estudiadas por espectroscopía Raman para analizar la composición de los compuestos superficiales antes y después de la inmersión en SBF.

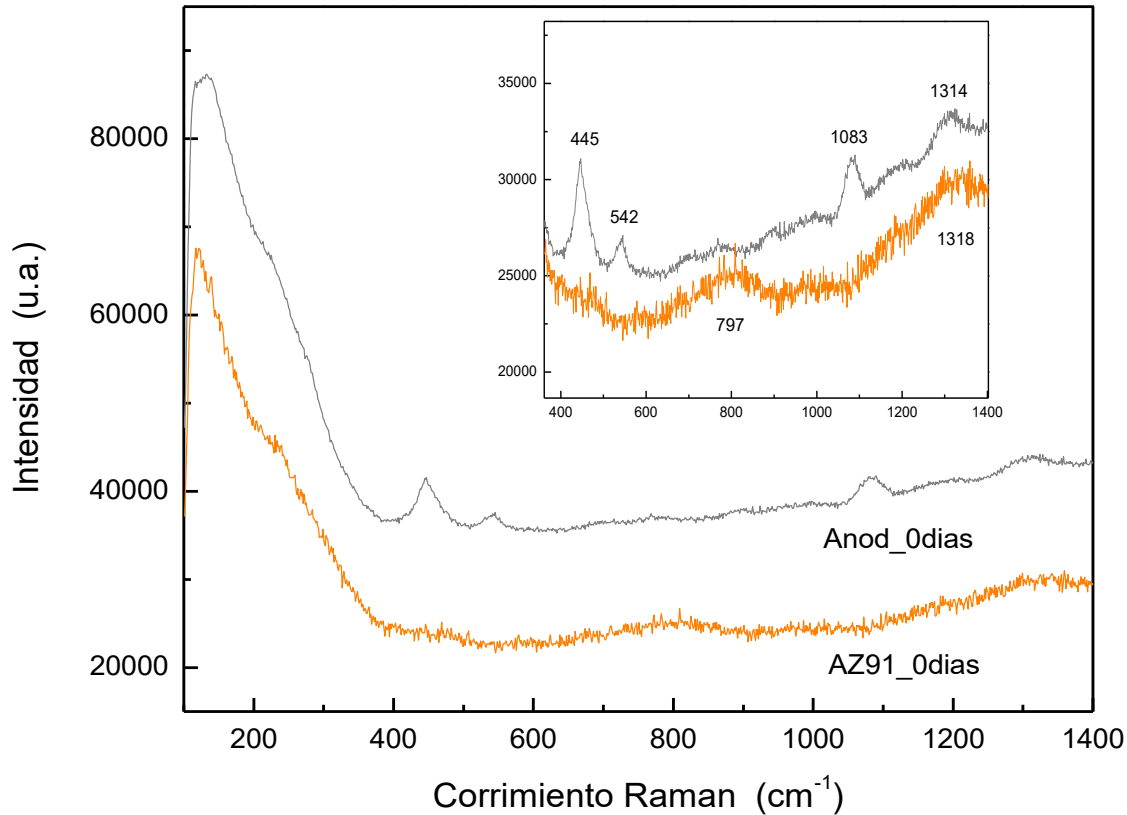


Figura 20. Espectros Raman de muestra de AZ91 con y sin anodizado previo, sin inmersión en SBF.

En la Figura 20 se muestran los espectros Raman de la muestra de AZ91 pulida y la comparación con la anodizada, sin inmersión en SBF. Pueden verse claramente los picos intensos a bajas longitudes de onda, relacionados con las vibraciones de la red metálica del Mg (117 y 139 cm<sup>-1</sup>) y con las vibraciones de los enlaces Mg-O (225 cm<sup>-1</sup>). En la muestra anodizada se presentan picos nuevos muy nítidos, que evidencian la formación de hidróxidos de Mg (445 cm<sup>-1</sup>) e hidroxitalcitas (compuestos de Mg y Al) en la banda de 542cm<sup>-1</sup><sup>38</sup>. También se presentan carbonatos presumiblemente de Mg en la banda de 1083 cm<sup>-1</sup>.

Cuando se compara el material sin anodizar y el anodizado separadamente a diferentes tiempos de inmersión en SBF, se detecta la generación de hidróxidos, fosfatos y carbonatos, provenientes de la solución fisiológica simulada (Figuras 21 y 22). En la Figura 21 se muestran los espectros obtenidos

para las muestras de AZ91D sin anodizar con diferentes tiempos de inmersión: sin inmersión y a tiempos de uno, siete y treinta días en SBF, mientras que en la Figura 22 se presentan los espectros Raman obtenidos para las muestras de AZ91D anodizadas, sin inmersión y a tiempos de uno, siete y treinta días en SBF. En ambos casos, se puede notar la presencia de ciertas bandas características entre las que se destaca la banda ubicada entre 115-380  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al magnesio metálico ( $\text{Mg}^0$ ) de las aleaciones estudiadas y otra banda con centro en 450  $\text{cm}^{-1}$  relacionada con la presencia de  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  generado por el avance de la degradación de la aleación en contacto con soluciones acuosas. En las muestras anodizadas a uno y siete días de inmersión, se observaron diferentes morfologías en la superficie por lo que se tomaron dos zonas diferentes de medición para cada condición (a) y b)). Se distinguen fosfatos relacionados con fosfatos de magnesio en ambos tiempos de inmersión. Dichos fosfatos también se encuentran en las muestras sin anodizar luego de un día de inmersión. La presencia de fosfatos relacionados con la apatita, alrededor de los 960  $\text{cm}^{-1}$  se da a los 7 días en las muestras sin anodizar y luego de 1 día en las muestras anodizadas, mostrando relativa reactividad y tendencia a la oseoinducción en las muestras anodizadas.

AZ91				AZ91 anodizado						Asignación
0d	1d	7d	30d	0d	1d		7d		30d	
					a	b	a	b		
119	117	117		117	118	117	117		117	Mg metálico
	136	138	141	132	138	136	137	139	137	Mg metálico
223	230		221	223	227	223	230	223	235	Vibraciones Mg-O
		419	419							Mg-OH
	455			447	460	454		443		Mg-OH
		547	547	542					550	Mg-Al-OH
		962				962		960		-PO <sub>4</sub> en apatita
	980		976		981		980		981	-PO <sub>4</sub> en fosfatos de Mg
		1064	1059						1060	-CO <sub>3</sub>

Tabla 10. Asignación picos presentes en espectroscopía Raman para muestras de AZ91 desnuda y anodizada a distintos tiempos de inmersión en SBF.

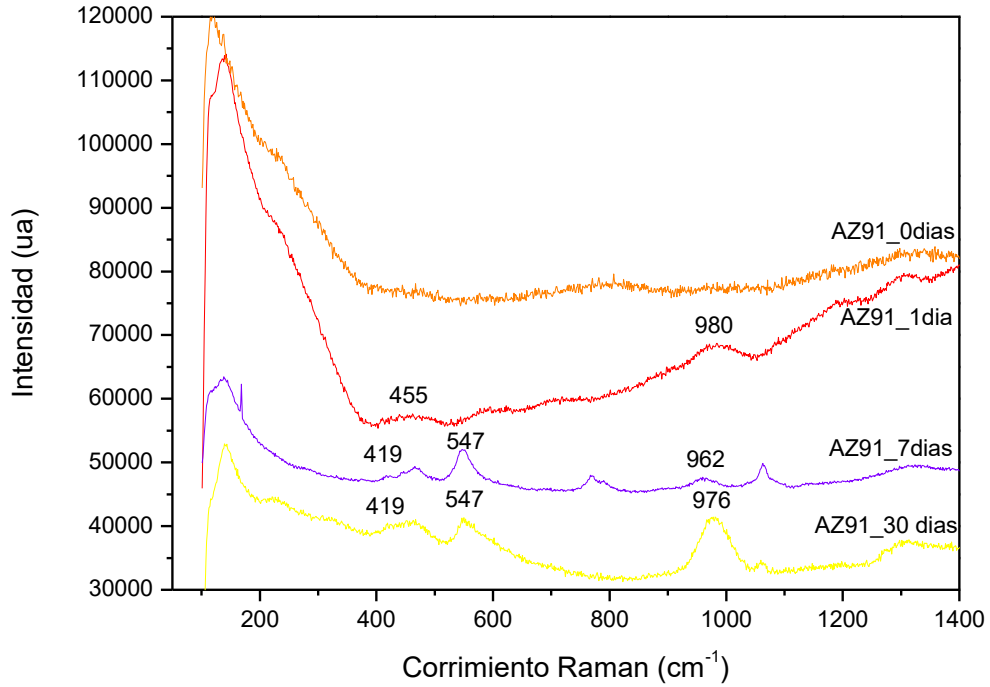


Figura 21. Espectros Raman de muestras desnudas de magnesio AZ91D sin inmersión, y a tiempos de inmersión de uno, siete y treinta días en SBF.

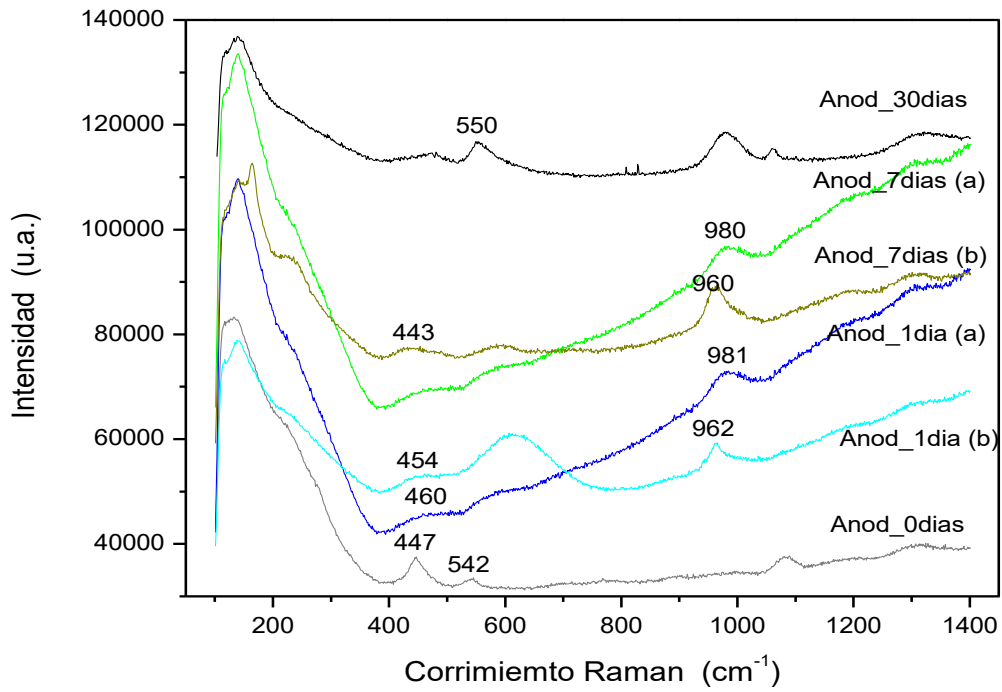


Figura 22. Espectros Raman de muestras anodizadas de magnesio AZ91D sin inmersión, y a tiempos de inmersión de uno, siete y treinta días en SBF.

### 5.2.3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

En primer lugar, se implementó la relación de Kramers Kronig a los resultados obtenidos los ensayos de EIS para analizar la validez de los mismos.

En la Figura 23 se presenta la aproximación realizada por Kramers Kronig para una muestra desnuda luego de un día de inmersión en SBF. La misma, consiste en una aproximación a los diagramas de bode y Nyquist, mientras que en la Figura 24 se presenta el cálculo del error residual obtenido a cada frecuencia.

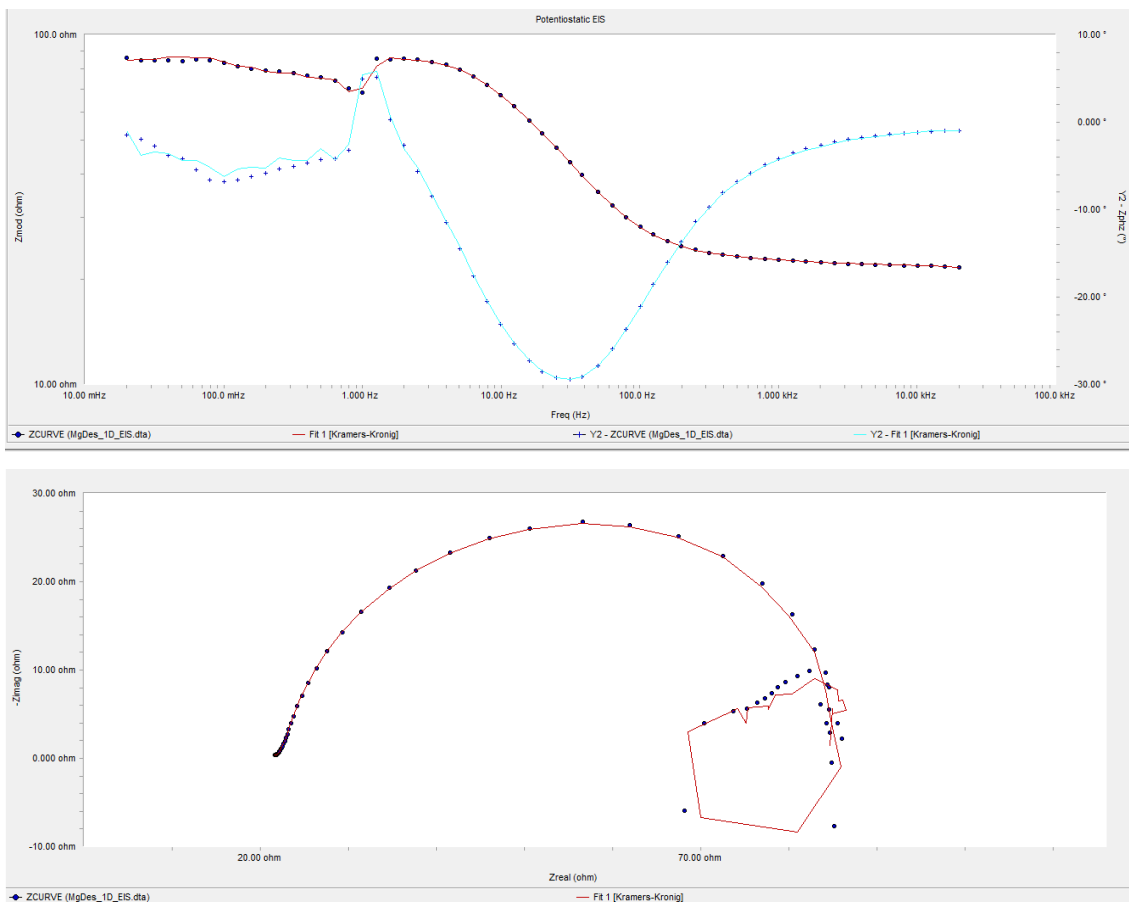


Figura 23. Aproximación de gráficos de Bode (superior) y de Nyquist (inferior) realizada mediante Kramers-Kronig.

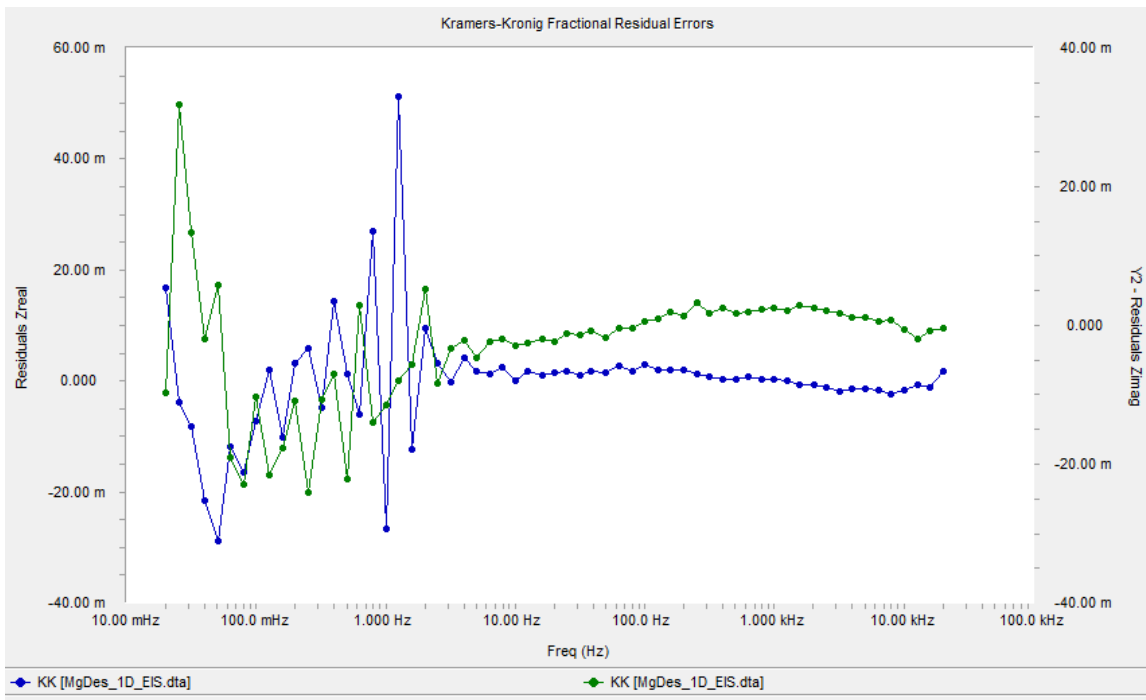


Figura 24. Error residual de aproximación Kramers-Kronig.

Puede observarse que en el rango de frecuencias menores a 1Hz no se cumple la relacion de Kramers Kronig dando lugar a que no se cumpla con alguna de las condiciones (linealidad, causalidad, estabilidad) que se deben dar para que los datos de impedancia sean consistentes. En general, las desviaciones en las bajas frecuencias se deben a comportamientos no estacionarios que violan la causalidad. Se presenta entonces, la imposibilidad de ajustar las curvas obtenidas con un circuito equivalente representativo de la condición superficial y de los procesos de corrosión que se llevan a cabo en la totalidad de rango de frecuencias ensayado. Se puede sin embargo realizar un análisis cualitativo de los procesos o fenómenos que se lleva a cabo en la interfase del material a estudiar. En la Figura 25 se presentan las curvas de Nyquist y Bode para la aleación desnuda y anodizada luego de uno y siete días de inmersión y anodizada luego de treinta días de inmersión. No se tuvo en cuenta ninguna curva de muestras desnudas a treinta días de inmersión ya que dado el gran deterioro de las probetas, se obtuvieron resultados poco coherentes debido al cambio significativo del area de las mismas.

Puede observarse que entre las muestras anodizadas y desnudas a luego de un día de inmersión no se observan diferencias considerables en cuanto a la resistencia total del sistema. Esto se puede inferir extrapolando a frecuencia cero el gráfico de Bode de Modulo de la impedancia  $|Z|$  vs frecuencia. En el caso de las muestras en inmersión durante siete días, se presenta una resistencia mayor en las muestras anodizadas con respecto a las desnudas. A treinta días de inmersión, la muestra anodizada presenta valores mayores de resistencia que el resto de las muestras.

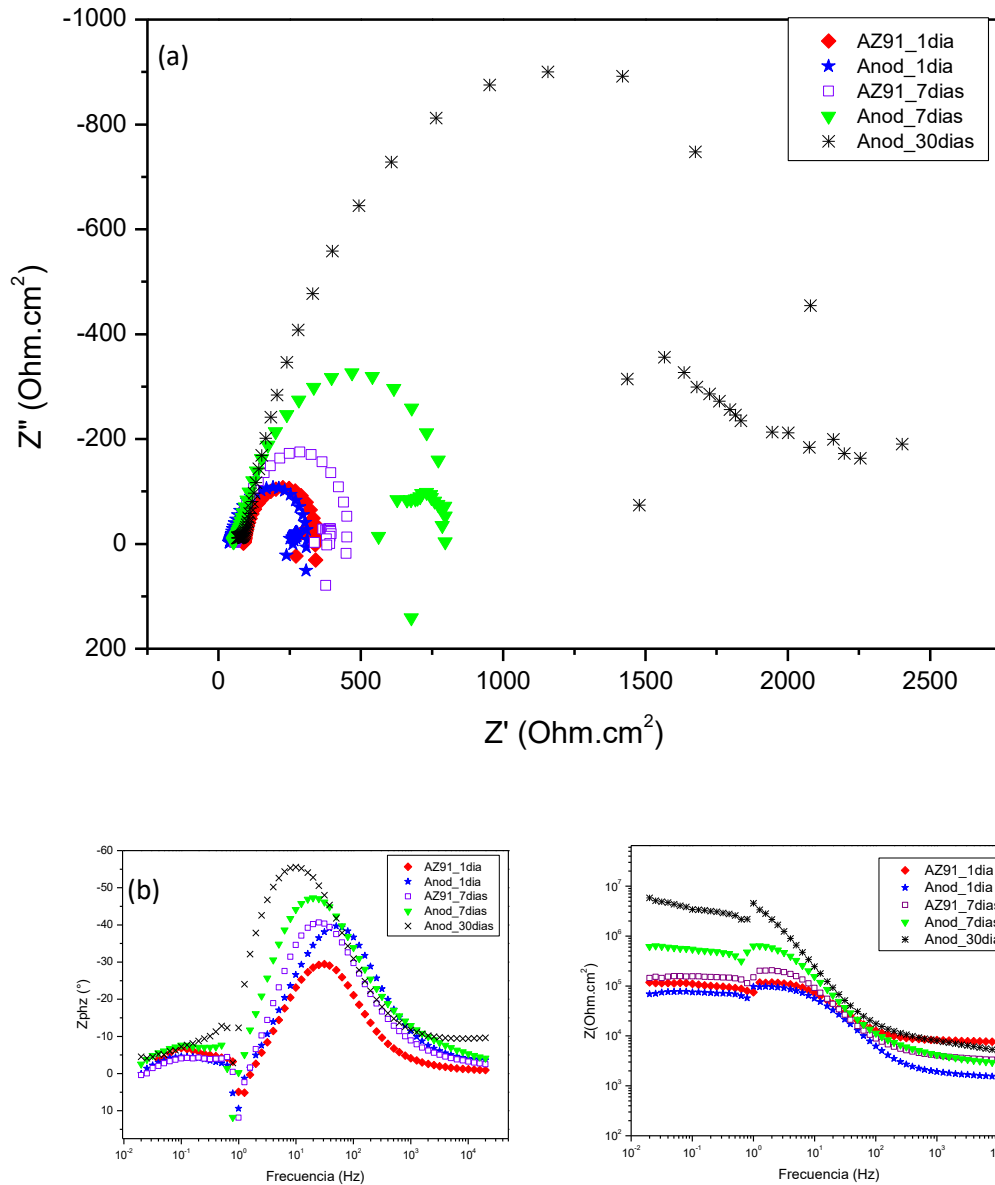


Figura 25. Diagrama de Nyquist (a) y Bode (b) para muestras desnudas y anodizadas luego de uno, siete y treinta días de inmersión.



En todos los casos,  $R_s$  (resistencia de la solución) es aproximadamente igual para todas muestras, mientras que la resistencia a la polarización es muy cercana en el caso de las muestras a 24 horas de inmersión, tanto desnudas como anodizadas. En el caso de las muestras luego de siete días de inmersión, se observa que los valores de resistencia son mayores en el caso de la muestra anodizada, y presentan una resistencia mayor en comparación a las muestras luego de un día de inmersión. Por otro lado, la muestra anodizada luego de 30 días de inmersión presenta una resistencia aún mayor que el resto de las muestras analizadas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la aproximación de Kramers-Kronig se procedió a ajustar los resultados hasta una frecuencia mínima de 1Hz, con el objetivo de analizar las características de la capa de óxido formada. En la Figura 26 se presenta el circuito utilizado:



Figura 26. Circuito equivalente utilizado.

Para poder analizar una correlación con parámetros físicos de los recubrimientos o depósitos en la superficie del material analizado, se evalúa la capacidad efectiva del recubrimiento u óxido. En la Figura 27 se muestran los valores de  $C_{eff}$  obtenidos para las muestras desnudas y muestras anodizadas luego de uno, siete y treinta días de inmersión en solución fisiológica, utilizando para el cálculo de  $C_{eff}$  la Ec.7 a partir de modelado de los resultados de alta frecuencia con el circuito equivalente presentado en la Figura 26. Si bien se observan cambios en los valores obtenidos, los resultados no presentan una diferencia significativa entre las muestras desnudas y anodizadas, ni se observan diferencias a los distintos tiempos de inmersión, ya que los valores están dentro del mismo orden de magnitud. Esto puede deberse a que luego de las 24 horas de inmersión, no se presentan cambios en la capacidad del recubrimiento realizado mediante el anodizado con respecto a la capa de óxido protector propia de la aleación formada durante el proceso de disolución en contacto con la solución fisiológica.

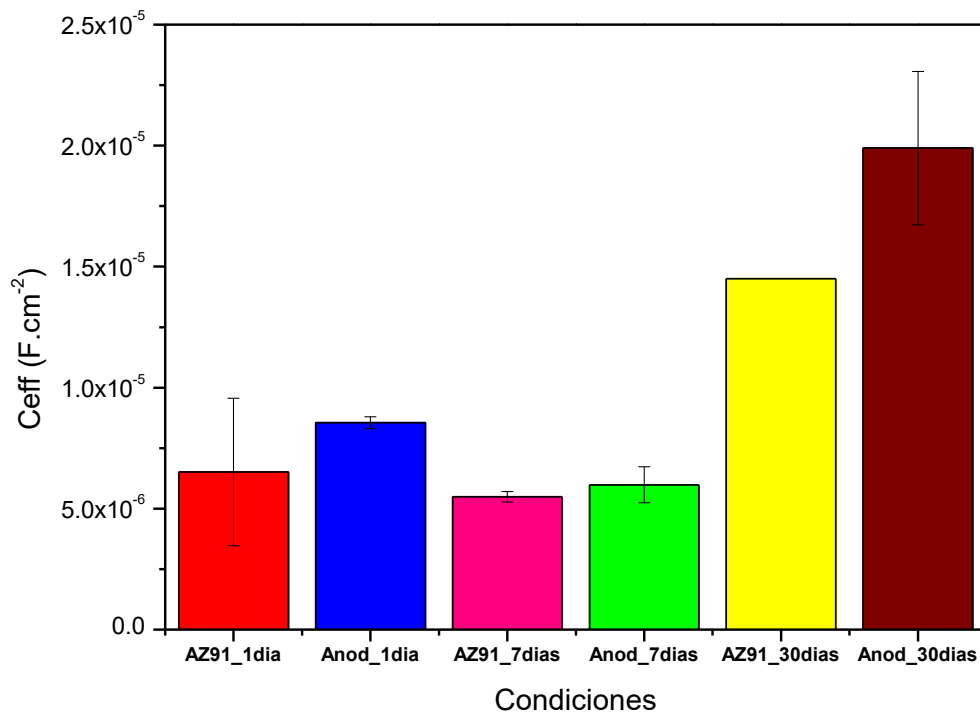


Figura 27. Capacidad efectiva de las muestras bajo análisis.

#### 5.2.4 Polarización potenciodinámica

En las Figuras 28, 29 y 30 se presentan las curvas potenciodinámicas obtenidas para uno, siete y treinta días de inmersión, teniendo en cuenta que se presenta aquella más representativa de cada grupo considerando la repetitividad de resultados en las cuatro réplicas realizadas para cada condición.

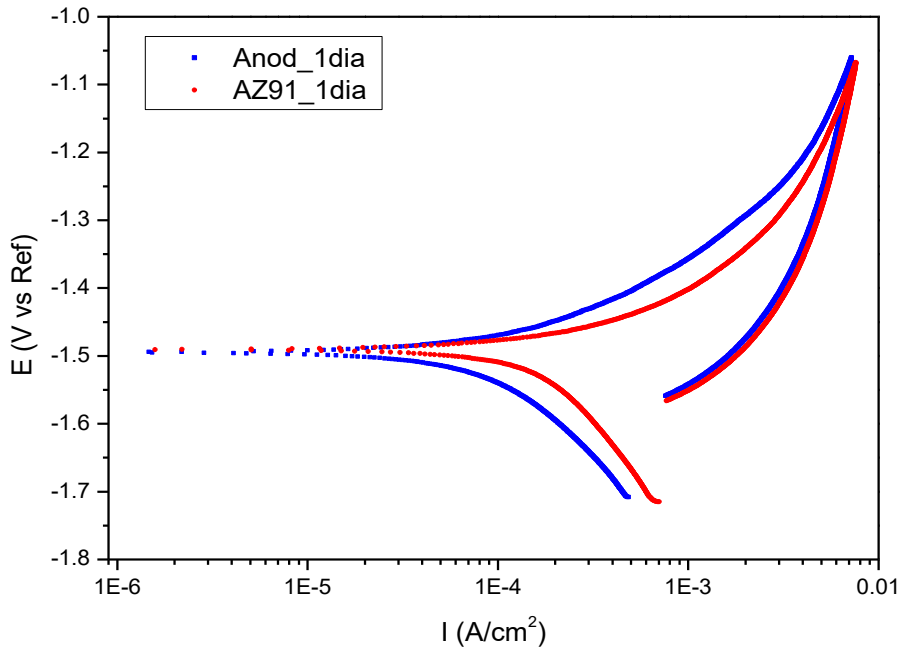


Figura 28. Curvas potenciodinámicas para la aleación desnuda y anodizada luego de un día de inmersión.

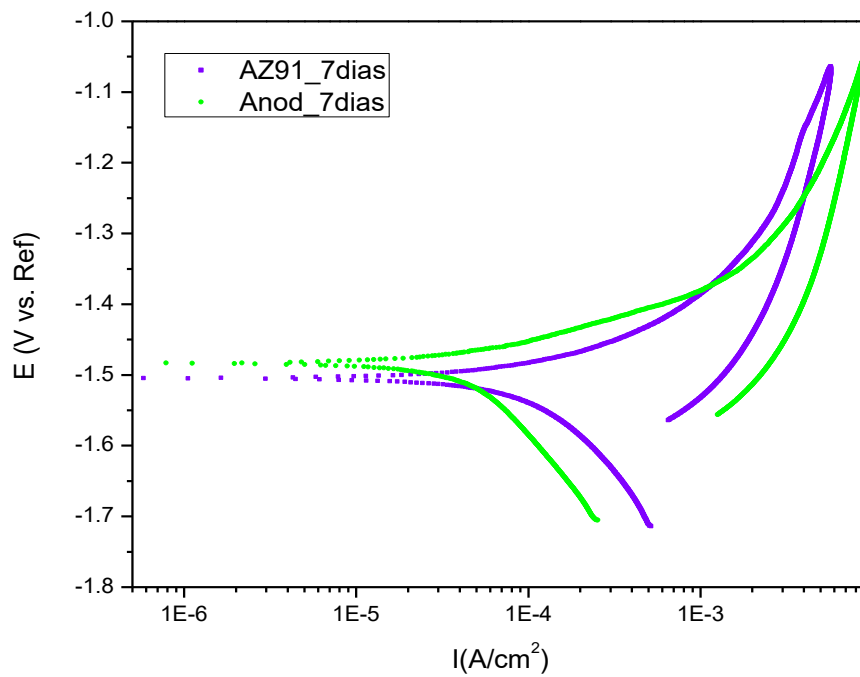


Figura 29. Curvas potenciodinámicas para la aleación desnuda y anodizada luego de siete días de inmersión.

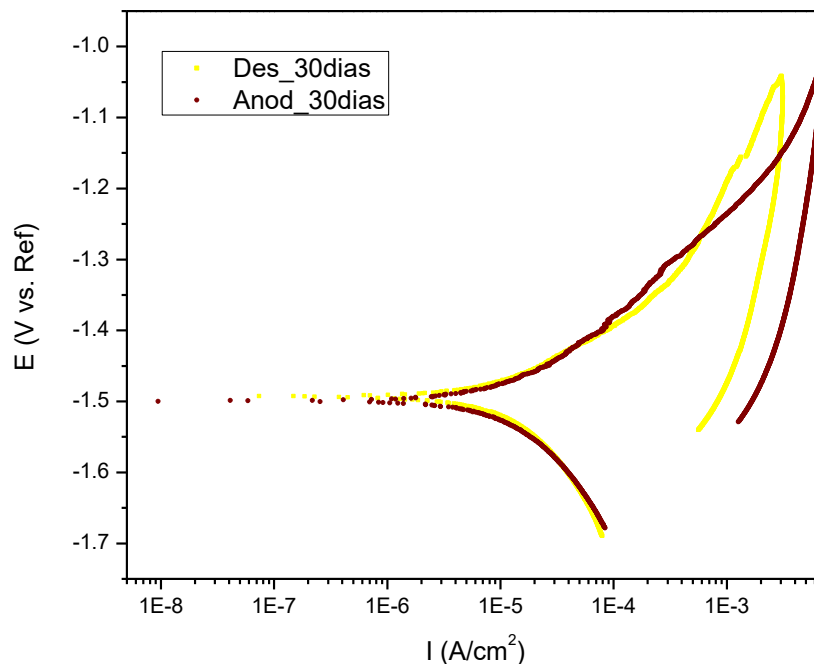


Figura 30. Curvas potenciodinámicas para la aleación desnuda y anodizada luego de treinta días de inmersión.

Para todos los tiempos de inmersión analizados se observa que las muestras presentan valores similares tanto de densidad de corriente como de potencial de corrosión ya sean desnudas o anodizadas.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los ensayos de liberación de hidrógeno, donde se pudo constatar que el mayor volumen de gas se produce en el primer momento de inmersión de la muestra en solución, es decir, que, pasadas las 24 horas de inmersión ya no se observan grandes diferencias en la resistencia a la corrosión de las muestras desnudas y anodizadas.

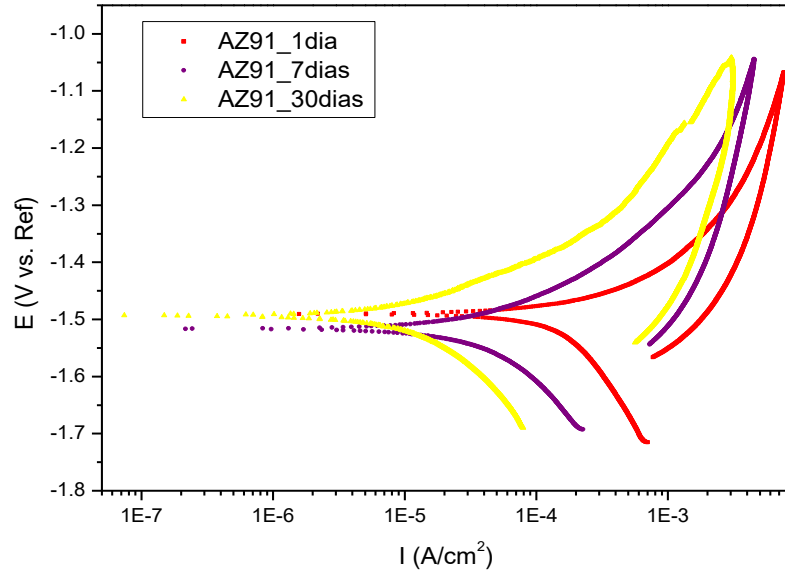


Figura 31. Curvas potenciodinámicas para la aleación desnuda luego de uno, siete y treinta días de inmersión.

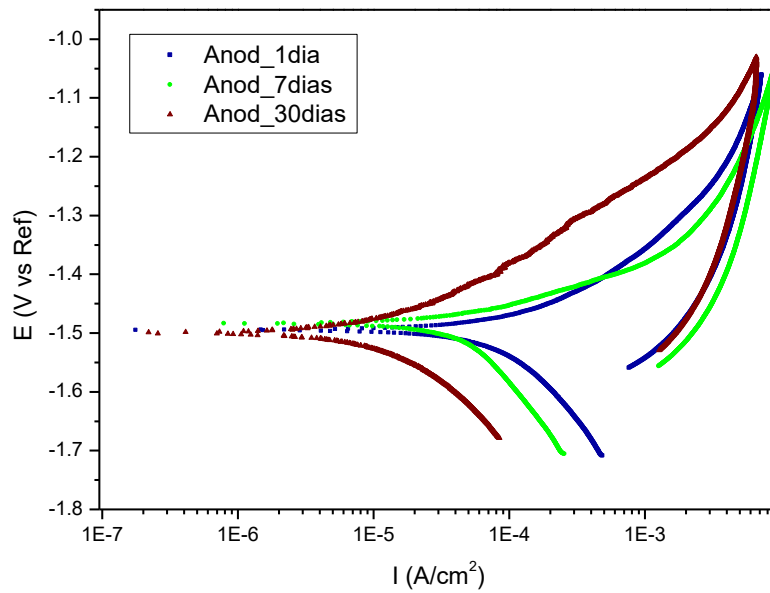


Figura 32. Curvas potenciodinámicas para la aleación anodizada luego de uno, siete y treinta días de inmersión.

En la Figura 31 se muestran las curvas de polarización para las muestras sin tratamiento de anodizado luego de uno, siete y treinta días de inmersión, mientras que en la Figura 32 se muestran

las curvas de polarización, para los mismos tiempos de inmersión, de las muestras anodizadas. En el caso de las muestras sin tratamiento previo, se presenta una mayor disminución en la liberación de hidrógeno gaseoso en el tiempo (al verse un cambio en la curva catódica de la aleación AZ91 a diferentes tiempos) y una disminución en la velocidad de disolución, que no se observa en las muestras anodizadas. Para las muestras anodizadas puede observarse una disminución del deterioro y formación de depósitos superficiales luego de la inmersión. Más notoriamente observado luego de treinta días de inmersión, dado que la curva anódica presenta densidades de corriente más pequeñas a igual potencial aplicado.

### 5.3 Discusión final

El análisis del procesamiento digital de imágenes acompañado por las curvas potenciodinámicas mostró una marcada disminución del volumen de hidrógeno gaseoso liberado al medio a tiempos iniciales de inmersión en solución fisiológica de la aleación anodizada respecto a la sin anodizar. Sin embargo, los resultados de los estudios *in vitro*, realizados a diferentes tiempos de inmersión en SBF no evidencian una mejora sustancial en cuanto a las propiedades electroquímicas entre las muestras desnudas y anodizadas luego de un día de inmersión ya que ambas condiciones tienden a equipararse luego de la inmersión en solución acuosa. Aun así, la presencia temprana de fosfatos en las muestras anodizadas luego de un día de inmersión proporcionaría una mejora en la bioactividad, generando puntos tempranos de deposición de apatita y posible oseointegración *in vivo*.

Es necesario entonces, analizar la posibilidad de reemplazar el proceso de anodizado con un tratamiento de la muestra desnuda simplemente sumergida en un medio acuoso durante 24 h de forma tal que forme una capa de óxido, previo a la implantación. De esta manera, no sería necesaria la realización de un tratamiento de anodizado para disminuir el volumen inicial de hidrógeno liberado.

## 6 Análisis económico

Se realizó un análisis económico con el objetivo de estudiar la posible inserción de tornillos de magnesio AZ91 con proceso de anodizado en el mercado mundial actual. Para ello, se consideró al producto competencia tornillos degradables “High quality ACL screw” (ASSURER, India) con un costo sin importación entre 85 y 100 dólares por pieza.

Para la realización del cálculo del costo de tornillos de aleación de magnesio AZ91 con anodizado, se tuvo en cuenta la inversión inicial como el costo de los equipos de maquinado de alta precisión, el costo de la celda de electroforesis (anodizado) y un porcentaje extra para poner en marcha el proceso de producción.

En la Tabla 11 se presentan los costos calculados para una producción de 200 piezas diarias, en dólares por año, teniendo en cuenta un desperdicio de material durante el torneado del 30% de la materia prima.

<b>Inversión inicial</b>	618000 USD/año
<b>Costos de materias primas</b>	9100 USD/año
<b>Costos de mano de obra (4 operarios)</b>	48000 USD/año
<b>Costos de supervisión (1 supervisor)</b>	18000 USD/año
<b>Costos de servicios</b>	24000 USD/año
<b>Costos de mantenimiento</b>	6000 USD/año
<b>Costos de suministros</b>	4635 USD/año
<b>Gastos de laboratorio</b>	4800 USD/año

<b>Costos por depreciación (a 5 años de inicio de producción)</b>	494400 USD/año
<b>Costos de impuestos</b>	9270 USD/año
<b>Costos de seguros</b>	4635 USD/año
<b>Costos de administración</b>	14400 USD/año
<b>Costo total anual</b>	<b>637240 USD/año</b>

Tabla 11. Costos estimados para la producción anual de tornillos de AZ91 con anodizado.

Teniendo en cuenta la cantidad de unidades producidas en un año, se obtuvo el costo por unidad de tornillo de aleación con el tratamiento de anodizado en **12.25 USD**. Este resultado, en comparación con el rango de valores de precios para tornillos degradables (aprox. 95 USD), ubica a las prótesis de AZ91 anodizadas en una buena posición en el mercado mundial de las prótesis degradables.



## 7 Conclusiones

De este trabajo pueden resumirse los siguientes resultados:

- Fue posible obtener un recubrimiento realizado mediante la técnica de anodizado con KOH.
- Las técnicas de caracterización superficial, SEM y rugosidad, permitieron analizar la estructura del anodizado en la superficie de la aleación.
- El uso de un software de cuantificación de burbujas liberadas permitió verificar la gran disminución del volumen de hidrógeno gaseoso liberado para las muestras anodizadas en comparación con las desnudas.
- De los ensayos electroquímicos realizados a distintos tiempos de inmersión pudo concluirse que pasadas las 24 horas de inmersión no se observan diferencias radicales en el comportamiento frente a la corrosión entre muestras desnudas y anodizadas en SBF.

Se puede concluir que el tratamiento de anodizado para la aleación de magnesio AZ91 que fue realizado en este proyecto, es efectivo como barrera para la liberación excesiva de hidrógeno gaseoso en estadios tempranos de inmersión (primeros minutos), y permite la nucleación y deposición de fosfatos a las 24hs de inmersión en SBF. Sin embargo, luego de ese periodo, su resistencia a la corrosión se iguala con la del material desnudo, permitiendo la disolución en el tiempo. También sería factible económicamente su producción ya que resulta competitivo su costo con el de los tornillos degradables del mercado.

## 8 Trabajo a futuro

Con base en los resultados obtenidos, quedan abiertos los siguientes temas a seguir desarrollando:

- Determinar el espesor de la capa de óxido generada durante el proceso de anodizado mediante SEM.
- Estudiar los depósitos presentes en las muestras desnudas y anodizadas antes y después de la inmersión en solución fisiológica mediante DRX.
- Estudiar la adhesión y resistencia mecánica del óxido generado por anodizado.
- Realizar ensayos de adhesión y proliferación celular.
- Estudiar el proceso de anodizado y todas las características superficiales de las películas en tornillos de AZ91.
- Realizar test *in vivo* para analizar degradación y oseointegración.

## 9 Referencias

- <sup>1</sup> Bauer, Schmuki, Mark, Park, "Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces," *Progress in Materials Science* vol. 58 pp. 261-326, (2013).
- <sup>2</sup> Robert Kane, Peter X. Ma "Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone" *Materials Today*, Volume 16, Number 11, (2013).
- <sup>3</sup> S. Bhat and A.Kumar, "Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare", *Landes Biosci.*, vo.3, no. September, pp.1-12, (2013).
- <sup>4</sup> P. Tengvall and I. Lundstrom, "Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial," *Clin. Mater.*, vol.9, no.2, pp. 115-134, (1992).
- <sup>5</sup> J. Levesque, D.Dube, M.Fiset, D. Mantovani, *Adv. Mater. Process*, (2004).
- <sup>6</sup> Bauer, Schmuki, Mark, Park, "Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces," *Progress in Materials Science* vol. 58 pp. 261-326, (2013).
- <sup>7</sup> Denny A. Jones "Principles and Prevention of Corrosion" Second edition, (1996).
- <sup>8</sup> Witte, "The story of biodegradable magnesium implants: A review" *Acta Biomaterialia* pp. 1680-1692, (2010).
- <sup>9</sup> Staiger, Pietak, Huadmai, Dias, "Magnesium and its alloys as an orthopedic biomaterials: A review", *Biomaterials* 27 pp. 1728-1734, (2006).
- <sup>10</sup> Zeng, Dietzel, Witte, Hort, Blawert "Progress and Challenge for Magnesium Alloys as Biomaterials", *Advanced biomaterials*, (2008).
- <sup>11</sup> Zeng, Dietzel, Witte, Hort, Blawert "Progress and Challenge for Magnesium Alloys as Biomaterials", *Advanced biomaterials*, (2008).
- <sup>12</sup> Yang CX, Yuan GY, Zang J. Tang Z, Zang XL, Dal KR. "Effects of magnesium alloys extracts on adult human bone marrow-derived stromal cell viability and osteogenic differentiation". *Biomed Mater* 5:045005, (2010).
- <sup>13</sup> Rachel W. Li, Nicholas T. Kirkland, John Truong, Jian Wang, Paul N. Smith, Nick Birbilis, David R. Nisbet. "The influence of biodegradable magnesium alloys on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells". *J Biomed Mater Res Part A*, (2014).
- <sup>14</sup> Poinern, G E J. et. Al. "Biomedical Magnesium Alloys: A Review of Material Properties, Surface Modifications and Potential as Biodegradable Orthopaedic Implant". *Am. J. Biomed. Eng.* 2, 218-240, (2012).

- 
- <sup>15</sup> Ghali, E., Dietzel, W. & Kainer, K.U, "General and localized corrosion of 13corrosion alloys: A critical review". *Journal of Materials Engineering and Performance* 22, 2875-2891, (2013).
- <sup>16</sup> Lunder, O., Lein, L.E. Aune, T.K. & Nisancioglu, K. "Role of Mg<sub>17</sub>Al<sub>12</sub> phase in the 13corrosion of Mg alloy AZ91. *Corrosion* 45, 741-748, (1989).
- <sup>17</sup> Hu, H., Nie, X. & Ma, Y. "Corrosion and Surface Treatment of Magnesium Alloys". *Magnes. Alloy.- Prop. Solid Liq. States*, 67-109, (2014).
- <sup>18</sup> Wang, L, Shinohara, T. & Zang, B.P. "Corrosion behavior of Mg, AZ31 and AZ91 alloys in dilute NaCl solutions". *Solid State Electrochem* 14, 1897-1907, (2010).
- <sup>19</sup> Blawert, C., Dietzel, W., Ghali, E., & Song, G. "Anodizing Treatments for Magnesium Alloys and Their Effect on Corrosion Resistance in Various Environments". *Advanced Engineering Materials*, 8(6), 511–533, (2006).
- <sup>20</sup> Denny A. Jones "Principles and Prevention of Corrosion" Second edition, (1996).
- <sup>21</sup> Cipriano, Lin, Miller, Lin, Cortez Alcaraz, Liu, "Anodization of Magnesium for Biomedical Applications – Processing, Characterization, Degradation and Cytocompatibility" *Acta Biomaterialia*, accepted Manuscript, (2017).
- <sup>22</sup> Gray, J. E., & Luan, B. "Protective coatings on magnesium and its alloys — a critical review". *Journal of Alloys and Compounds*, 336(1-2), 88–113, (2002).
- <sup>23</sup> S. Bauer, P.Schmuki, K. von der Mark, J. Park, "Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces", *Prog. Mat. Sci.*, 85-94, (2014).
- <sup>24</sup> Flemming, R. G., Murphy, C. J. Abrams, G. A., Goodman, S. L & Nealey, P. F. "Effect of synthetic micro- and nano. Structured surfaces on cell behavior". *Biomaterials* 20, 573-588, (1999).
- <sup>25</sup> i. Notinger J.R. Jones, S. Verrier, I, Biosson, P. Embanga, P. Edwards, J. M. Polak, and L.L. Hench, "Application of FTIR and Raman spectroscopy to characterisation of bioctive materials and living cells," *Spectrosc. Int. J.*, vol. 17, no. 2-3, pp. 275-288, (2003).
- <sup>26</sup> Vaamodende, A. J. V. & González, J.J.D.D. "Ciencia e Ingeniería de la Superficie de los Materiales Metálicos". (CSIC, 200)].
- <sup>27</sup> Orazem, M.E. & Tricollet, B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. Wiley & Sons, (2008).
- <sup>28</sup> Hsu, C. H. & Mansfeld, F. "Technical Note: Concerning the Conversion of the Constant Phase Element PArAmeter YO into a Capacitance." *Corrosion* 57, 747-748, (2001).
- <sup>29</sup> Jorcin, J.-B, Orazem, M. E., Pebere, N. & Tribollet, B. "CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy." *Electrochim. Acta* 51, 1473-1479, (2006).

---

<sup>30</sup> Hirschorn, B. et. Al. "Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters." *Electrochim. Acta* 55, 6218-6227, (2010).

<sup>31</sup> ZView Operating Manual, rev. D, 11, (2016).

<sup>32</sup> Kokubo, Takadama "¿How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" *Biomaterials* 27, 2907-2915, (2007).

<sup>33</sup> S. Omar, S. Ceré, J. Ballarre, S. Pellice. "Modificación superficial de materiales metálicos de uso en implantología", (2017).

<sup>34</sup> Mitutoyo, rugosidad superficial. Catalog number E70. Taylor Hobson. Manual de Rugosímetro Surtronic 3 Plus.

<sup>35</sup> G. Song, A. Atrens, S. StJohn, "An hydrogen evolution method for the estimation of the corrosion rate of magnesium alloys", Department of Mining, minerals and Material Engineering, Brisbane, Australia, (2001).

<sup>36</sup> M. Curioni, "The behaviour of magnesium during free corrosion and potentiodynamic polarization investigated by real-time hydrogen measurement and optical imaging". *Electrochimica Acta* 120 284-292, (2014).

<sup>37</sup> Frankel, G. S., Semanigo, A., & Birbilis, N. "Evolution of hydrogen a dissolving magnesium surfaces". *Corrosion science* 70, 104-111, (2013).

<sup>38</sup> Kloprogge, J. Theo, Frost, Ray L., & Hickey, Leisel "FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of the local structure of synthetic Mg/Zn/Al-hydroxalcalites". *Journal of Raman Spectroscopy* 35, 967-974, (2013).