



I N T E M A



Recubrimientos protectores, bioactivos y antibacteriales conteniendo vidrios de borosilicatos y cobre, sobre acero de uso quirúrgico

Marina A. Balestriere

Proyecto Final de Grado - Ingeniería en Materiales

Directora: Dra. Josefina Ballarre

Co-Directora: Dra. Silvia M. Ceré

División Electroquímica Aplicada - INTEMA - Conicet

Mar del Plata, Febrero 2020



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/).

Índice

1. Resumen	6
2. Introducción	8
2.1. Biomateriales	8
2.2. Materiales bioactivos	9
2.2.1. Vidrios bioactivos	10
2.2.2. Biovidrios dopados con cobre	13
2.3. Metales para implantes permanentes	13
2.3.1. Acero inoxidable AISI 316L	14
2.3.2. Corrosión de implantes de acero inoxidable AISI 316L	14
2.4. Recubrimientos por sol-gel	15
2.4.1. Proceso sol-gel	16
2.4.2. Funcionalización de recubrimientos con partículas bioactivas	17
2.4.3. Dip-coating	18
2.5. Técnicas de caracterización	19
2.5.1. Caracterización superficial	20
2.5.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	20
2.5.1.2. Perfilometría	20
2.5.2. Caracterización composicional	21
2.5.2.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	21
2.5.2.2. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS)	22
2.5.3. Caracterización electroquímica	22
2.5.3.1. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	22
2.5.3.2. Curvas de polarización potenciodinámica	23
3. Objetivos	25
4. Hipótesis de trabajo	26
5. Materiales y métodos	27
5.1. Materiales de partida	27
5.1.1. Sustratos metálicos	27
5.1.2. Partículas de vidrio bioactivo	27
5.1.3. Precursores del sol híbrido	28
5.2. Recubrimientos	28
5.2.1. Preparación de los sustratos	28
5.2.2. Síntesis del sol híbrido	29
5.2.3. Preparación de la suspensión de partículas	29
5.2.4. Técnica de Dip-Coating	30
5.2.4.1 Parámetro crítico	30

5.2.4.2. Sistemas estudiados	31
5.2.5. Tratamiento térmico	31
5.3. Ensayos In Vitro	32
5.3.1. Preparación de SBF	32
5.3.2. Inmersión en SBF	32
5.4. Caracterización de los materiales de partida y las muestras	33
5.4.1. Microestructura del acero inoxidable AISI 316L	33
5.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (MAS NMR)	34
5.4.3. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS)	34
5.4.4. Perfilometría	34
5.4.5. Tape Test	35
5.4.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	35
5.4.7. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	36
5.5. Ensayo de actividad antibacterial	36
5.6. Ensayos electroquímicos	36
5.6.1. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)	38
5.6.2. Curvas de polarización potenciodinámicas	38
6. Resultados y discusión	39
6.1. Caracterización de los biovidrios	39
6.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y distribución de tamaño de partículas	39
6.1.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	41
6.1.3. Resonancia Magnética Nuclear (MAS NMR)	43
6.1.4. Espectroscopía UV-VIS (DRS)	45
6.2. Caracterización del sustrato	46
6.2.1. Microestructura del acero inoxidable AISI 316L	46
6.3. Caracterización del sol híbrido	47
6.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	47
6.4. Caracterización de las muestras con y sin inmersión en SBF	50
6.4.1. Perfilometría	50
6.4.2. Tape Test	51
6.4.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	52
6.4.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	56
6.5. Respuesta antibacterial	60
6.6. Ensayos electroquímicos	61
6.6.1. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)	61
6.6.2. Curvas de polarización potenciodinámicas	66
7. Análisis económico	70
8. Conclusiones	72

9. Referencias	74
10. Trabajo a futuro	81
Anexo	82

Agradecimientos

Quisiera agradecer especialmente a Josefina Ballarre y a Silvia Ceré quienes confiaron en mí y me permitieron trabajar junto a ellas transmitiéndome todos sus conocimientos y respondiendo mis inquietudes. El mejor equipo de trabajo que podría pedir.

A todos los que integran la División Electroquímica Aplicada y la División Cerámicos por su ayuda, en especial a Sergio Pellice quien colaboró desinteresadamente en este proyecto.

A todas mis amigas de la vida que estuvieron siempre presentes, en especial a Maribel con quien comparto mis días desde que tengo memoria, y a las chicas de la facultad con quienes pasamos tantos momentos durante estos años de cursada.

A Fanny por el apoyo incondicional de siempre.

A mi novio Agustín, por toda la paciencia y apoyo durante la carrera, y por motivarme a superarme siempre.

A mi familia, por permitirme estudiar y por estar siempre para mí, en las buenas y en las malas.

A mi mamá, por todo.

¡Infinitas Gracias!

1. Resumen

Los metales y sus aleaciones son los principales candidatos para ser utilizados como biomateriales en aquellas aplicaciones donde el implante deba soportar grandes cargas, como en el caso de prótesis empleadas en traumatología y ortopedia. En particular, el acero inoxidable 316L sigue siendo el más utilizado en Latinoamérica para implantes permanentes debido a que se presenta como la opción más económica, con una buena relación costo/beneficio. Dicha aleación se caracteriza por ser bioinerte, tener excelentes propiedades mecánicas y una buena resistencia a la corrosión. Como contrapartida, no presenta características bioactivas por lo que una vez implantado no genera una unión con los tejidos vivos.

El medio fisiológico en el cual se encuentra inmerso el implante, posee un alto contenido de cloruros, caídas de pH y variaciones de los niveles de oxígeno, que generan que el acero inoxidable sufra corrosión por picado, llevando en muchos casos a la falla. Por lo tanto, la atención se ha puesto en mejorar las características de la interfaz metal/medio para lograr aumentar la vida útil del implante, recurriendo para ello a modificaciones superficiales. Una de las estrategias posibles para mejorar la resistencia a la corrosión y lograr bioactividad en el implante consiste en recubrir el metal con una capa protectora que actúa como barrera para la difusión de iones, y agregar una segunda capa que contenga partículas bioactivas para favorecer los procesos de osteointegración.

En el presente trabajo se propone la aplicación de un recubrimiento híbrido orgánico-inorgánico de dos capas, obtenido por sol-gel y depositado por *dip-coating* (técnica de inmersión-extracción) sobre un sustrato de acero inoxidable AISI 316L. Como precursores del sol híbrido se utilizaron tetraetoxisilano (TEOS) y metiltrimetoxisilano (MTMS). El sol fue funcionalizado agregando un 5% p/p de partículas de vidrio bioactivo de base silicato y borosilicato, para ser incorporado en la segunda capa del recubrimiento. Al disolverse, las partículas liberan en el organismo iones que favorecen la generación de fosfatos de calcio relacionados con la apatita (principal componente inorgánico del hueso) que propician la unión del implante con el hueso existente. Se incorporó además cobre como dopante de uno de los biovidrios, por sus conocidos efectos antibacteriales y angiogénicos.

Se utilizaron diversas técnicas para la caracterización de las muestras obtenidas, incluyendo microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), perfilometría y ensayos de adhesión.

Se realizaron ensayos *in vitro* sumergiendo a las muestras en solución fisiológica simulada (SBF) y manteniéndolas en estufa a 37°C durante 1, 3, 7 y 14 días, con el objetivo de evaluar la deposición de hidroxiapatita carbonatada (HCA), lo cual es un indicador de posible bioactividad del sistema.

Se evaluó el desempeño electroquímico a la resistencia a la corrosión de los sistemas recubiertos propuestos así como sus controles, a 1 y 14 días de inmersión en SBF, utilizando

dos técnicas: espectroscopía de impedancia electroquímica y curvas de polarización potenciodinámica.

Finalmente, se realizó un ensayo de difusión en agar con una cepa de *Escherichia Coli* para evaluar el poder antimicrobiano de los recubrimientos con biovidrios dopados con cobre.

Los recubrimientos presentaron buena adherencia al sustrato y no se observaron fisuras ni defectos que pudieran comprometer la función protectora de la primera capa. La dispersión de partículas en la segunda capa del recubrimiento resultó muy homogénea aunque se encontró que presenta porosidad submicrónica.

Los ensayos *in vitro* arrojaron resultados promisorios: en los espectros FTIR se encontraron señales que pueden ser asociadas a carbonatos y fosfatos de calcio, indicando que existe algún grado de bioactividad luego de 7 días en inmersión. Este hecho sólo fue confirmado a través de SEM para uno de los biovidrios empleados, donde pueden observarse *clusters* de hidroxiapatita.

El recubrimiento con vidrio dopado con cobre, no presentó en los ensayos con bacterias un halo de inhibición para la cepa bacteriana empleada, lo cual puede atribuirse a una lenta disolución del vidrio y a la necesidad de aumentar su concentración en el recubrimiento.

Los ensayos electroquímicos mostraron que los recubrimientos propuestos en este trabajo generan un fuerte aumento en el potencial de picado respecto del metal desnudo, con una disminución de la densidad de corriente de uno a dos órdenes de magnitud. Comparando los resultados a 1 y 14 días, no se detectaron cambios significativos demostrando que los recubrimientos siguen siendo protectores para la corrosión incluso luego de degradarse la capa externa por disolución de las partículas bioactivas.

2. Introducción

2.1. Biomateriales

Un biomaterial se define como un material sintético o natural modificado, que es capaz de interactuar con sistemas biológicos para controlar procedimientos terapéuticos o de diagnóstico médico. Se utilizan para reemplazar o mejorar una función de los tejidos u órganos que sufren algún tipo de daño o desgaste y de esta forma mejorar la calidad de vida de los pacientes [1,2].

En el pasado, cuando se encontraba algún tejido dañado, la única alternativa posible consistía en la remoción del mismo. Desde hace menos de 50 años se lleva a cabo de forma sistemática y exitosa el reemplazo de dichos tejidos, ya sea por trasplantes o por implantes, lo cual contribuyó al incremento de la expectativa de vida de las personas [3]. Los trasplantes pueden provenir del mismo organismo (autógenos), provenir de otro ser humano (alógenos) o provenir de una especie diferente como porcinos o bovinos (xenógenos). Los implantes fabricados de biomateriales presentan ciertas ventajas respecto de los trasplantes, incluyendo disponibilidad, confiabilidad y reproducibilidad. Sin embargo, aún hoy se producen fallas de los mismos por inestabilidad interfacial en el organismo (asociado a la biocompatibilidad del material y sus propiedades superficiales), desajuste biomecánico por diferencia de módulo elástico (*stress shielding*), desgaste por micro o macromovimientos relativos, etc. Por lo tanto, se debe poner especial atención en la interfaz tejido/implante y la forma en que se produce la fijación.

Existen distintas formas de fijar implantes: a través de cementos, por uniones bioactivas, uniones biológicas y por fijación externa. El énfasis en la investigación actual está puesto en la ingeniería de tejidos y en la regeneración de los mismos a partir de materiales bioactivos, los cuales no requieren de una fijación externa o la aplicación de un cemento acrílico [3].

Los biomateriales pueden ser poliméricos, cerámicos, metálicos o compuestos, y su selección dependerá de la función a desempeñar en el organismo (biofuncionalidad) y sus propiedades mecánicas, químicas, físicas y biológicas entre otras.

En cualquier caso, el material utilizado en el ámbito médico debe ser biocompatible, entendiéndose por biocompatibilidad a “la habilidad de generar una respuesta apropiada en el paciente”. Esto implica que no debe producirse un efecto adverso en el receptor del implante, ya sea de manera local o sistémica, ni tampoco en el implante en cuestión. Por lo tanto, deben ser compatibles con la sangre y no deben ser tóxicos, inflamatorios, pirogénicos, alergénicos ni cancerígenos [4,5].

De acuerdo con la interacción biológica entre el implante y el tejido, el material puede presentar distintos comportamientos. Si se produce la muerte del tejido que lo rodea, el material es tóxico y no puede ser utilizado en el organismo. En el caso de que el material cause una respuesta nula o mínima en los tejidos, se dice que el mismo es inerte o casi inerte, pudiéndose generar tejido fibroso que encapsule al implante. Finalmente, el material será

bioactivo si es capaz de dar lugar a una respuesta favorable del organismo, promoviendo la unión con el tejido que lo rodea.

Por otra parte, si el objetivo es que el implante permanezca en el cuerpo, se busca que presente características inertes o bioactivas, pero dependiendo de la aplicación puede que resulte conveniente que el material se reabsorba *in vivo* permitiendo la formación de tejido que lo reemplace. Para ello, los productos de la degradación no deben ser tóxicos y deben poder ser eliminados metabólicamente [1].

El éxito de un biomaterial utilizado como implante o dispositivo biomédico no depende únicamente de las características y propiedades que presente, ya que también son factores determinantes la condición clínica del paciente y la competencia del médico que realiza la operación y los seguimientos post-operatorios.

2.2. Materiales bioactivos

Todos los implantes poseen una duración limitada y los intentos por extender la vida útil de las prótesis ortopédicas a través de fijaciones morfológicas (grandes áreas superficiales) o biológicas no han mejorado la durabilidad respecto de la fijación cementada.

Desde hace algunas décadas, la atención se centró en el uso de implantes de fijación bioactiva donde se forma una unión interfacial con los tejidos vivos a través de capas de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) biológicamente activas sobre su superficie. Este mineral se encuentra presente en los huesos aproximadamente en un 60%, aportándoles dureza y rigidez, mientras que el resto está conformado por componentes orgánicos (como fibras de colágeno y células óseas) y agua (Figura 1).

La principal ventaja que presenta esta unión es que desarrolla resistencias iguales o superiores a las del hueso natural luego de 3 a 6 meses de la implantación. Esto se debe a que en condiciones *in vivo* crece una capa densa de aglomerados de hidroxiapatita carbonatada (HCA), la cual se une a las fibrillas de colágeno de los tejidos blandos y duros [6].

Los biovidrios, biocerámicos y vitrocerámicos son ejemplos de materiales con dichas propiedades bioactivas. En particular, los biovidrios permiten controlar el rango de propiedades químicas y con ello la cinética de unión con los tejidos. A través de un tratamiento térmico controlado, el vidrio puede cristalizar parcialmente para dar lugar a un vitrocerámico.

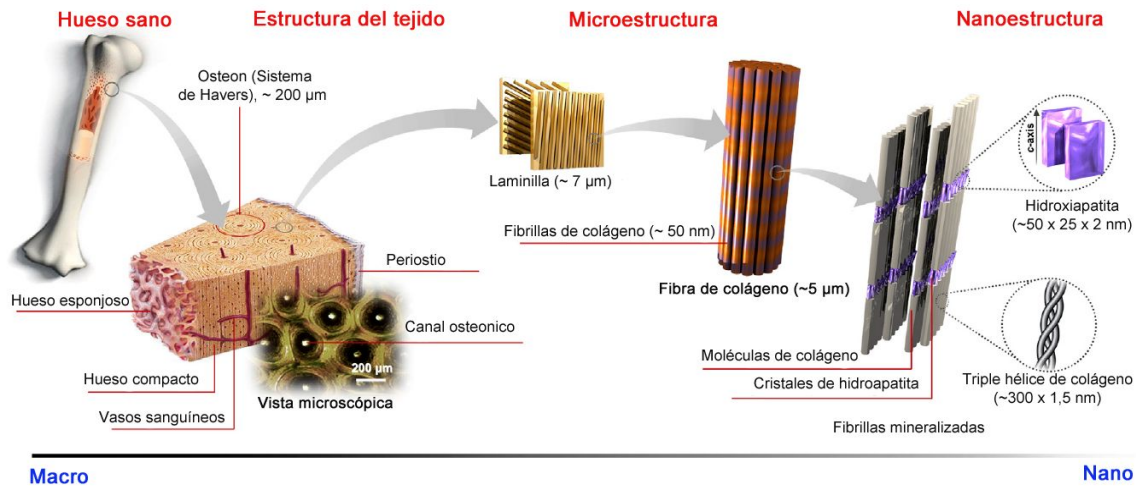


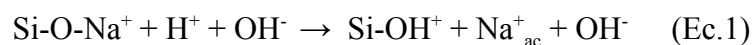
Fig.1. Estructura del hueso de la macro a la nanoescala (Sadat-Shoja *et al.* (2013), *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta Biomaterialia, 9(8), 7591–7621).

2.2.1. Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos son materiales sólidos, inorgánicos y amorfos, caracterizados por ser duros y frágiles. Están compuestos por óxidos que dependiendo de sus características químicas pueden ser formadores de red (como el SiO_2 , B_2O_5 y P_2O_5) o modificadores de red (Na_2O , K_2O , CaO , MgO , etc). A diferencia de los vidrios comunes, presentan propiedades bioactivas en medio fisiológico favoreciendo respuestas positivas de los tejidos circundantes.

Los mecanismos físico-químicos involucrados en la formación de una unión bioactiva con los tejidos a partir de la degradación de vidrios bioactivos fueron estudiados [6-8] y pueden describirse en 5 etapas:

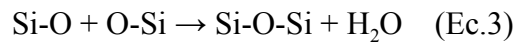
1. Reacciones rápidas de intercambio entre los modificadores de red del vidrio (Na^+ y Ca^{2+}) y los protones del medio, creando silanoles ($\text{Si}(\text{OH})_4$). El pH aumenta y se crea una zona rica en sílice cerca de la superficie del vidrio.



2. Por aumento local del pH se produce la rotura de enlaces Si-O-Si. Se produce la pérdida de sílice soluble hacia la solución, dejando más silanoles en la interfaz vidrio/solución.



3. Condensación de los silanoles en la superficie del vidrio formando una capa rica en sílice (SiO_2) sobre el mismo.



4. Adsorción de grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} del medio, permitiendo la precipitación de una capa de fosfato de calcio amorfo (ACP).
5. Cristalización de la capa amorfa al incorporar OH^- y CO_3^{2-} , para dar hidroxiapatita carbonatada (HCA).

Luego de la formación de hidroxiapatita, ocurre una secuencia de eventos celulares asociados con la formación de la unión bioactiva que incluyen: adsorción de restos biológicos y factores de crecimiento en la capa de HCA, acción de macrófagos, adherencia de células madre, diferenciación de dichas células (en osteoblastos para el caso de la formación de tejido óseo), generación y cristalización de la matriz.

En la Figura 2 puede verse de manera esquemática la evolución de las reacciones del biovidrio hasta la formación de tejido nuevo.

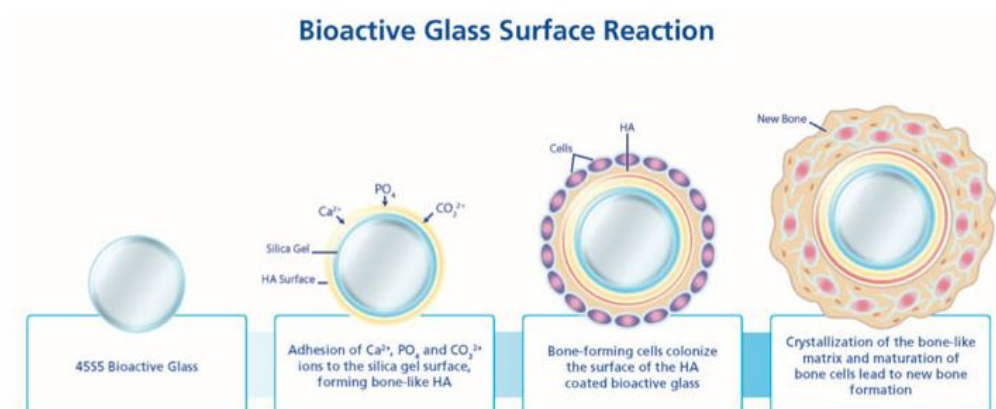


Fig.2. Secuencia de reacciones sobre el biovidrio hasta la obtención de una matriz de tejido óseo (Karasu *et al.* (2017), *Bioactive glasses*. El-Cezeri Journal of Science and Engineering, 4(3); 436-471).

Los primeros biovidrios fueron desarrollados en la década de 1970, resultando materiales biocompatibles, bioactivos, biodegradables, osteoinductivos (estimulan la síntesis de hueso nuevo a partir de células) y osteoconductivos (generan un andamiaje que propicia la formación de tejido óseo) [7].

El primer biovidrio estudiado y aprobado para uso clínico pertenece al sistema $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ y fue denominado 45S5 Bioglass® [8]. En el diagrama ternario de la Figura 3, se observa que el nivel de bioactividad que presentan los vidrios de dicho sistema depende fuertemente de su composición química. El biovidrio 45S5 se ubica justo en el centro del diagrama, presentando una composición para la cual se encuentra el mayor nivel de bioactividad.

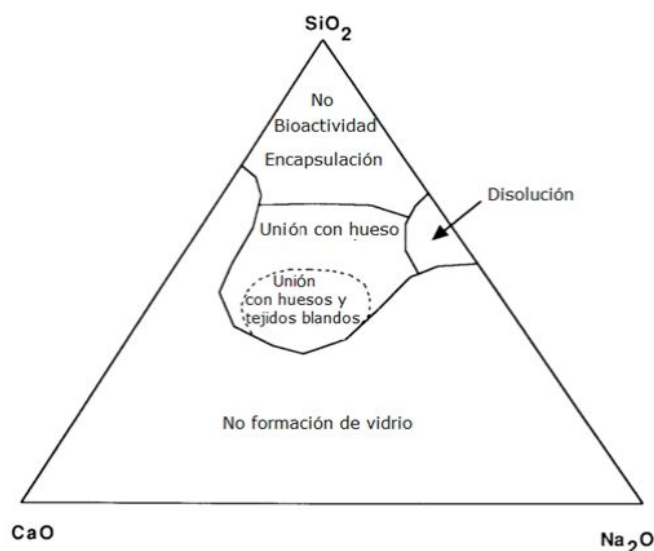


Fig.3. Diagrama ternario para el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ para un 6% p/p de P_2O_5 .

Desde el descubrimiento del 45S5, se han estado investigando composiciones de vidrios bioactivos con respuestas biológicas mejoradas, ya sea por efectos antibacteriales, liberación de iones terapéuticos, velocidades de degradación controladas y otras propiedades que favorecen la unión con el hueso y tejidos blandos.

Uno de los vidrios desarrollados fue el silicato 13-93, el cual también fue aprobado para ser utilizado en el ámbito biomédico y pertenece a un sistema un poco más complejo que el del 45S5: $\text{Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ [8]. Las composiciones de ambos biovidrios se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición de los vidrios bioactivos 45S5 y 13-93 en % p/p.

Vidrio	SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5	K_2O	MgO
45S5	45.0	24.5	24.5	6	-	-
13-93	56.6	5.5	18.5	3.7	11.1	4.6

En comparación, el vidrio 13-93 presenta mejores propiedades mecánicas y es más fácil de procesar a la vez que mantiene un buen nivel de bioactividad, en tanto que el 45S5 muestra una mayor velocidad de disolución y reacción para la formación de hidroxiapatita [7].

Para mejorar la disolución del 13-93, se ha ido reemplazando parte del SiO_2 por B_2O_5 , obteniendo borosilicatos de la misma familia, donde la velocidad de disolución aumenta con la relación B/Si. Estos nuevos biovidrios al degradarse liberan boro, el cual es un componente importante de los huesos y participa en diversos procesos metabólicos incluyendo aquellos relacionados con la formación y salud de los tejidos óseos [9].

2.2.2. Biovidrios dopados con cobre

Luego de una cirugía de implantación, los microorganismos presentes en la herida y el tejido operado pueden causar infecciones, condicionando el éxito del implante. Existen varios elementos conocidos como agentes bactericidas incluyendo Ag, Cu, Zn, Ce y Se [8].

Los mecanismos antimicrobianos del cobre son complejos pero se relacionan mayormente con su facilidad por aceptar y donar sus electrones. Esta propiedad permite que los iones de cobre alteren las proteínas dentro de las células de los microbios evitando que éstas puedan realizar sus funciones normales. Por otra parte, el cobre es también el responsable de inhibir el transporte electrónico en las interacciones de la pared celular, desordenando así las estructuras helicoidales del ADN [10].

Actualmente, existen varias líneas de investigación que buscan incorporar óxidos de cobre en las formulaciones de los biovidrios para dotarlos de propiedades antibacteriales. Al degradarse, se produce la liberación controlada de Cu^{2+} contribuyendo con la recuperación del paciente. Además, el cobre es conocido por sus efectos angiogénicos o de formación de vasos sanguíneos, y tiene un importante rol en la proliferación de células osteoblásticas [11-13].

2.3. Metales para implantes permanentes

Los biomateriales metálicos han tenido éxito clínico al ser utilizados en prótesis y dispositivos de fijación porque presentan una buena resistencia mecánica y tenacidad a la fractura ante sollicitaciones severas, además de ser biocompatibles.

La mayoría de los metales puros no pueden ser utilizados directamente como implantes ya que presentan propiedades mecánicas insuficientes como en el caso del aluminio, el cobre, el hierro y los metales nobles, o porque generan toxicidad local como el plomo, zinc o níquel. Únicamente el titanio y algunos otros elementos como el tantalio pueden ser utilizados en ortopedia sin la necesidad de aleantes.

Los aceros, las aleaciones base titanio y las aleaciones cromo-cobalto son las tres familias principales de aleaciones utilizadas para fabricar implantes permanentes [14,15].

La principal limitación que presentan los metales para su uso biomédico es la liberación, por procesos de corrosión o desgaste, de iones metálicos que resulten tóxicos pudiendo causar inflamaciones e incluso la falla de la prótesis. Además, los metales no tienen la capacidad de generar uniones naturales con el hueso una vez que son implantados (carecen de bioactividad).

Al momento de seleccionar un metal o aleación para el campo biomédico deben tenerse en cuenta las propiedades mecánicas que presente, así como su resistencia a la corrosión y la relación costo-beneficio.

2.3.1. Acero inoxidable AISI 316L

El acero inoxidable AISI 316L es una aleación de hierro de tipo austenítico, no magnético y con estructura cristalina FCC (cúbica centrada en las caras) a temperatura ambiente. Posee en su composición molibdeno y es más resistente a la corrosión generalizada y por picado que los aceros inoxidables convencionales que sólo contienen cromo-níquel, como la aleación AISI 304. El contenido de cromo debe ser superior al 12% para dar lugar a la formación de un óxido de cromo (Cr_2O_3) en la superficie que mejora la resistencia a la corrosión. Poseen buena conformabilidad, maquinabilidad y pueden ser endurecidos por trabajado.

La aleación AISI 316L es la versión de bajo carbono del AISI 316, donde el contenido se disminuye de 0.08% a 0.03% para tratar de evitar la precipitación de carburos de cromo (Cr_{23}C_6) en bordes de grano y generar el consecuente empobrecimiento de cromo en zonas aledañas, dando lugar al proceso de sensibilización por cromo. Además, los grados médicos o quirúrgicos tienen un menor contenido inclusionario para evitar corrosión localizada.

Esta aleación es comúnmente utilizada para fabricar implantes para reparar tejidos duros, en stents, válvulas y para prótesis ortopédicas, debido a sus propiedades a la fatiga, ductilidad y su capacidad de endurecimiento. La principal limitación que posee en el campo biomédico se debe a su falta de bioactividad, por lo cual el implante no puede integrarse a los tejidos vivos, y la tendencia a corroerse en aquellas regiones del cuerpo donde no hay oxígeno suficiente para mantener el film pasivo o donde puede formarse corrosión por rendijas (*crevice*) [2].

En Latinoamérica, el acero inoxidable AISI 316L sigue siendo el material más demandado para implantes permanentes, principalmente por motivos económicos y de disponibilidad, respecto de otras partes del mundo donde se utilizan con mayor frecuencia otras aleaciones de mayor prestación como las de titanio [16,17]. Es por ello que las investigaciones sobre este material se centran en mejorar su desempeño en el medio fisiológico para lograr una mayor durabilidad del implante, sobre todo en el caso de pacientes jóvenes quienes luego de 15 años en el mejor de los casos, deben someterse a una nueva cirugía para reemplazarlo.

2.3.2. Corrosión de implantes de acero inoxidable AISI 316L

Una definición general de la corrosión indica que es el deterioro de los materiales a causa de su reacción con el medio que los rodea [18].

Las reacciones de corrosión son de tipo electroquímicas, lo que implica que existe un proceso redox donde una especie se oxida y otra se reduce pero además se produce una transferencia de electrones en solución acuosa. Por lo tanto, el metal actúa como ánodo generando electrones y su consecuente degradación, mientras que existe alguna otra especie que toma esos electrones comportándose como cátodo. En la Figura 4, puede verse esquemáticamente el proceso corrosivo para el hierro en medio ácido.

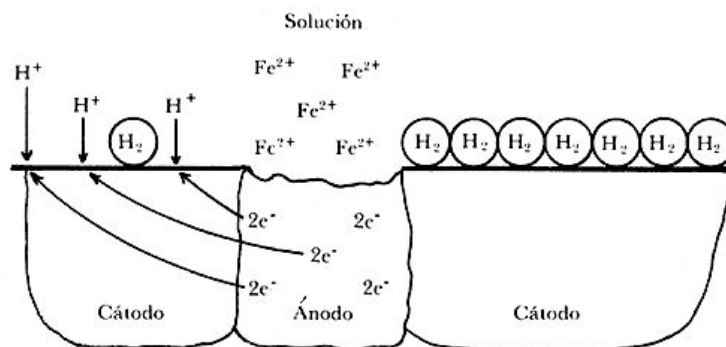


Fig.4. Esquema del proceso electroquímico en el hierro.

En un electrolito continuo, la superficie alcanza un potencial de estado estacionario conocido como potencial mixto o de corrosión (E_{corr}), indicando que las velocidades de la reacción anódica y catódica son iguales. Si se produce un desbalance en la cantidad de electrones en la superficie, ya sea por exceso o por defecto, puede generarse un potencial que conlleve a una polarización del sistema.

El pH del cuerpo humano varía entre 7.2 y 7.4 a 37°C y 1 atm de presión, el cual resulta levemente alcalino en condiciones normales, pero puede ocurrir que el mismo caiga a valores de 3 o 4 si se producen secreciones celulares inflamatorias debido a irritaciones por la cirugía. Esto claramente presenta una situación poco ventajosa para cualquier implante, que sumado a posibles variaciones en los niveles de oxígeno y la presencia de una gran cantidad de cloruros puede generar procesos de corrosión [19].

Si bien el acero inoxidable AISI 316L puede considerarse como un metal resistente a la corrosión en medio acuoso, el 90% de las fallas en implantes de este material son causadas por corrosión por picado y por *crevice* (formación de rendijas) en el medio fisiológico [20]. En el caso de stents fabricados de esta aleación, la liberación de iones de cromo, molibdeno y níquel, puede desencadenar reacciones inflamatorias e inmunes, poniendo en riesgo la vida del paciente. Por lo tanto, los procesos corrosivos generan no solo pérdidas de índole económica sino que también pueden reducir la expectativa de vida de las personas implantadas. De esta cuestión se desprende que resulta fundamental la investigación que permita mejorar el comportamiento y durabilidad de los aceros inoxidables AISI 316L [21].

2.4. Recubrimientos por sol-gel

Una de las estrategias utilizadas para la protección de metales y sus aleaciones de los procesos corrosivos es la aplicación de films o recubrimientos. Además, los mismos pueden ser funcionalizados para lograr uniones con el tejido óseo sin la necesidad de usar cementos (implantes no cementados) o dispositivos de fijación externa.

Existen en la actualidad diversas técnicas para la deposición de películas sobre metales, incluyendo deposición física en fase vapor (PVD), deposición química en fase vapor (CVD), deposición electroquímica, deposición por plasma-spray y los métodos sol-gel [22].

El proceso sol-gel es ampliamente estudiado y conocido, y se presenta como la técnica más versátil para la obtención de películas delgadas debido a que la síntesis se realiza a bajas temperaturas (en general a temperatura ambiente), el equipamiento necesario es relativamente sencillo y de bajo costo, permite recubrir piezas complejas ya que parte de precursores líquidos, y la microestructura y por ende las propiedades del film pueden ser controladas. Por otra parte, la mayor limitación que presenta es que cada capa de recubrimiento no suele superar $1\mu\text{m}$ de espesor, no pueden obtenerse estructuras completamente densificadas y pueden generarse tensiones térmicas entre el sustrato y el recubrimiento si el tratamiento térmico no es el adecuado [23-25].

2.4.1. Proceso sol-gel

El método sol-gel es una ruta química para la fabricación de material monolítico o películas delgadas con características y propiedades intermedias entre los vidrios y los polímeros. El proceso implica la síntesis de una solución de precursores monoméricos en un solvente orgánico (sol), y la conversión a un sólido que contiene solvente (gel), a través de reacciones de hidrólisis y condensación. La mayor parte del solvente se extrae mediante un tratamiento de envejecimiento o secado a temperatura ambiente y luego se realiza un tratamiento térmico para eliminar el agua y el solvente remanente. De esta forma, se logra densificar la estructura del gel alcanzando el mayor grado posible de policondensación del sistema y se obtiene el recubrimiento sólido. Las propiedades finales dependen de muchos parámetros como son el tipo de precursor, cantidad de agua empleada, tipo de catalizador, pH, tiempo de secado, tiempo y temperatura del tratamiento térmico, etc.

Los precursores son generalmente alcóxidos de un metal del tipo R-O-M, donde R es un grupo alquilo, O es un oxígeno y M es el ión metálico de interés.

Se ha comprobado que los geles de algunos óxidos metálicos obtenidos por sol-gel pueden inducir la formación de apatita en su superficie luego de inmersión en solución fisiológica simulada (SBF) a través de los correspondientes grupos M-OH [26]. Uno de esos óxidos es el SiO_2 , el cual contiene en su superficie grupos silanoles (Si-OH), siendo los alcóxidos de silicio los precursores más utilizados para estos sistemas.

Algunos de los alcoxisilanos más comunes son el tetraetoxisilano (TEOS) y el tetrametoxisilano (TMOS), los cuales no poseen grupos funcionales dando lugar a soles meramente inorgánicos. Otros poseen grupos funcionales no hidrolizables, como el metiltrietoxisilano (MTES), metiltrimetoxisilano (MTMS) y feniltrimetoxisilano (PTMS), los cuales otorgan un carácter orgánico al sol.

Al emplearse tanto precursores inorgánicos como orgánicos se obtienen soles híbridos, donde los grupos no hidrolizables unidos al silicio actúan como modificadores de la red, disminuyendo el grado de entrecruzamiento. Esto otorga una mayor plasticidad respecto de un recubrimiento de sol inorgánico lo cual permite aumentar el espesor crítico sin que existan fisuras y además disminuye la temperatura del tratamiento térmico para la cual se obtienen las mejores propiedades del sistema [22,25]. Por otro lado, la presencia de grupos no hidrolizables aumenta el carácter hidrofóbico de la red [25].

Las etapas del proceso sol-gel para obtener recubrimientos vítreos base sílice son las siguientes:



Primero, se produce la hidrólisis del alcoxisilano con el agua (Ec.4) al agregar un catalizador ácido, para obtener silanol (-Si-OH). Luego, ese silanol puede unirse con un monómero parcialmente hidrolizado o con uno que no esté hidrolizado para dar un siloxano (-Si-O-Si-). Producto de este proceso de policondensación se forman moléculas de agua (Ec.5) y de alcohol (Ec.6) [22,24,27]. Una vez iniciada la hidrólisis, tanto dicha reacción como la condensación ocurren simultáneamente. El proceso se completa con el secado y posterior tratamiento térmico de consolidación de la capa. En la Figura 5 puede verse esquemáticamente cómo evoluciona el sistema hasta obtener SiO_2 para el caso de un sol inorgánico obtenido a partir de TEOS.

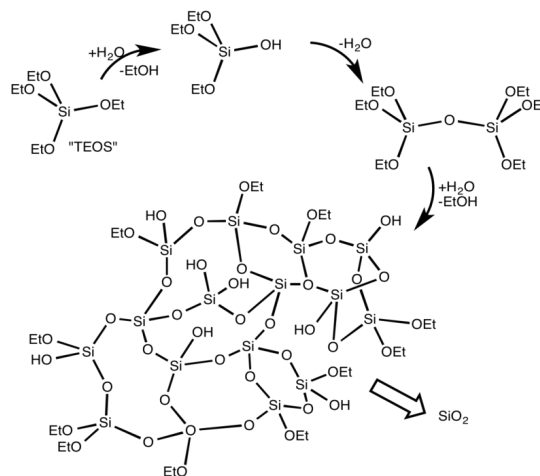


Fig.5. Evolución del proceso sol-gel para un sol obtenido a partir de tetraetoxisilano (TEOS).

2.4.2. Funcionalización de recubrimientos con partículas bioactivas

Una de las ventajas que presentan los recubrimientos obtenidos por sol-gel es la posibilidad de que sean funcionalizados mediante el agregado de partículas o compuestos de interés al sol. En el caso de recubrimientos para implantes metálicos, esto permite no sólo generar una barrera protectora para la corrosión sino también dotar a la interfaz de características bioactivas para favorecer la unión con el hueso.

Los sistemas más estudiados son aquellos que incorporan al recubrimiento partículas de vidrio bioactivo de silicatos y borosilicatos. Si bien las propiedades bioactivas que presentan los biovidrios por sí solos son en la mayoría de los casos suficientes para promover la osteointegración del implante, no poseen buenas propiedades mecánicas que permitan ser utilizados en aplicaciones donde existan grandes cargas. Es por ello que un metal con un recubrimiento bicapa funcionalizado (Figura 6) permite combinar propiedades mecánicas óptimas y las características bioactivas necesarias para obtener un implante duradero y resistente al medio fisiológico [6,28,29].

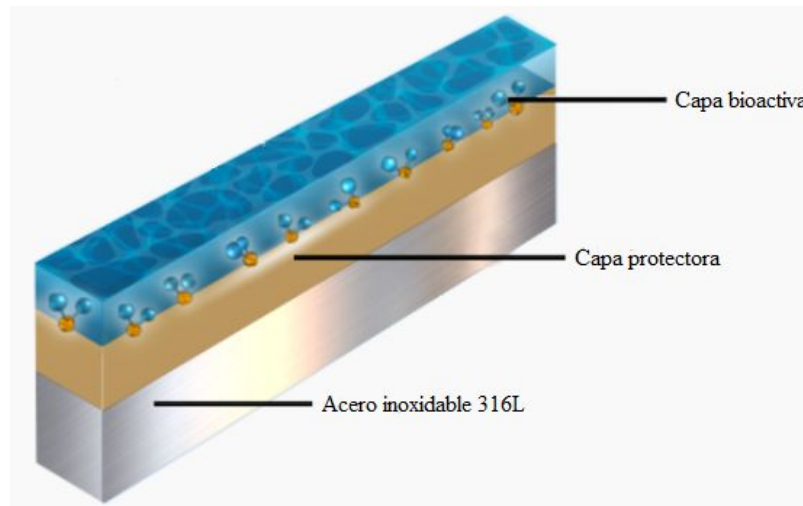


Fig.6. Representación esquemática de un recubrimiento bicapa funcionalizado.

2.4.3. Dip-coating

Un recubrimiento por sol-gel puede ser aplicado sobre un sustrato metálico a través de distintas técnicas como son *dip-coating*, *spin-coating* y *spray-coating* [21]. La técnica más utilizada es *dip-coating* (inmersión-extracción), en la cual el metal es sumergido en forma vertical dentro del sol y luego es extraído del mismo a una velocidad controlada (Figura 7). El equipamiento utilizado es sencillo y de relativo bajo costo respecto de otras técnicas.

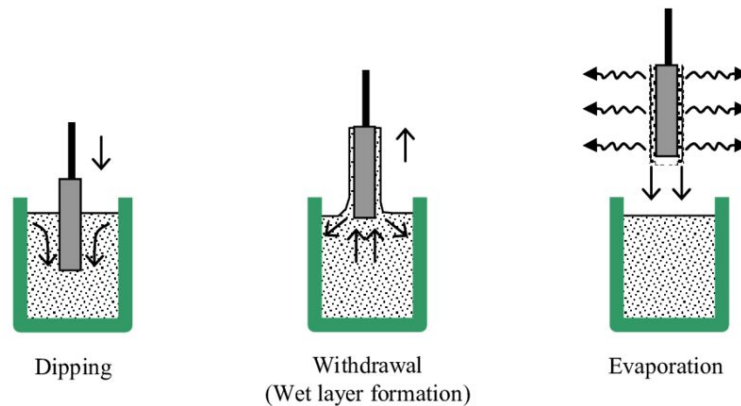


Fig.7. Esquema de la técnica dip-coating para recubrimientos por sol-gel (Sánchez-Herencia (2007), *Water Based Colloidal Processing of Ceramic Laminates*, Key Engineering Materials Vol. 333 pp. 39-48).

Al retirar el sustrato del sol, comienza a producirse el drenaje del líquido remanente por fuerzas gravitacionales, al mismo tiempo que ocurre la evaporación del solvente y la condensación. La competencia entre las distintas fuerzas y procesos que ocurren en la extracción son las que gobiernan el espesor del film depositado. Es importante que la deposición se lleve a cabo a velocidad constante de extracción para obtener espesores uniformes, y que dicha velocidad sea menor a la crítica para evitar que los films se fisuren [24].

2.5. Técnicas de caracterización

No existe una única técnica que permita evaluar el desempeño de un recubrimiento y es por ello que se recurre a una serie de métodos de caracterización complementarios entre sí.

En el caso de los materiales bioactivos, el éxito o fracaso del implante viene dado por la mejora en la resistencia a la corrosión en fluidos fisiológicos y por el nivel de osteointegración logrado. Existen muchos factores que pueden promover o inhibir los procesos de unión con el tejido óseo, pero al ser la superficie del implante la que se encuentra en contacto directo con el medio fisiológico, sus propiedades poseen una fuerte influencia sobre el resultado.

Si bien no existe un consenso acerca de cuáles son las características ideales para la interfaz, se sabe que en los procesos de adhesión celular y osteointegración intervienen tanto la topografía como la química superficial del implante.

En un metal desnudo, las propiedades de la superficie son influenciadas por las propiedades del seno del material. Desde hace tiempo, se han empezado a introducir modificaciones sobre la superficie de los implantes para controlar las interacciones con el tejido vivo y tratar de acortar los tiempos de fijación ósea. Estas modificaciones pueden abarcar la química, estructura, energía o reactividad superficial [30].

2.5.1. Caracterización superficial

2.5.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Es una técnica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de la muestra. Se basa en la aceleración de un haz de electrones en un campo eléctrico, para hacerlo incidir sobre el material. Los electrones chocan contra los átomos de la muestra y producto de la interacción se despiden electrones secundarios los cuales son captados por un detector para producir la imagen.

En el caso de recubrimientos funcionalizados, a través de SEM pueden observarse defectos del film como fisuras, porosidad y partículas no deseadas. Además, a partir de las imágenes pueden hacerse estudios de la dispersión de partículas de biovidrio en el recubrimiento y determinarse la distribución de tamaño de partículas.

2.5.1.2. Perfilometría

Un perfilómetro es un instrumento de medición que permite determinar el perfil de una superficie para cuantificar su rugosidad, a través de parámetros de amplitud relativa entre los picos y valles medidos respecto de la longitud abarcada.

Un recubrimiento aplicado uniformemente sobre el sustrato metálico tiende a suavizar su superficie, tapando las imperfecciones existentes, como ser las rayas del pulido (Figura 8). Este hecho puede ser evidenciado a través de la variación de los parámetros de rugosidad medidos.

Aunque una mayor rugosidad mejora el trabado mecánico entre el implante y el hueso, puede dar lugar a procesos inflamatorios indeseados y a la adhesión de bacterias. Por otro lado, un perfil en el orden de los micrones o los nanómetros puede aumentar la energía superficial mejorando la adsorción de proteínas y la adhesión celular. Por ende, resulta importante conocer el perfil de rugosidad para poder relacionarlo con el comportamiento observado en la muestra.

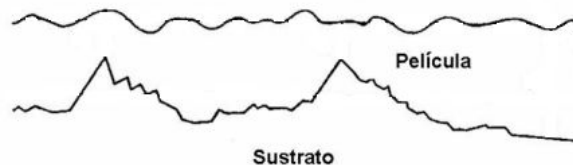


Fig.8. Rugosidad generada por el recubrimiento.

Dos de los parámetros de la rugosidad más utilizados son el Ra (rugosidad media aritmética) y el Rz (rugosidad media).

El Ra se define 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 Lm (Figura 9, Ecuación 7).

$$Ra = \frac{1}{Lm} \int_0^{Lm} |y| dx \quad (\text{Ec.7})$$

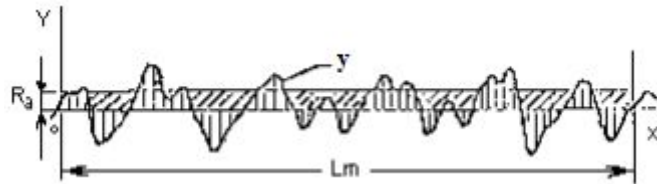


Fig.9. Parámetros para la obtención de Ra.

El Rz da información complementaria a la del Ra y es igual a la media aritmética de los valores de rugosidad parcial Zi correspondientes a cada uno de los cinco módulos integrantes de la longitud de medición (Figura 10, Ecuación 8).

$$Rz = \frac{1}{5} (Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5) \quad (\text{Ec.8})$$

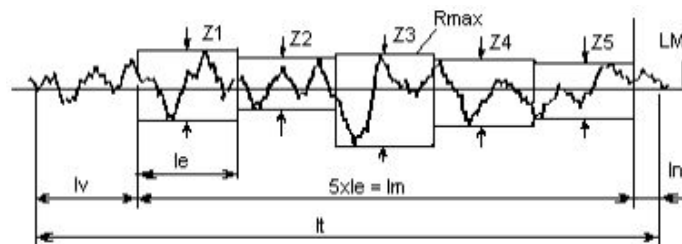


Fig.10. Parámetros para la obtención de Rz.

2.5.2. Caracterización composicional

2.5.2.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja implica la interacción de radiación con la materia, en el intervalo de longitudes de onda que abarca desde 0.75 hasta 400 μm. En particular, utiliza la transformada de Fourier como un método matemático para el desarrollo en serie de la curva obtenida.

Cada compuesto presente en el material posee modos normales de vibración de sus enlaces, generando un espectro característico al interactuar con la radiación. La interpretación de estos espectros permite identificar grupos funcionales y asociarlos con compuestos.

Es un método muy importante para evaluar la bioactividad de las muestras recubiertas luego de los ensayos *in vitro* en algún tipo de solución fisiológica que simule el entorno del cuerpo humano donde estará aplicado el implante. Al comparar los espectros de los

materiales con y sin inmersión permite identificar la evolución de los compuestos presentes, así como la aparición de nuevas especies químicas asociadas a la formación de hidroxiapatita.

2.5.2.2. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS)

Es una técnica espectrofotométrica que utiliza radiación electromagnética (luz) en las regiones visibles y ultravioleta cercana. La radiación absorbida por las moléculas en esta región del espectro provoca transiciones electrónicas desde el estado fundamental hacia un estado excitado que pueden ser cuantificadas. Se suele utilizar para determinar pequeñas cantidades de cierta sustancia, como pueden ser trazas de un elemento contaminante o un dopante, a partir de las transiciones electrónicas que lo caracterizan.

2.5.3. Caracterización electroquímica

Dado que resultaría imposible estudiar el comportamiento a la corrosión de un implante metálico dentro del organismo, existen técnicas de caracterización electroquímica que permiten evaluar de forma acelerada e *in vitro* la respuesta del material al medio fisiológico.

Para ello, se utiliza un medio simulado que imita la temperatura, pH y iones inorgánicos presentes en el plasma sanguíneo, aunque no tiene en cuenta componentes orgánicos que también existen en el organismo y que pueden interactuar con el implante.

Por lo tanto, estos ensayos se llevan a cabo en algún tipo de solución fisiológica simulada en celdas electroquímicas termostalizadas a 37°C utilizando tres electrodos: un electrodo de trabajo que será el metal a evaluar, un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

En el caso de un metal con un recubrimiento, las reacciones de oxidación estarán limitadas por el contacto del electrolito con el metal en los poros o defectos que pueda tener el film.

Para analizar el comportamiento del material recubierto y compararlo con el metal desnudo a distintos tiempos de inmersión, se emplean dos de las técnicas disponibles: espectroscopía de impedancia electroquímica y curva de polarización potenciodinámica.

2.5.3.1. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Es una técnica electroquímica no destructiva, en la cual se modula el potencial unos pocos milivoltios alrededor del potencial de corrosión y se mide la corriente a distintas frecuencias. Para la medición, es fundamental que el potencial de corrosión se encuentre estabilizado en el tiempo. Luego, el equipo procesa las mediciones en el tiempo del potencial $E(t)$ y de la corriente $I(t)$ dando como resultado valores de impedancia para cada frecuencia (Ecuaciones 9, 10 y 11).

$$E(t) = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (\text{Ec.9})$$

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \theta) \quad (\text{Ec.10})$$

$$Z(\omega) = E(t)/I(t) \quad (\text{Ec.11})$$

donde θ es el ángulo de fase entre $E(t)$ y $I(t)$.

En corriente alterna, la impedancia tiene un significado equivalente a la resistencia en corriente continua, pero depende de la frecuencia (ω) aplicada. La impedancia, a su vez, puede ser expresada en términos de una parte real y una parte imaginaria según la Ecuación 12:

$$Z = |Z|. \exp(j\theta) \quad (\text{Ec.12})$$

Existen dos representaciones posibles de los resultados obtenidos por EIS. En el diagrama de Nyquist se representa la parte real de Z (Z') vs la parte imaginaria (Z''), mientras que en los diagramas de Bode se representan $|Z|$ vs frecuencia y θ vs frecuencia. Existe una correspondencia entre ambas representaciones, dada por las siguientes ecuaciones:

$$|Z|^2 = Z'^2 + Z''^2 \quad (\text{Ec.13})$$

$$\tan\theta = Z''/Z' \quad (\text{Ec.14})$$

La espectroscopía de impedancia permite estudiar las características estructurales de las películas superficiales (como óxidos y recubrimientos), a través del ajuste de los resultados mediante modelos circuitales e interpretando cada uno de sus elementos.

2.5.3.2. Curvas de polarización potenciodinámica

Las curvas de polarización son un tipo de análisis que resulta destructivo para la muestra. En este ensayo, se realiza un barrido potenciodinámico donde a través de un aumento progresivo en el sobrepotencial aplicado (positivo o negativo) respecto del potencial de corrosión, se registran las corrientes medidas para el sistema. Para una mayor comprensión del comportamiento, suele invertirse el barrido luego de alcanzar un potencial o corriente determinado [31].

El estudio de estas curvas permite determinar los potenciales característicos del desempeño del material en el electrolito. En la Figura 11 se presenta una curva de polarización típica para un acero inoxidable, susceptible a corrosión por picado. En general, los resultados se grafican en escala semilogarítmica en función de la densidad de corriente.

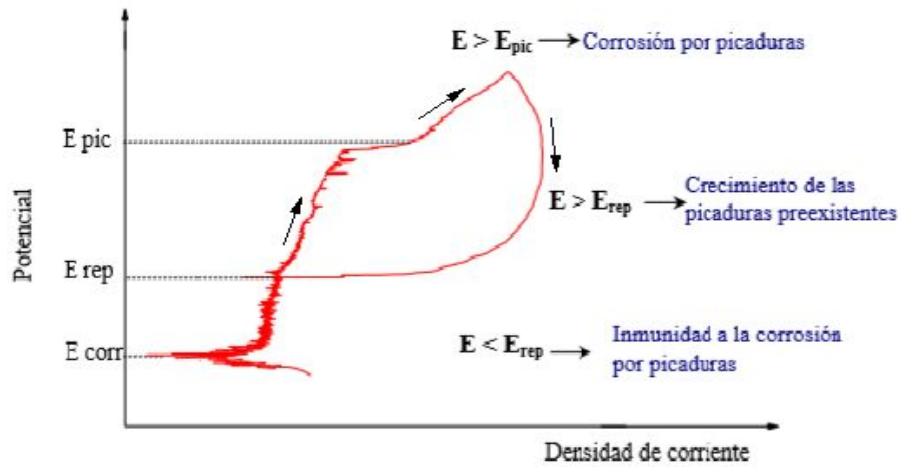


Fig.11. Curva de polarización característica para un acero inoxidable.

Si bien los potenciales aplicados en estos ensayos suelen superar los potenciales a los que estará sometido el material a lo largo de su vida útil, permiten tener una idea general del comportamiento al ser sometido a condiciones extremas.

3. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es obtener recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos por la técnica de sol-gel y funcionalizarlos con partículas de vidrio bioactivo, para ser aplicados mediante *dip-coating* sobre un sustrato de acero inoxidable AISI 316L, para su posible utilización como implantes permanentes no cementados.

Como objetivos particulares se presentan los siguientes aspectos:

- Evaluar una alternativa más económica al precursor orgánico comúnmente utilizado para este tipo de sistemas.
- Caracterizar los vidrios bioactivos utilizados mediante diferentes técnicas.
- Sintetizar un sol híbrido orgánico-inorgánico por el método de sol-gel y luego funcionalizarlo mediante el agregado de partículas de vidrio bioactivo en suspensión.
- Evaluar los parámetros críticos de la técnica de *dip-coating* y seleccionar el más conveniente. Depositar dos capas de recubrimiento por dicha técnica sobre el sustrato elegido, la primera sin partículas y la segunda funcionalizada.
- Realizar el estudio *in vitro* de las muestras a diferentes tiempos de inmersión en solución fisiológica simulada.
- Caracterizar las muestras con y sin inmersión mediante diferentes técnicas.
- Evaluar la capacidad antibacterial del recubrimiento que contiene vidrio dopado con cobre.
- Diseñar un portamuestras para realizar los estudios electroquímicos.
- Llevar a cabo ensayos electroquímicos acelerados para evaluar el efecto de los recubrimientos en la resistencia a la corrosión.

4. Hipótesis de trabajo

Teniendo en cuenta los resultados satisfactorios obtenidos por otros autores para recubrimientos sol-gel TEOS/MTES [6,16,17,25,28,29] con partículas de vidrio bioactivo 45S5 y los estudios sobre biovidrios de sistemas más complejos, se asume que es posible obtener un recubrimiento íntegro, uniforme y libre de defectos, a partir de un sol híbrido TEOS/MTMS funcionalizado con partículas de vidrios bioactivos de diferentes composiciones, de la familia del conocido 13-93. Los recubrimientos presentarán buena adhesión al sustrato metálico, actuarán como barrera efectiva para la liberación de iones potencialmente tóxicos al organismo y desarrollarán bioactividad *in vitro* para favorecer los procesos de osteointegración del implante. De acuerdo con lo reportado en bibliografía, se espera que los recubrimientos con vidrios de base borosilicato presenten una mayor velocidad de disolución en medios fisiológicos simulados respecto del silicato y que en el caso del recubrimiento conteniendo vidrio dopado con cobre, el mismo presente algún grado de actividad antibacteriana.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales de partida

5.1.1. Sustratos metálicos

En este trabajo se utilizó acero inoxidable AISI 316L (Roberto Cordés S.A., Argentina), en concordancia con las normas ISO 5832-1 (Implants for surgery - Metallic materials) y ASTM F138 (Standard Specification for Wrought 18Chromium-14Nickel-2.5Molybdenum Stainless Steel Bar and Wire for Surgical Implants). La composición de dicho material se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2

Composición química del acero inoxidable AISI 316L, dada en valores máximos en % en peso.

C	Mn	Si	Cr	Ni	Mo	P	S	N	Fe
0.03	2.00	0.75	18.00	14.00	3.00	0.045	0.03	0.10	Balance

Las muestras fueron cortadas a partir de una chapa de 1mm de espesor, en forma de rectángulos de 4 x 2cm para los ensayos *in vitro* y cuadrados de 2 x 2cm para los ensayos electroquímicos.

5.1.2. Partículas de vidrio bioactivo

Los vidrios bioactivos empleados en este trabajo fueron obtenidos a través de una colaboración con el Instituto de Biomateriales de la Universidad de Erlangen-Nuremberg (Alemania) y la Universidad Åbo Akademi (Finlandia).

Se utilizaron vidrios de tres composiciones diferentes, dadas en la Tabla 3: un silicato (13-93), un borosilicato (BS) y un borosilicato dopado con Cu (BS-Cu).

Tabla 3

Composiciones nominales de los vidrios dadas en % en peso (% moles).

	Na ₂ O	K ₂ O	MgO	CaO	B ₂ O ₃	P ₂ O ₅	SiO ₂	CuO
13-93	5.5(5.6)	11.1(7.3)	4.6(7.0)	18.5(20.3)	-	3.7(1.6)	56.6(58.1)	-
BS	5.5(6.0)	11.1(7.7)	4.6(7.4)	18.5(21.4)	36.6(34.2)	3.7(1.7)	20(21.6)	-
BS-Cu	5.5(6.0)	11.1(7.7)	4.6(7.5)	15.5(18.2)	36.6(34.5)	3.7(1.7)	20(21.9)	3.0(2.6)

Los vidrios fueron obtenidos utilizando el método de fusión y enfriamiento rápido (*melt-quenching*). Se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico: Na_2CO_3 , K_2CO_3 , MgO , CaCO_3 , H_3BO_3 , $(\text{CaHPO}_4)(2(\text{H}_2\text{O}))$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5(\text{H}_2\text{O})$ y arena de cuarzo.

La fusión se realizó en un crisol de platino a 1360°C para el silicato 13-93 y a 1100°C para los borosilicatos, durante 3 horas. Los vidrios fueron colados, recocidos a 520°C , molidos y tamizados para su caracterización y posterior uso.

5.1.3. Precursores del sol híbrido

Para obtener el sol con características mixtas orgánicas-inorgánicas, se utilizaron dos alcóxidos de silicio.

La parte inorgánica del recubrimiento fue obtenida por el uso de TEOS (tetraetoxisilano también conocido como tetraortosilicato). Luego, para dar lugar al sol híbrido se evaluó una alternativa más económica al precursor orgánico comúnmente utilizado MTES (metiltrietoxisilano) [6,16,23,25,28,29]. Para ello se empleó al MTMS (metiltrimetoxisilano), el cual al igual que el MTES posee un grupo metilo no hidrolizable y se diferencian únicamente por la longitud de sus cadenas carbonadas. En el caso del sol con MTMS, se tuvo especial consideración de que no queden restos de metanol luego del tratamiento térmico (ver apartado 6.3.1.) debido a su posible carácter tóxico.

5.2. Recubrimientos

5.2.1. Preparación de los sustratos

Los sustratos metálicos fueron pulidos con lija al agua de granulometría creciente desde 240 hasta 1000 para obtener un acabado homogéneo en todas las muestras. En cada cambio de lija, la muestra se giró 90° y se controló mediante microscopio óptico de reflexión (Olympus Tokio, Japón) la uniformidad del pulido.

Los sustratos pulidos fueron limpiados y desengrasados antes de ser recubiertos. Para ello, fueron lavados con agua jabonosa, enjuagados con agua destilada y finalmente puestos en alcohol isopropílico durante 15 minutos en ultrasonido.

El alcohol no solo contribuye a la limpieza del sustrato, sino que también provee temporariamente a la superficie metálica de hidróxidos (Me-OH), los cuales favorecen la unión de los grupos silanoles del sol con el metal, a través de puentes de hidrógeno débiles (Figura 12) [22,30].

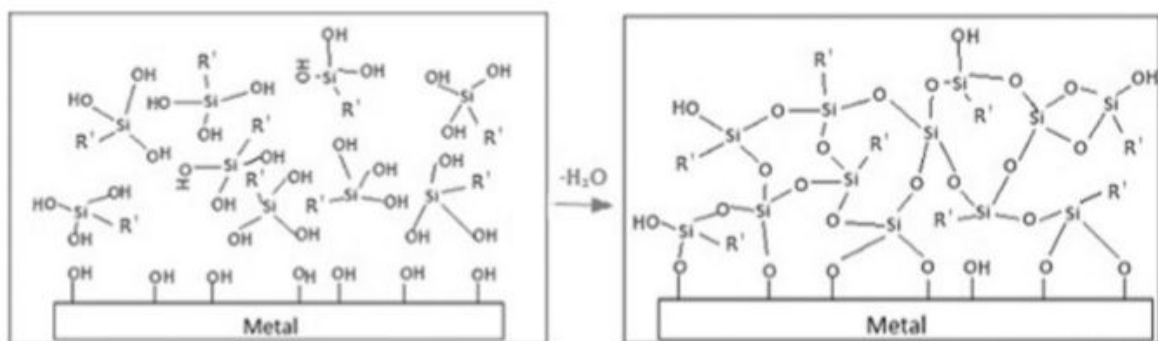


Fig.12. Hidróxidos en la superficie del metal favorecen la unión con los silanoles del sol.

5.2.2. Síntesis del sol híbrido

El sol se obtuvo a partir de los alcóxidos TEOS (98%, Aldrich) y MTMS (98%, Aldrich), en una relación molar 40/60 [6,25,28,29]. La proporción de agua bidestilada utilizada fue $H_2O/TEOS=2$ y $H_2O/MTMS=1.5$ para lograr hidrólisis completa (estequiométrica) [24,27]. La reacción fue catalizada a temperatura ambiente con ácido nítrico concentrado (65%, Cicarelli). Finalmente se añadió etanol anhidro absoluto (Anedra) como solvente para alcanzar la concentración de sílice deseada $[SiO_2]=200g/L$.

Las cantidades necesarias de los reactivos para obtener 100mL de sol están dadas en la Tabla 4.

Tabla 4

Cantidades de reactivos en mL para obtener 100mL de sol híbrido.

TEOS	MTMS	H ₂ O (bidestilada)	HNO ₃ (c)	Et-OH
30.00	30.00	10.20	0.52	29.80

En primer lugar se mezclaron los precursores TEOS y MTMS, manteniendo una agitación vigorosa utilizando un agitador y un buzo magnético. Luego se adicionó el agua y el ácido nítrico concentrado el cual actúa como catalizador acelerando la reacción. Dado que la misma es de carácter exotérmica, al observarse el cambio de apariencia de turbia a transparente, la reacción se detuvo colocando a la mezcla en un recipiente con hielo y manteniendo una agitación suave para homogeneizar la temperatura. Finalmente, se añadió la cantidad indicada de etanol como solvente para lograr la concentración de sílice necesaria. El pH del sol a temperatura ambiente fue controlado con cintas reactivas, obteniendo un valor de 0.5.

El sol fue conservado en heladera y utilizado dentro de las 48 hs siguientes.

5.2.3. Preparación de la suspensión de partículas

Para lograr un sol funcionalizado, se procedió al agregado de partículas de biovidrio en suspensión.

Se añadió un 5% p/p de partículas de vidrio bioactivo al sol y se agitó manualmente durante 5 minutos, seguido de 10 minutos en ultrasonido para mantener a las mismas en suspensión.

Se probó el efecto del agregado del dispersante Tritón X-100 (Aldrich) en concentración 0.1% p/p respecto de las partículas de vidrio, con el objetivo de prolongar el período en el cual la suspensión es estable. Sin embargo, al observar al microscopio óptico sustratos de prueba recubiertos con soles funcionalizados con y sin dispersante, no se observaron mejoras apreciables en la dispersión lograda. Además, se controló el pH luego del agregado de las partículas, resultando entre 1 y 1.5, alejado del punto isoeléctrico de la sílice que es 2. Por lo tanto, se optó por no incorporar dispersantes evitando aumentar el costo del recubrimiento.

De esta forma, las partículas se mantuvieron estables en la suspensión durante al menos 30 minutos, pudiéndose obtener distribuciones homogéneas de partículas en los recubrimientos realizados.

5.2.4. Técnica de Dip-Coating

Los recubrimientos fueron depositados sobre los sustratos mediante la técnica de inmersión-extracción en sentido vertical, conocida como *Dip-Coating*. La unidad de recubrimiento por inmersión (*dip-coater*) consistió en un brazo mecánico al cual es sujeta la muestra, conectado a un controlador (Figura 13). Los parámetros son fijados al comenzar el proceso y luego se repiten en cada ciclo de inmersión.

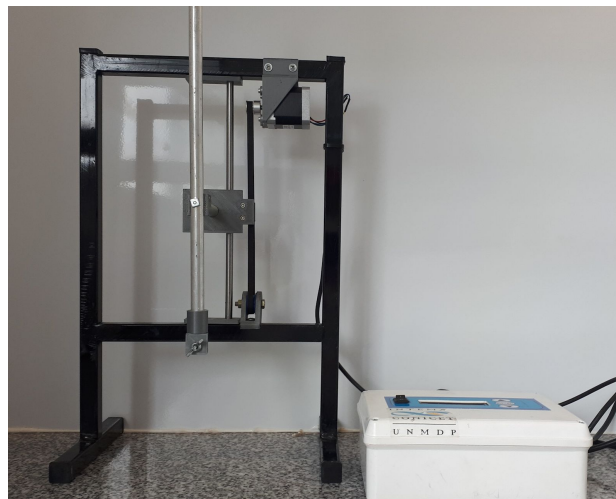


Fig.13. *Dip-coater*.

5.2.4.1 Parámetro crítico

La variable crítica del proceso es la velocidad de extracción de la pieza, ya que la misma debe ser lo suficientemente rápida para obtener los mayores espesores posibles de recubrimiento, pero no demasiado rápida para evitar superar el espesor crítico para el film.

La velocidad crítica será aquella inmediatamente anterior para la cual se comienzan a observar al microscopio fisuras en el recubrimiento, luego de ser tratado térmicamente.

Para determinar la velocidad crítica de extracción, asociada al espesor crítico del sistema, se hizo una prueba sobre vidrios portaobjetos a distintas velocidades de extracción entre 5 y 40 cm/min, variando 5 cm/min cada una.

De esta manera, se determinó la velocidad de extracción a utilizar en 10 cm/min tanto para el sol sin partículas como para el sol cargado.

5.2.4.2. Sistemas estudiados

Se realizaron cuatro tipos de recubrimientos sobre el acero inoxidable, para comparar con el metal desnudo. En la Tabla 5 se presenta un resumen indicando la nomenclatura utilizada en cada caso.

Tabla 5

Nomenclatura de las condiciones estudiadas.

	SS (acero inoxidable)	TM	13-93	BS	BS-Cu
1° capa	-	TEOS/MTMS	TEOS/MTMS	TEOS/MTMS	TEOS/MTMS
2° capa	-	-	TEOS/MTMS + 13-93	TEOS/MTMS + BS	TEOS/MTMS + BS-Cu

Los recubrimientos se depositaron por *dip-coating* a temperatura ambiente y en aire. El sol empleado presentó una viscosidad similar a la del agua (1 cP) y resultó completamente transparente.

Cada sustrato previamente desengrasado fue sujetado a la unidad de recubrimiento para la inmersión en el sol y su posterior extracción a la velocidad determinada.

Las muestras, luego de cada capa, se dejaron secar tapadas durante 24 horas [24] para eliminar el solvente y después fueron sometidas a un tratamiento térmico de consolidación.

5.2.5. Tratamiento térmico

Mediante un tratamiento térmico se eliminaron restos de solvente y agua que pudieron haber quedado luego del secado, y se alcanzó el mayor grado de policondensación del sol para obtener una capa densa y consolidada. Como consecuencia de los procesos de secado y tratamiento térmico, se forman uniones covalentes fuertes de tipo metalo-siloxano, logrando una buena adherencia del recubrimiento al sustrato.

El tratamiento térmico se llevó a cabo en horno eléctrico (Indef modelo 273, Argentina) en atmósfera de aire. La rampa de calentamiento fue de 5°C/min para evitar fisurar el film hasta

llegar a 450°C, se mantuvo durante 30 minutos y luego se enfrió dentro del horno hasta alcanzar temperatura ambiente [6,28,29].

5.3. Ensayos *In Vitro*

El estudio *in vitro* de los sustratos recubiertos en solución fisiológica simulada (SBF) permitió evaluar el comportamiento de las muestras en un entorno que simula la temperatura, el pH y la concentración de los iones inorgánicos presentes en el plasma sanguíneo (Tabla 6). Luego de la inmersión, se realizó espectroscopía FTIR y microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar si existen zonas con evidente nucleación de hidroxiapatita carbonatada (HCA), lo cual es considerado como un primer indicador de bioactividad en el recubrimiento.

Tabla 6

Concentración de iones en plasma sanguíneo humano y en SBF, dado en mM.

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻
Plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	27.0	1.0

5.3.1. Preparación de SBF

Para preparar la solución se usó agua destilada como solvente, a la cual se le adicionaron 0.5ml de ácido clorhídrico concentrado para facilitar la disolución. Luego se pesaron en una balanza analítica (Shimadzu, Japón) y se agregaron los reactivos de grado analítico en el orden y las cantidades indicadas en la Tabla 7. Finalmente, el pH se ajustó hasta 7.3 ± 0.05 agregando gotas de ácido concentrado.

Una vez obtenida, la solución de SBF se conservó en heladera hasta su uso.

Tabla 7

Cantidades de los reactivos sólidos dados en g, para obtener 1L de SBF.

NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂ ·6H ₂ O	K ₂ HPO ₄	NaHCO ₃	TRIS*
8.053	0.224	0.278	0.305	0.174	0.353	6.057

*tris(hidroximetil)aminometano

5.3.2. Inmersión en SBF

Los ensayos de inmersión se realizaron por duplicado con muestras de 4 x 2cm para cada una de las cinco condiciones.

Cada muestra se colocó en forma vertical en un recipiente plástico con aproximadamente 85mL de SBF, se tapó y se mantuvo en estufa a 37°C durante 1, 3, 7 y 14 días de inmersión, recambiando la solución cada 3 días.

Una vez transcurrido el tiempo indicado, las muestras fueron retiradas de la solución y se dejaron secar en aire (sin enjuague previo) para luego ser cuidadosamente guardadas hasta su caracterización.

5.4. Caracterización de los materiales de partida y las muestras

5.4.1. Microestructura del acero inoxidable AISI 316L

Con el fin de revelar la microestructura del acero inoxidable austenítico utilizado, se prepararon los reactivos de ataque Vilella y Gliceregia, según lo recomendado en la norma ASTM E407-99 (Standard Practice for Microetching Metals and Alloys).

En un matraz, se añadieron los elementos en el orden y cantidades indicados (ver Tablas 8 y 9) y se procedió a agitar manualmente hasta obtener una solución de color amarillo para el Vilella y anaranjado para el Gliceregia, como se observa en la Figura 14.

Se sumergió cada pieza previamente pulida hasta granulometría 1000 durante aproximadamente 30 segundos en el reactivo correspondiente, se enjuagó con abundante agua destilada y luego se secó con etanol y flujo de aire caliente.

Tabla 8

Compuestos para la preparación del revelador metalográfico Vilella.

Reactivo Vilella			
Compuesto	Ácido clorhídrico (35%)	Ácido pícrico	Etanol (96%)
Cantidad	20mL	1g	100 mL

Tabla 9

Compuestos para la preparación del revelador metalográfico Gliceregia.

Reactivo Gliceregia				
Compuesto	Ácido acético	Ácido clorhídrico (35%)	Ácido nítrico (65%)	Glicerina
Cantidad	10mL	15mL	10mL	2 gotas

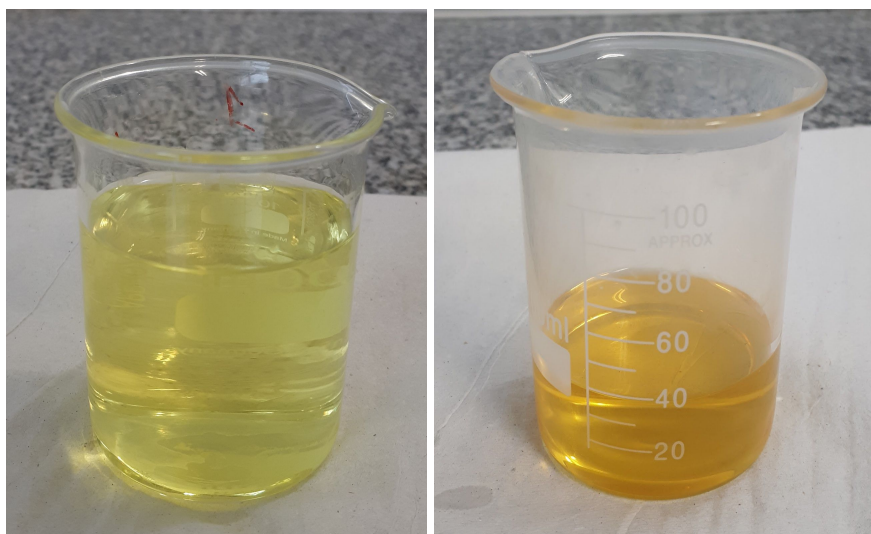


Fig.14. Reactivos de ataque Vilella (izq.) y Glicerregia (der.).

5.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (MAS NMR)

Los estudios por resonancia magnética nuclear fueron realizados en el Instituto de Biomateriales de la Universidad de Erlangen-Nuremberg (Alemania) en un equipo VNMRS-300 MHz (Varian, EE.UU.) y sus resultados fueron procesados e interpretados en el presente trabajo.

Se caracterizó la estructura local de los silicatos y borosilicatos a través de las especies Si, P y B mediante resonancia magnética nuclear de giro al ángulo mágico, dado que los núcleos atómicos resuenan a una frecuencia directamente proporcional a la fuerza del campo magnético ejercido. Se obtuvieron los espectros ^{29}Si a una velocidad de giro (*spinning speed*) de 4kHz en ppm respecto del TMS (tetrametilsilano), ^{31}P a 8kHz en ppm respecto del H_3PO_4 (ácido fosfórico) y ^{11}B a 10kHz en ppm respecto del H_3BO_3 (ácido bórico).

5.4.3. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS)

Los polvos de los tres tipos de vidrios utilizados fueron analizados por espectrofotometría UV-VIS, para la cual se formó una pastilla comprimiendo el polvo en el portamuestras. Se empleó un espectrofotómetro modelo UV-3600 Plus (Shimadzu, Japón). El espectro fue recogido en modo reflectancia difusa (DRS) en el rango de longitudes de onda comprendido entre 300 y 1000nm (UV-VIS-NIR), tomando como referencia polvo de sulfato de bario.

5.4.4. Perfilometría

Se realizaron mediciones de la rugosidad sobre muestras de acero inoxidable desnudo (SS), con una capa vítrea (TM) y con doble recubrimiento (13-93). Una de las mediciones se

realizó en sentido perpendicular a las líneas de pulido para evaluar el cambio en la rugosidad superficial al depositar la capa por sol-gel, y la otra se realizó perpendicular al borde de mojado de las capas con el sol, para tratar de estimar su espesor.

El equipo empleado fue el rugosímetro Surtronic 3+ de la marca Taylor-Hobson, con una aproximación de $0.01\mu\text{m}$. Se realizó un barrido lineal de 4mm de longitud, tomando 8000 puntos.

5.4.5. Tape Test

La adhesión del recubrimiento al sustrato debe ser muy buena para evitar la falla del conjunto. Para determinar de manera cualitativa qué tan óptima resulta esa adhesión, se utilizaron los lineamientos propuestos en la norma ASTM D3359-09 (Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test) y en particular se aplicó el Método B, recomendado para películas con espesores menores a $125\mu\text{m}$.

El procedimiento consistió en realizar un patrón cuadrulado de seis líneas en cada sentido, con un espaciado de 1mm entre ellas (Figura 15). Luego se aplicó por encima un trozo de cinta adhesiva marca Doble A (código C903) y se retiró tirando rápidamente de ella, formando un ángulo de 60° respecto del sustrato.

La clasificación de la adhesión se realizó observando la superficie del recubrimiento con un microscopio óptico y comparando con los resultados detallados en la norma.

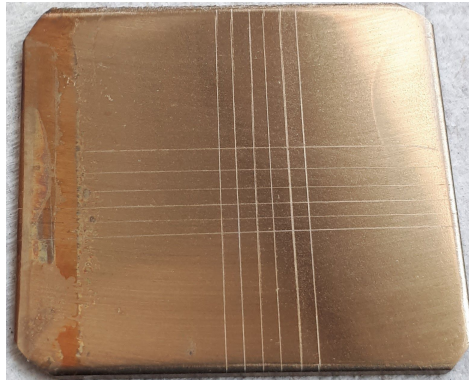


Fig.15. Patrón para Tape Test método B.

5.4.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Esta técnica de caracterización superficial permitió obtener imágenes de alta resolución y magnificación de las muestras con y sin inmersión en SBF. Se buscó determinar la posible presencia de defectos y fisuras en el recubrimiento, y de fosfatos de calcio que puedan indicar bioactividad luego de la inmersión en SBF.

Las imágenes de los polvos de vidrio bioactivo fueron tomadas en el Instituto de Biomateriales de la Universidad de Erlangen-Nuremberg (Alemania) con un SEM marca Leo 1530 (Zeiss, Alemania) utilizando un voltaje de 1kV.

El análisis de las muestras obtenidas por sol-gel con y sin inmersión en SBF fue realizado con el microscopio electrónico JSM-6460LV (Jeol, Japón) utilizando 15kV.

En todos los casos, las muestras debieron ser metalizadas con una capa de oro-paladio para obtener una superficie conductora.

5.4.7. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Se utilizó la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) para caracterizar los biovidrios y las muestras de las cinco condiciones a tiempo cero (sin inmersión), y luego de inmersión en una solución fisiológica simulada, en este caso SBF (*Simulated Body Fluid*, ver sección 4.5. Ensayos *In Vitro*). El barrido se realizó entre 400 y 4000 cm^{-1} en el espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EE.UU.).

5.5. Ensayo de actividad antibacterial

Para determinar si los recubrimientos funcionalizados con vidrios conteniendo cobre son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, se utilizó el método de difusión en agar (método Kirby-Bauer). Este test cualitativo es aplicable a cualquier tipo de microorganismo excepto aquellos de crecimiento lento o anaeróbicos. El ensayo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB - Conicet) de Mar del Plata.

Se realizó un cultivo de *Escherichia Coli* (K12 cepa RP437) durante 18 horas a 37°C en caldo nutritivo de Lisogenia (medio LB) y se diluyó en una proporción de 1/100 para ser dispersado en placas de agar conteniendo 1% p/p de triptona, 0.5% p/p de extracto de levadura, 0.5% p/p de cloruro de sodio y 1.1% p/p de agar. Las muestras en duplicado de 2 x 1cm de acero inoxidable AISI 316L con y sin doble recubrimiento se colocaron en la superficie rica en agar de las placas y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

5.6. Ensayos electroquímicos

Con el objetivo de evaluar cómo el recubrimiento afecta el comportamiento a la corrosión del acero inoxidable, se llevaron a cabo ensayos acelerados en la unidad electroquímica Gamry Instruments Reference 600 (Figura 16).



Reference 600™
Potentiostat/Galvanostat/ZRA
Operator's Manual

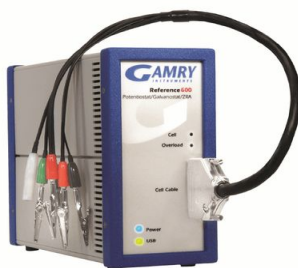


Fig.16. Unidad electroquímica utilizada.

Cada condición se estudió por cuadruplicado con muestras de 2 x 2cm, luego de 1 día (para estabilizar el potencial de corrosión) y de 14 días de inmersión en SBF. Durante ese tiempo las muestras se mantuvieron en estufa a 37°C y se recambió la solución cada 3 días.

La celda diseñada para las mediciones consistió en un vaso de vidrio en el cual se colocó SBF, y una tapa fabricada de polioximetileno por la cual se ingresaron los electrodos. Como electrodo de trabajo se utilizó la muestra bajo estudio, colocada dentro de un portamuestras también de polioximetileno con un área expuesta de 0.95cm² (Figura 17), cuyos planos constructivos se presentan en el Anexo. Se emplearon además un electrodo de referencia de Calomel Saturado (SCE) y un contraelectrodo de platino.

La celda se mantuvo a 37°C durante todos los ensayos, mediante un baño termostatzado (Vicking 4100, Argentina).

Previo a cada ensayo electroquímico, se midió el potencial a circuito abierto de la muestra durante 1500s, para asegurar que el mismo estuviera estable al momento de comenzar la secuencia de ensayos.



Fig.17. Detalle del portamuestras diseñado.

5.6.1. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

Se realizó un barrido de frecuencias entre 20kHz y 0.05Hz, modulando el potencial $\pm 15\text{mV}$ respecto del potencial de corrosión medido a circuito abierto (OCP) para obtener los valores de la impedancia del sistema. Luego, los resultados obtenidos se modelaron con circuitos eléctricos equivalentes utilizando el software Zview.

5.6.2. Curvas de polarización potenciodinámicas

Se obtuvo la curva de polarización potenciodinámica para cada muestra, partiendo 0.15V por debajo del potencial de corrosión medido a circuito abierto (curva catódica) y alcanzando 1.3V respecto del electrodo de referencia (curva anódica). Luego, el barrido de potenciales se invirtió al alcanzar el potencial máximo fijado o cuando la densidad de corriente superó 1mA, para completar la curva cíclica. La velocidad de barrido fue de 2mV/s.

6. Resultados y discusión

6.1. Caracterización de los biovidrios

6.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y distribución de tamaño de partículas

Las imágenes SEM de los polvos de vidrios bioactivos utilizados en este trabajo junto con los histogramas correspondientes a la distribución de partículas de cada uno son presentados en las Figuras 18 y 19.

Los SEM fueron procesados con el software de análisis de imágenes ImageJ, tomando un total de 200 partículas. Para cada una, se midió el tamaño en dos direcciones y se calculó el promedio. A partir de los resultados se generó el histograma correspondiente para cada vidrio, utilizando el software OriginPro 8.5.

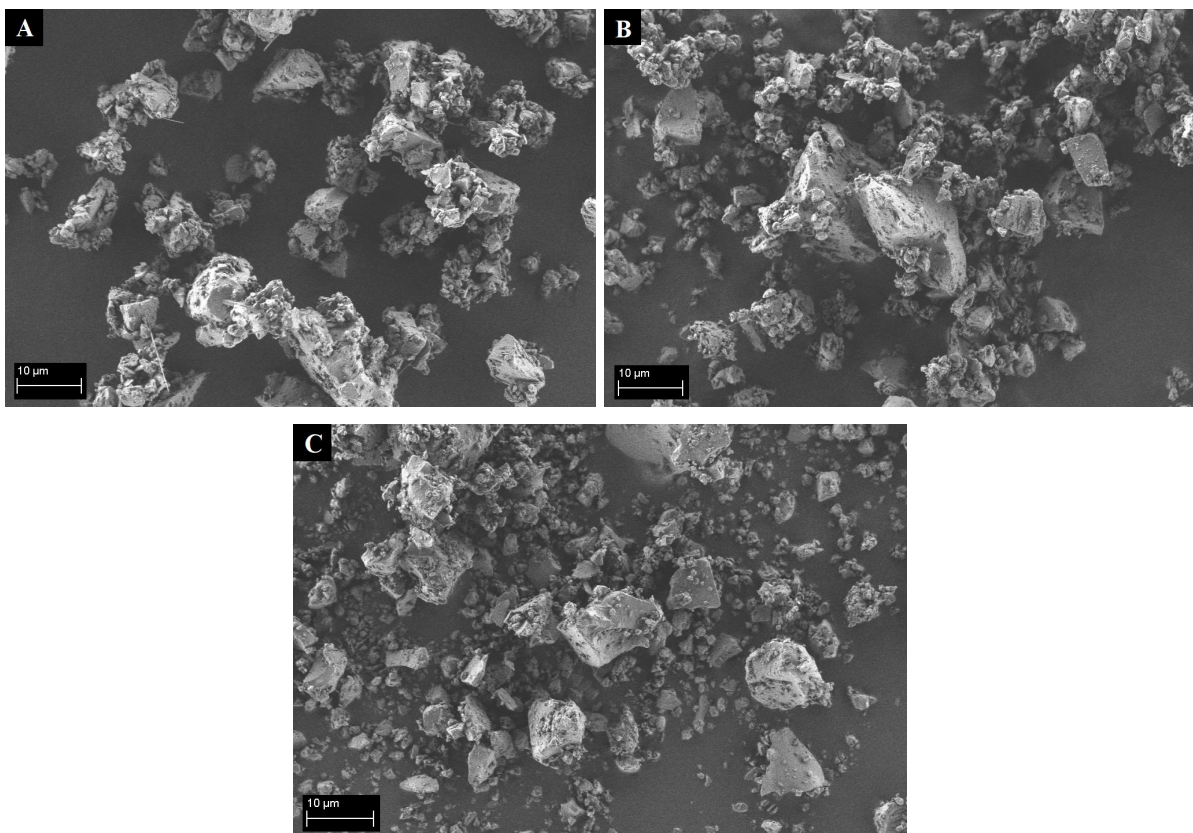


Fig.18. Imágenes SEM de los vidrios bioactivos a 3000x: A) 13-93, B) BS y C) BS-Cu.

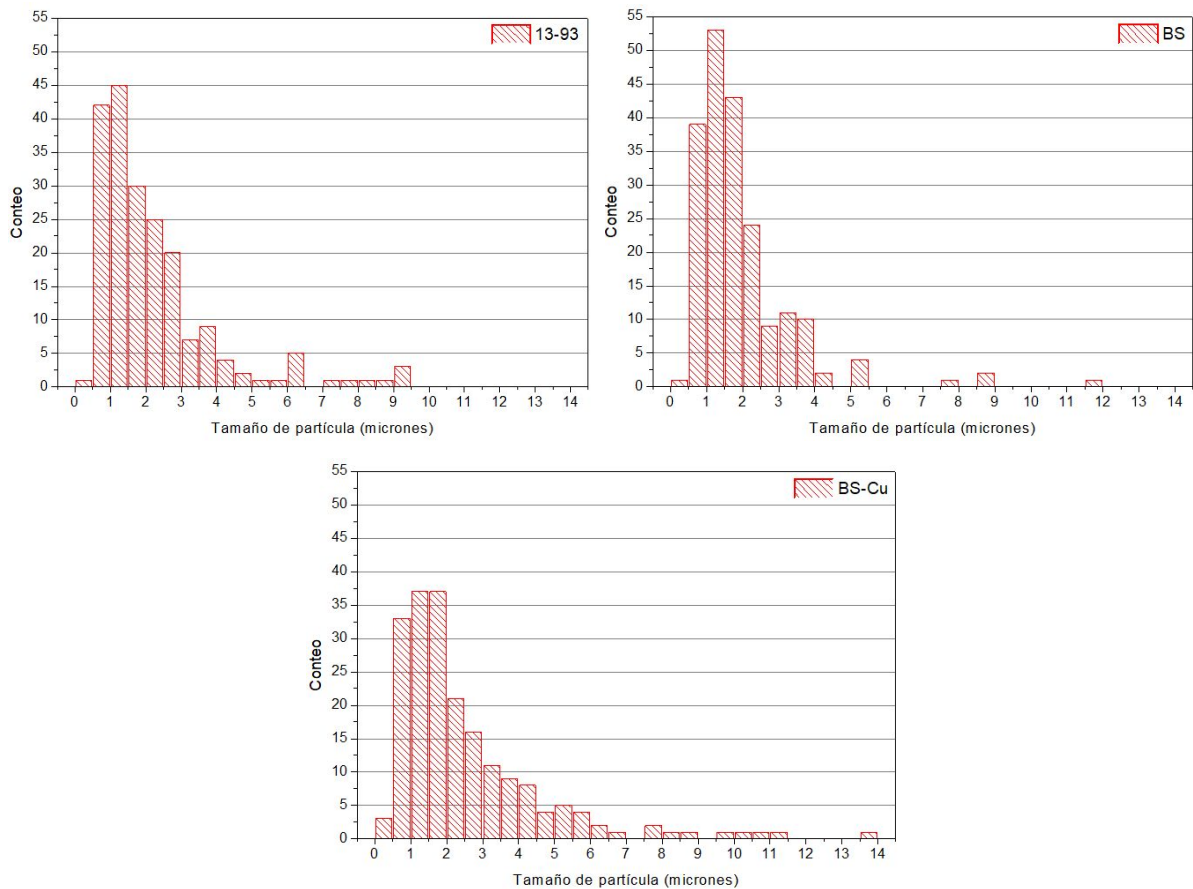


Fig.19. Histogramas de distribución de tamaño de partículas para los vidrios 13-93, BS y BS-Cu.

De la Figura 18 puede observarse que existe una distribución de tamaño de partículas y que las mismas presentan formas irregulares, consecuencia del proceso de molienda.

A través de los histogramas presentados en la Figura 19, se determina que la mayoría de las partículas tienen tamaños que varían entre 0.5 y $2.5\mu\text{m}$, pero que a su vez existen algunas con tamaños incluso superiores a $8\mu\text{m}$. Esta distribución de tamaños de partícula tipo logarítmica normal es característica de los procesos de molienda donde se reduce el tamaño de las partículas más gruesas y por ende aumenta la cantidad de finos, generando que la distribución permanezca sesgada hacia tamaños grandes.

De acuerdo con la norma ISO 13322-1 (Particle Size Analysis - Image Analysis Methods), la forma correcta de representar en valores numéricos una distribución de tamaño de partículas no es a través de un único valor (como la media aritmética), sino utilizando un conjunto de valores representativos. De esta manera, se determinaron como especificaciones para los vidrios los diámetros D_{10} , D_{50} , D_{90} y W , donde D_x indica que el $X\%$ de la distribución posee el tamaño indicado o es menor, y W representa el ancho de la distribución, calculado como $(D_{90}-D_{10})/D_{50}$. En la Tabla 10 se presentan los parámetros para los tres vidrios analizados.

Tabla 10

Especificaciones de la distribución de tamaño de partículas para cada vidrio.

Vidrio	D ₁₀ (μm)	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)	W
13-93	0.47	1.43	3.72	2.27
BS	0.49	1.33	3.23	2.06
BS-Cu	0.50	1.62	4.88	2.70

En comparación, el vidrio BS-Cu es el que presenta partículas de mayor tamaño, alcanzando valores de hasta 14μm, lo cual a su vez se refleja en una distribución más ancha (mayor W). Esto debe tenerse en cuenta ya que es probable que por su peso esas partículas no queden en el recubrimiento al ser depositadas por *dip-coating* de manera vertical, y solo queden adheridas partículas más pequeñas.

Las distribuciones para los vidrios 13-93 y BS resultan similares, variando ligeramente los parámetros entre ellas.

La distribución de tamaños encontrada resulta conveniente ya que se busca una disolución de partículas controlada en el tiempo, lo cual se logra con partículas de diferentes tamaños. Esto es muy importante sobre todo para el sistema BS-Cu de forma de evitar superar el nivel crítico de Cu²⁺ para la supervivencia de los fibroblastos (10 mg/L) [8], al disolverse la partícula en el medio fisiológico.

Si bien las partículas más grandes son las que tienen mayor probabilidad de superar localmente el espesor crítico de las capas por sol-gel dando lugar a fisuras que permitan su liberación, serán las que tarden más tiempo en disolverse completamente en el medio. Por su parte, las partículas más pequeñas se disolverán más rápido una vez liberadas de la capa de recubrimiento introduciendo iones terapéuticos al sistema (ver imágenes de las partículas en el recubrimiento en la Sección 6.4.1.).

6.1.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

La espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, en modo reflectancia total atenuada, fue utilizada para identificar los grupos funcionales presentes en los distintos vidrios utilizados (Figura 20). En la Tabla 11 se presentan las asignaciones a los picos del espectro y la referencia bibliográfica correspondiente.

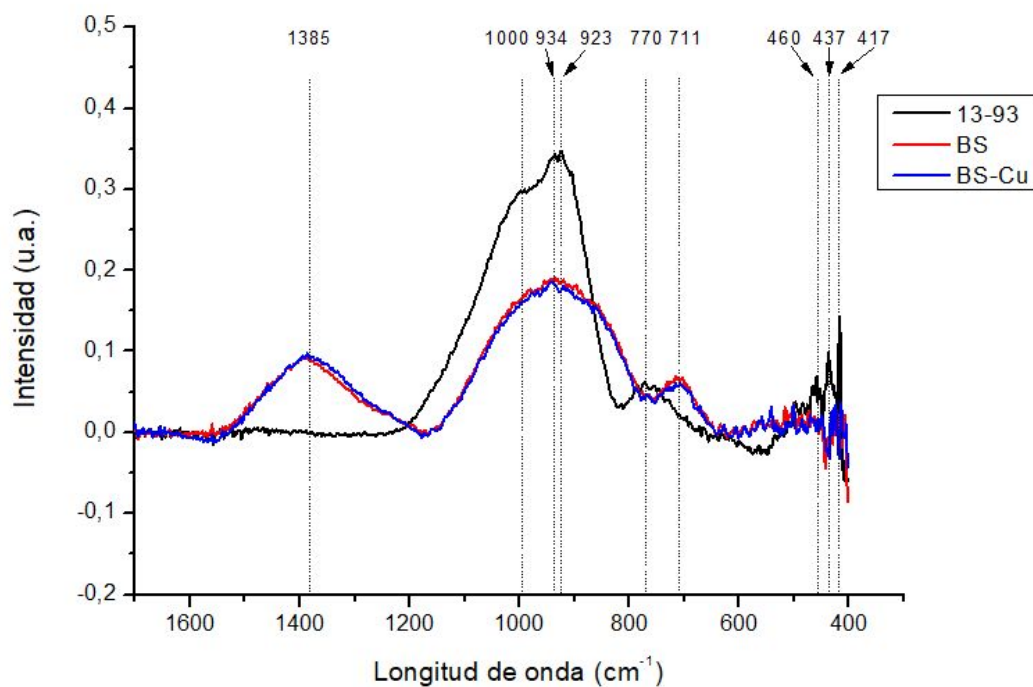


Fig.20. Espectros FTIR-ATR de los biovidrios utilizados.

Tabla 11

Asignación de los grupos funcionales del espectro para los biovidrios.

Pico (cm ⁻¹)	Asignación	Vidrio	Referencia
1385	B-O (BO ₃)	BS y BS-Cu	[8]
1000	Si-O-Si	13-93	[8,33]
934	B-O (BO ₄) y Si-O-Si	13-93, BS y BS-Cu	[8,33]
923	Si-O _{NB}	13-93	[8,33,34]
770	Si-O	13-93	[8,13]
711	B-O (BO ₄)	BS y BS-Cu	[8]
460	Si-O-Si	13-93	[8,13]
437	Si-O-Si	13-93	[8,13]
417	Si-O-Si	13-93	[8,13]

Los espectros de los tres tipos de vidrios se presentan superpuestos para facilitar la distinción de los picos presentes en cada uno. En el caso del vidrio de silicato 13-93, se identificaron todos los picos generados por los enlaces del tetraedro SiO₄. Para los

borosilicatos, las señales son producto tanto de los SiO_4 que se encuentran presentes en menor proporción respecto del 13-93, como de los BO_3 y BO_4 . No se observan diferencias apreciables entre los espectros del BS y del BS-Cu, presumiblemente por la baja cantidad en la que se encuentra el dopante en la estructura (3% p/p).

6.1.3. Resonancia Magnética Nuclear (MAS NMR)

Los resultados de la espectroscopía por resonancia magnética nuclear de giro al ángulo mágico (RMN-MAS) son presentados en la Figura 21. Se analizaron los elementos formadores de la red de vidrio para los tres casos estudiados, los cuales presentan núcleos activos para la técnica (poseen *spin*): ^{29}Si , ^{31}P y ^{11}B . Como la cantidad de modificadores de red no varía en los biovidrios utilizados, los mismos no fueron analizados. Para el caso del Cu las cantidades de dopante no resultan significativas para ser detectadas por RMN.

En el caso de los silicatos, las unidades estructurales del vidrio son mayormente tetraedros ($_{\text{Si}}\text{Q}$) SiO_4 que se unen entre sí por oxígenos puente. Dependiendo del arreglo que adopten los oxígenos puente (monómeros, dímeros, cadenas, anillos, estructuras tridimensionales, etc) el espectro generado será diferente. Para cada vidrio puede predominar un Q^n por sobre los demás (n varía entre 0 y 4 e indica la cantidad de oxígenos que se unen al silicio), dando una idea general de la estructura del silicato.

Al encontrarse presente el fósforo como formador de red, se espera que existan tetraedros PO_4 en la estructura de los vidrios.

Finalmente, en los borosilicatos las estructuras estarán conformadas tanto por tetraedros SiO_4 como boros tri y tetracoordinados.

Un estudio más exhaustivo de la estructura de los vidrios puede llevarse a cabo a partir de la deconvolución de las señales para cuantificar las especies presentes en cada uno, lo cual excede el objetivo de este trabajo.

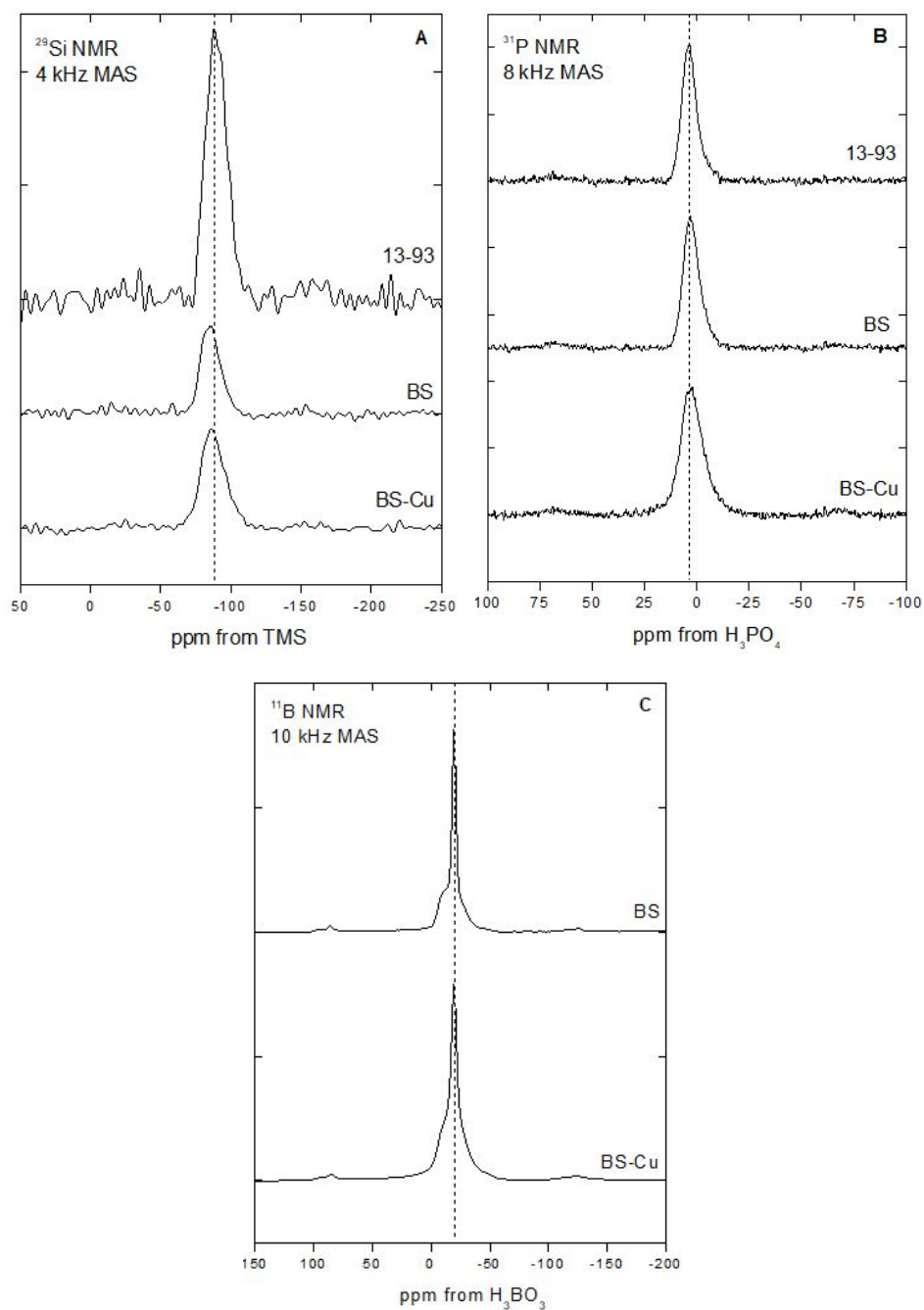


Fig.21. Espectros RMN de los biovidrios para A) ^{29}Si , B) ^{31}P y C) ^{11}B .

Los espectros correspondientes al ^{29}Si (Figura 21.A) presentan un único pico asimétrico en todos los casos. Para el vidrio 13-93, el rango del desplazamiento químico (δ) se ubica entre -72 y -109 ppm respecto al TMS, con un máximo centrado en -88 ppm, indicando que predominan especies $_{\text{Si}}\text{Q}^3$ pero también existen $_{\text{Si}}\text{Q}^4$ y $_{\text{Si}}\text{Q}^2$ en menor cantidad. Para el caso del BS y del BS-Cu, los espectros se encuentran levemente ensanchados, variando entre -67 y -109 ppm respecto al TMS y centrados en el δ de -86 ppm en ambos casos. Este resultado indica que las especies mayoritarias son $_{\text{Si}}\text{Q}^3$ pero también evidencia especies $_{\text{Si}}\text{Q}^4$, $_{\text{Si}}\text{Q}^2$ y $_{\text{Si}}\text{Q}^1$. De acuerdo con la literatura, es común que en los vidrios silicatos se encuentren conectividades menores a 4, dado que los metales alcalinos y alcalino-térreos introducidos

como modificadores de red rompen algunos de los enlaces de los tetraedros, dando lugar a distintas especies de silicatos [34,35].

Los resultados indican que existe más de una especie de silicato, variando en cada una la conectividad de los oxígenos puente presente en el vidrio. Comparando entre los tres tipos de biovidrios, se observa una disminución en la intensidad del espectro de los borosilicatos respecto del silicato, lo cual resulta coherente con la sustitución de parte del SiO_2 por B_2O_3 en la composición del vidrio [36-39].

En la Figura 21.B se observa el espectro para el ^{31}P . El pico exhibido resulta simétrico, variando entre 13 y -10 ppm respecto del H_3PO_4 y presenta un máximo en el desplazamiento químico a 3 ppm. Estos resultados se corresponden con la presencia de pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) en el vidrio [36,40]. Tanto el máximo como el ancho de la señal se mantienen constantes para todos los vidrios, en concordancia con la cantidad de P_2O_5 de la composición química la cual se mantiene invariante.

Para el caso del ^{11}B (Figura 21.C), sólo se compara el BS y el BS-Cu ya que el silicato 13-93 no posee boro en su composición. El ancho de la señal se extiende entre -1 y -40 ppm en ambos vidrios. El máximo del desplazamiento químico está ubicado a -20 ppm respecto del H_3BO_3 y posee un pequeño hombro de menor intensidad a -8 ppm. Estos valores corresponden a unidades BO_4 y BO_3 respectivamente, las cuales coexisten en la estructura y generan una señal parcialmente superpuesta [34]. La presencia de óxidos alcalinos favorece la existencia de estructuras trigonales planas, ya que el ión borato (BO_3^{3-}) forma sales con estos iones metálicos.

El cambio en la intensidad del hombro correspondiente a unidades BO_3 podría deberse a la presencia del cobre en el BS-Cu, aunque no puede ser directamente relacionado mediante esta técnica, sobre todo por las bajas concentraciones en las que se encuentra el dopante.

6.1.4. Espectroscopía UV-VIS (DRS)

Los espectros UV-VIS obtenidos en modo reflectancia difusa (DRS) para los polvos de los biovidrios, se presentan en la Figura 22.

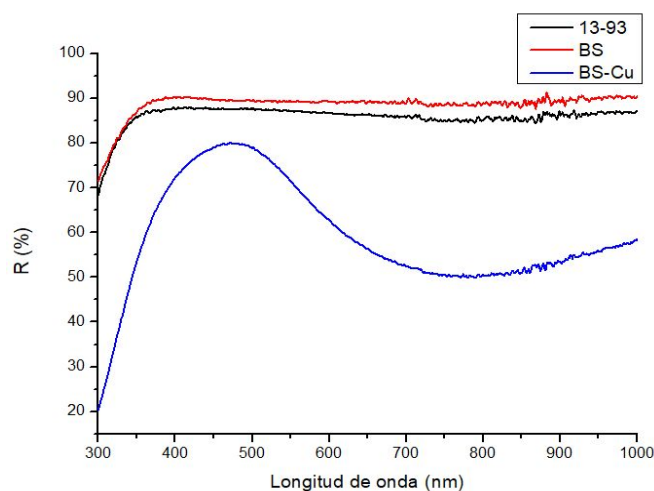


Fig.22. Espectros UV-VIS-NIR para los polvos de los biovidrios.

Para los vidrios 13-93 y BS no existe un máximo en la curva, mostrando un espectro continuo en todo el rango analizado. En cambio, para el BS-Cu se observa una banda ancha y asimétrica de absorción aproximadamente a 800nm, la cual se asigna a la presencia del ión cúprico (Cu^{2+}) en la red de vidrios base silicato, borosilicato y borato [33]. La estructura electrónica del ión Cu^{2+} ($[\text{Ar}]3d^9$) da lugar a centros de color y produce una banda de absorción en la región visible del espectro, formando vidrios de color azul, turquesa o verde, de acuerdo a la cantidad y coordinación en la que se encuentre [33]. De acuerdo con lo reportado en la literatura, el catión actúa predominantemente como modificador de la estructura del vidrio incorporándose con una coordinación octaédrica con distorsión tetragonal, rodeado por dos oxígenos no puente para mantener la electroneutralidad [33,41].

Para el caso del borosilicato, sin embargo, el agregado de óxidos alcalinos modificadores de red hace que el oxígeno se incorpore a la red pasando de BO_3 a BO_4 , disminuyendo así la concentración de oxígenos no puente [9,41]. Por lo tanto, los iones de óxidos modificadores como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , y en particular Cu^{2+} , se sitúan en huecos intersticiales de la red. Si se tienen en cuenta los resultados obtenidos en FTIR y NMR donde no se observan diferencias entre el borosilicato con y sin dopante, puede concluirse que el Cu^{2+} se encuentra libre en la estructura del vidrio, lo cual resulta beneficioso a los efectos antibacteriales.

6.2. Caracterización del sustrato

6.2.1. Microestructura del acero inoxidable AISI 316L

Luego de atacar químicamente con los reactivos Vilella y Gliceregia, las muestras metálicas fueron observadas en un microscopio óptico (Leica, Alemania) a distintos aumentos. Empleando el reactivo Vilella, la microestructura no pudo ser correctamente revelada por lo que sólo se presentan los resultados del ataque con Gliceregia (Figura 23).

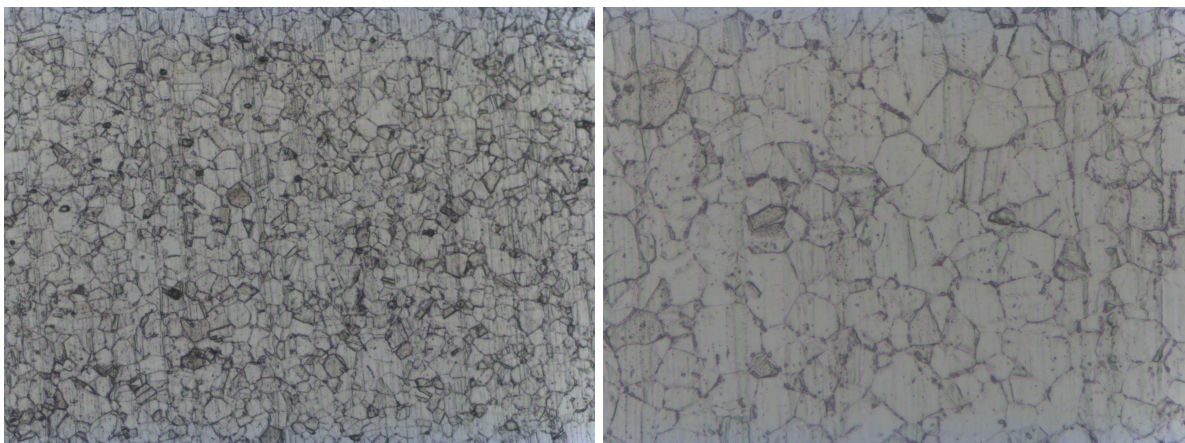


Fig.23. Microestructura del acero inoxidable AISI 316L a 200 y 500x. Reactivo de ataque Gliceregia.

En las metalografías puede observarse claramente una estructura de granos austeníticos equiaxiales, y si bien el contenido inclusionario para este tipo de acero inoxidable es bajo, puede notarse la presencia de algunos óxidos globulares (inclusiones metálicas) según la comparación con la norma ASTM E45-13 (Standard Test Methods For Determining The Inclusion Content Of Steel).

Se observan bandas de maclado (*annealing twins*) características de los aceros inoxidables austeníticos, los cuales poseen una estructura cúbica centrada en las caras (FCC) con baja energía de falla de apilamiento.

6.3. Caracterización del sol híbrido

6.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Para evaluar la viabilidad de la utilización de MTMS en lugar de MTES como precursor orgánico del sol híbrido, se llevó a cabo una caracterización mediante FTIR en modo ATR.

Se buscó determinar que no existen residuos de productos de reacción (metanol para el MTMS) luego del tratamiento térmico, tomando como referencia el espectro del MTES, para el cual se conoce que tratamientos térmicos entre 400 y 500°C resultan suficientes para eliminar el etanol remanente sin afectar los grupos funcionales -CH₃ del sol híbrido [6,25].

En la Figura 24, se observan los espectros FTIR completos obtenidos para los soles TEOS/MTES y TEOS/MTMS depositados sobre sustratos de prueba, y en la Figura 25 se puede apreciar el espectro acotado en la región de interés para caracterizar los grupos funcionales presentes.

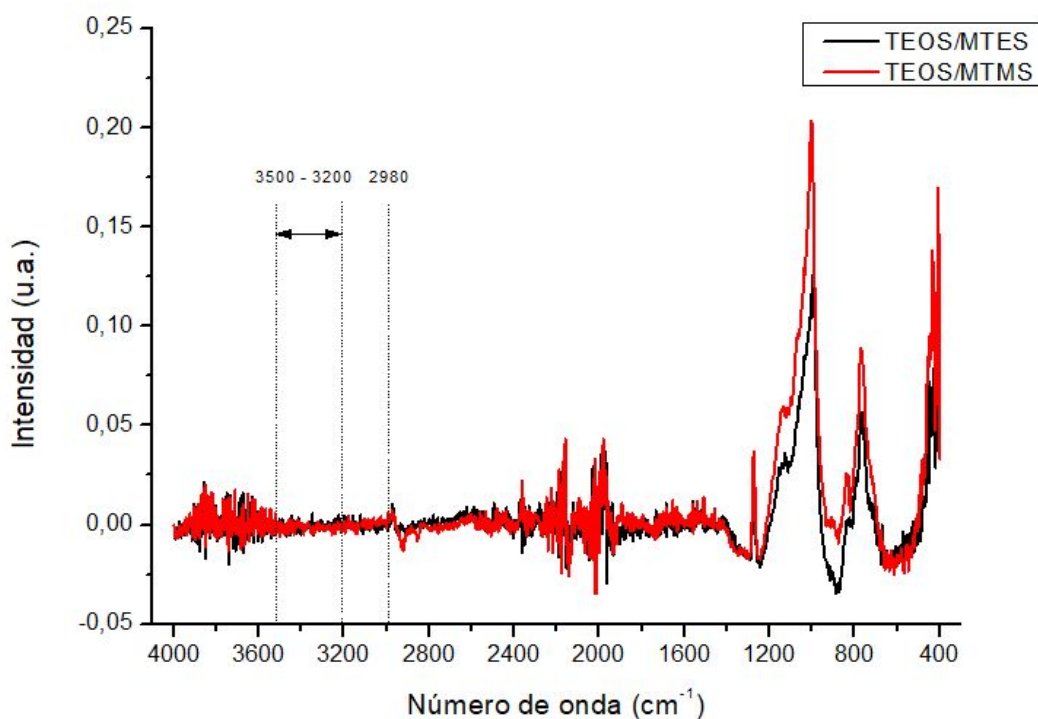


Fig.24. Espectros FTIR-ATR completos de los soles híbridos comparados.

Ambos tipos de alcoholes generados como productos de reacción (etanol y metanol) presentan en su espectro FTIR característico un pico estrecho correspondiente al estiramiento C-O, ubicado en 1055cm^{-1} para el etanol y a 1030cm^{-1} en el caso del metanol. Además, debido al estiramiento C-H, poseen otra señal estrecha de gran intensidad a aproximadamente 2980cm^{-1} y una banda ancha, generada por los puentes de hidrógeno O-H, entre 3200 y 3500cm^{-1} , con un máximo a 3400cm^{-1} [42].

Dado que los picos a 1030cm^{-1} y a 1055cm^{-1} quedarían enmascarados por las señales correspondientes a los enlaces Si-O-Si de los soles, se buscó la presencia de la banda ancha a grandes longitudes de onda o la señal generada por el enlace C-H.

Al no haber indicio de la presencia de enlaces O-H ni C-H como puede verse en la Figura 24, se llega a la conclusión de que luego del tratamiento térmico, no existen residuos de etanol ni de metanol. Esto permite utilizar al MTMS como precursor para dar lugar al sol híbrido, sin generar posibles efectos adversos sobre la salud.

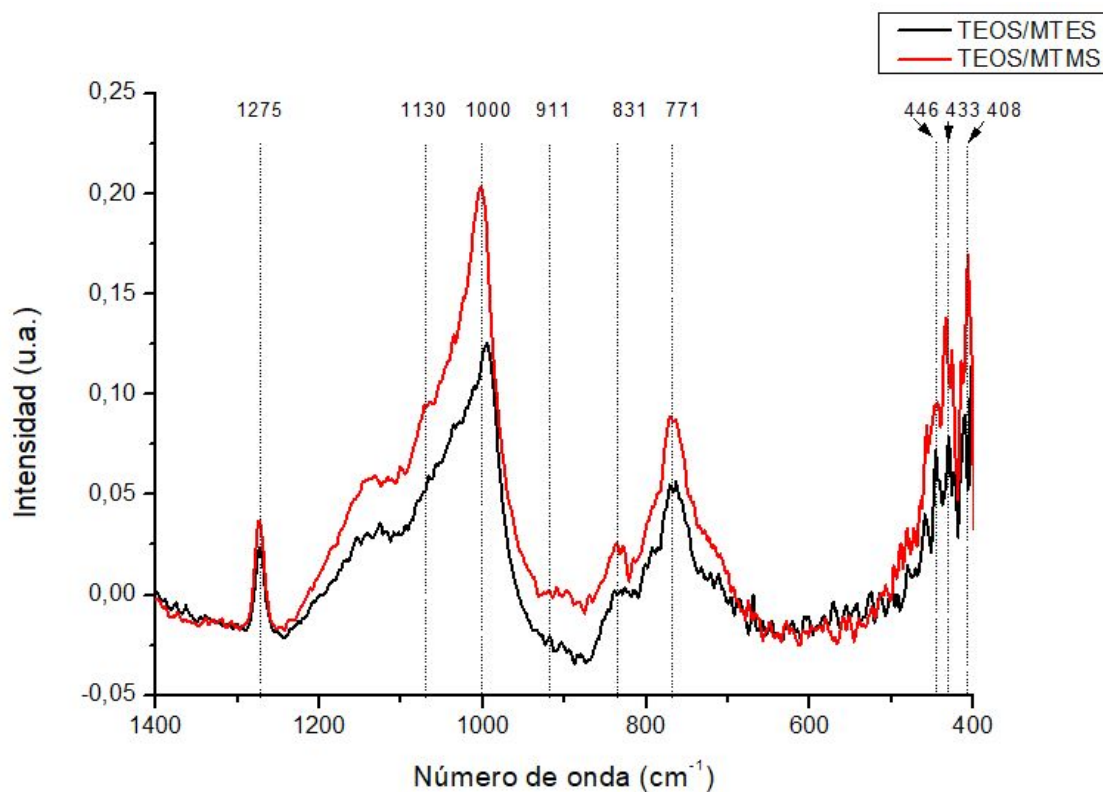


Fig.25. Espectros FTIR-ATR de los soles híbridos.

En la Figura 25 se presentan los espectros en la región comprendida entre 400 y 1400cm⁻¹ de los soles TEOS/MTES y TEOS/MTMS. Se observa claramente que no existen grandes diferencias ni en la ubicación ni en la cantidad de picos característicos en ambos casos.

En la Tabla 12 se presenta la asignación de los mismos, de acuerdo con la bibliografía disponible.

Tabla 12

Asignación de los grupos funcionales del espectro para los soles híbridos.

Pico (cm ⁻¹)	Asignación	Referencia
1275	Si-CH ₃	[25,43,44,45]
1130	Si-O-Si	[25,44,45,46]
1000	Si-O-Si	[8,44]
911	Si-OH	[25,44,45]
831	Si-C	[44,45]
771	Si-O	[44,45,46]
446	Si-O-Si	[25,36,39]

433	Si-O-Si	[25,36,39]
408	Si-O-Si	[25,36,39]

6.4. Caracterización de las muestras con y sin inmersión en SBF

6.4.1. Perfilometría

Los resultados de los parámetros de rugosidad Ra (valor medio de la rugosidad) y Rz (profundidad de rugosidad media) para el sustrato de acero inoxidable desnudo y con una capa de recubrimiento (sin inmersión) se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Parámetros de rugosidad medidos para las muestras SS y TM.

Muestra	Ra (μm)	Rz (μm)
SS	0.046 ± 0.002	0.27 ± 0.02
SS + TEOS/MTMS (TM)	0.023 ± 0.002	0.21 ± 0.02

En el caso del acero inoxidable, la rugosidad superficial medida se corresponde con los picos y valles generados en el proceso de pulido. Los parámetros de la muestra con una capa de recubrimiento son ligeramente menores que en el metal desnudo ya que la película depositada cubre de forma homogénea toda la superficie, suavizando la rugosidad del sustrato.

Por otro lado, se intentó hacer una estimación del espesor del film utilizando la misma técnica. Para ello se trazaron los ajustes lineales de la medición antes y después de la gota generada por *dip-coating* (salto en el perfil) y se restó la diferencia de altura en micrones. En la Figura 26 se presenta el resultado de una de las mediciones realizadas.

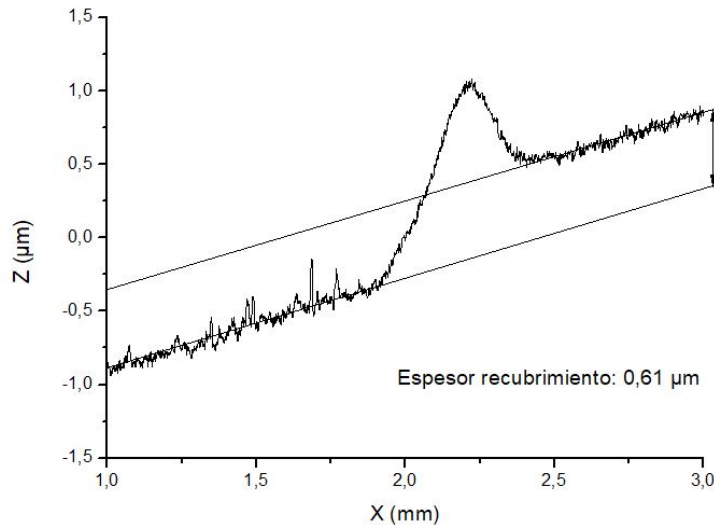


Fig.26. Estimación del espesor del recubrimiento sin partículas por sol-gel.

Se obtuvo entonces que en promedio el espesor de las capas sin partículas es de aproximadamente $0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$, lo cual coincide con lo esperado para recubrimientos sol-gel [47]. Se estima que los sistemas con doble capa tendrán espesores finales menores a $2 \mu\text{m}$ aunque la medición se dificulta por la presencia de las partículas de vidrio.

6.4.2. Tape Test

Luego de realizar el ensayo de adhesión, las superficies de los recubrimientos fueron inspeccionadas con el microscopio óptico en busca de zonas que pudieran presentar desprendimiento del recubrimiento o rotura del mismo.

En la Figura 27 puede observarse que los recubrimientos se encuentran en perfecto estado luego del ensayo y no hay daño visible alrededor del patrón. De acuerdo con la norma, se determina cualitativamente que los recubrimientos son clase 5B ya que no existe área removida producto del despegue de la cinta. Se concluye entonces que la adhesión entre el recubrimiento y el sustrato, y entre ambas capas de recubrimiento es óptima.

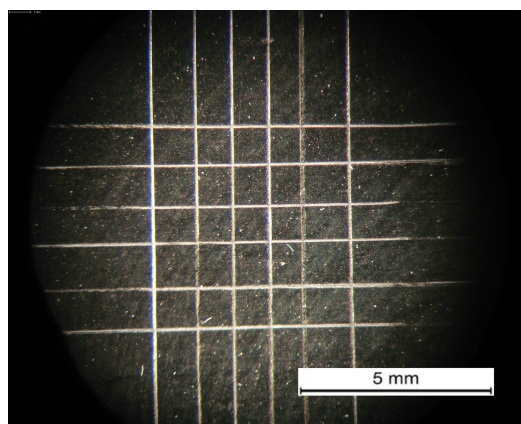


Fig.27. Superficie de la muestra luego del ensayo de adhesión (34x).

6.4.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

A continuación se presentan las imágenes tomadas mediante microscopía electrónica para las muestras TM, 13-93, BS y BS-Cu sin inmersión y luego de 14 días de inmersión en SBF.

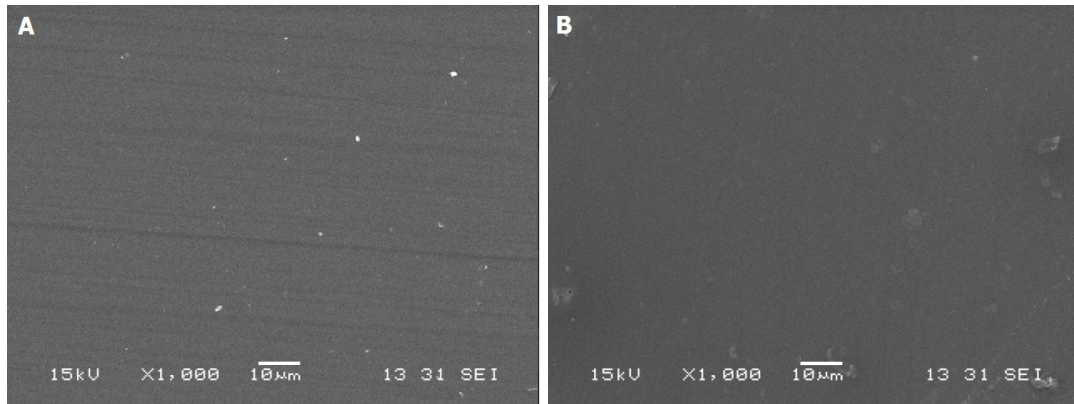
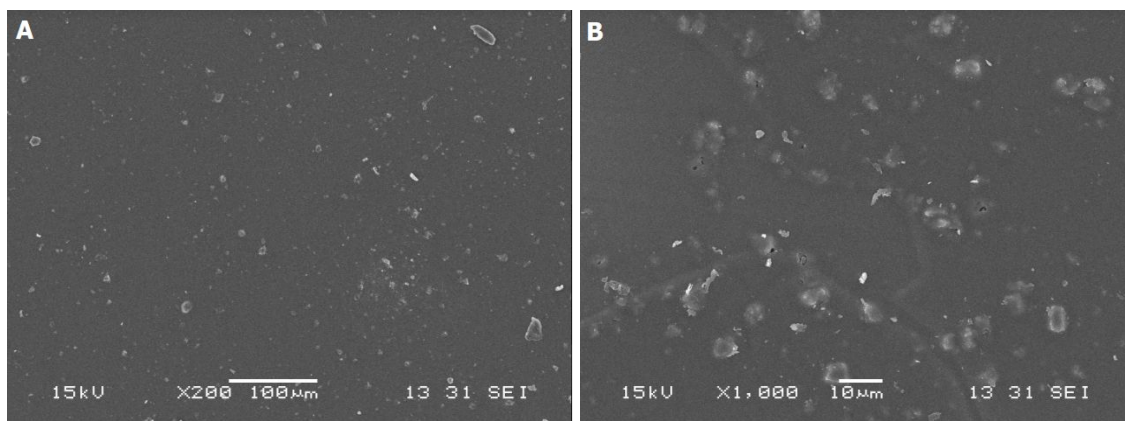


Fig.28. Imagen SEM a 1000x del recubrimiento monocapa TM: A) Sin inmersión y B) 14 días de inmersión.

En la Figura 28 se observan las imágenes SEM correspondientes al sistema TM. En la muestra sin inmersión, se observa un recubrimiento íntegro sin presencia de fisuras ni defectos, lo cual permite comprobar que no se superó el espesor crítico y que además el tratamiento térmico fue el adecuado para lograr la densificación sin inducir fallas en el film.

Para el mismo recubrimiento con 14 días de inmersión en SBF no se observan cambios apreciables sobre la superficie, excepto algunos depósitos de sales producto de que las muestras no fueron enjuagadas luego de ser retiradas de inmersión. Esto indica que el recubrimiento, si bien pudo sufrir degradación, sigue manteniendo la protección del sustrato al no observarse roturas del mismo.



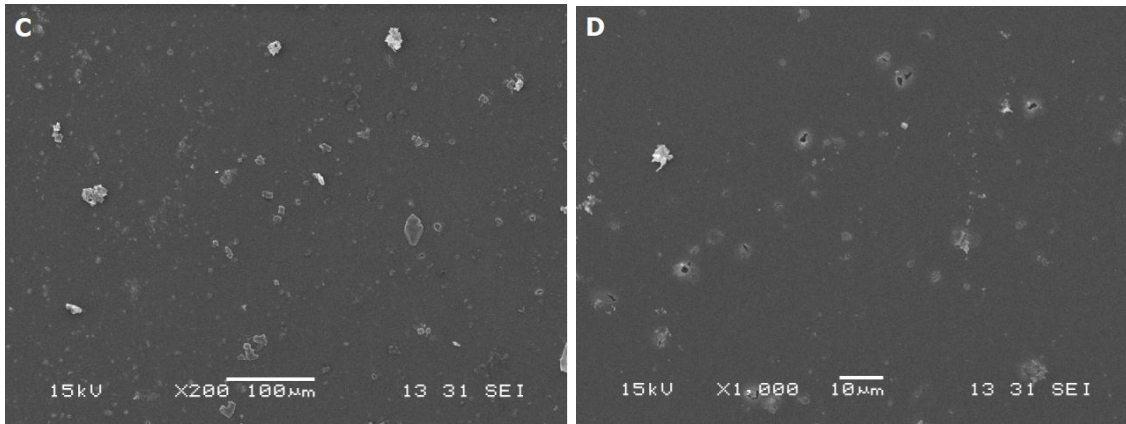


Fig.29. Imagen SEM del recubrimiento con partículas 13-93: A) Sin inmersión a 200x, B) Sin inmersión a 1000x, C) 14 días de inmersión a 200x y D) 14 días de inmersión a 1000x.

Las imágenes para el recubrimiento bicapa funcionalizado con vidrio silicato 13-93 se presentan en la Figura 29. A bajos aumentos puede observarse de manera general una buena distribución espacial de partículas en el recubrimiento así como de tamaño de las mismas, visualizándose incluso partículas cercanas a los $10\mu\text{m}$. De esta manera, se confirma que para este caso no resulta necesaria la incorporación de un dispersante en la suspensión.

Comparando las imágenes 29.B y 29.D, correspondientes a la muestra sin inmersión y luego de 14 días en SBF, se observa que luego de estar en medio fisiológico simulado comienzan a haber pequeños huecos en el recubrimiento consecuencia de la disolución y/o desprendimiento de los vidrios. Las partículas de mayor tamaño son aquellas que primero se desprenden del film mientras que las más pequeñas siguen incorporadas en el recubrimiento.

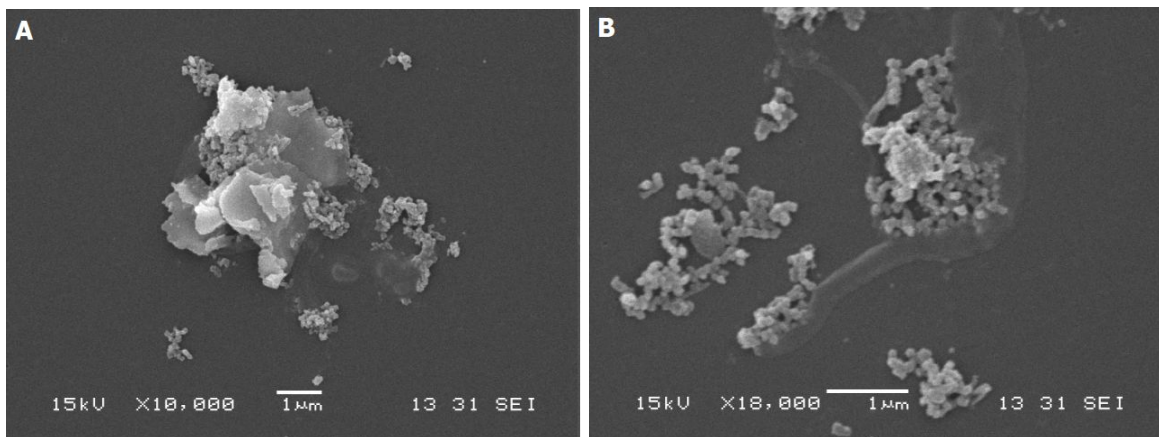


Fig.30. Imagen SEM de un *cluster* de hidroxiapatita en la superficie del recubrimiento 13-93 a 10000x (A) y a 18000x (B).

En la Figura 30, se presenta a mayores aumentos uno de los *clusters* encontrados en la muestra. Por la morfología tipo coral se considera que puede tratarse de algún fosfato rico en Ca e incluso hidroxiapatita, la cual nuclea y crece de manera puntual sobre la superficie funcionalizada con biovidrio, como se demostró en trabajos previos [13]. Si bien la técnica indicada para dilucidar la composición sería EDS (espectroscopía de rayos X de dispersión de energía), la misma no permite discriminar entre los vidrios bioactivos, fosfatos de calcio e

hidroxiapatita. Por lo tanto, se debió tener en cuenta alguna otra técnica complementaria como FTIR para tratar de confirmar lo hallado.

Dada la alta bioactividad reportada para los biovidrios utilizados por una rápida disolución [8], se esperaría que la hidroxiapatita comience a nuclear a tiempos más cortos de inmersión en SBF que el presentado. Por lo tanto, luego de 14 días de inmersión se obtuvo un nivel de bioactividad más bien moderado para el recubrimiento con biovidrio 13-93, presentando solamente algunos *clusters* de pocos micrones.

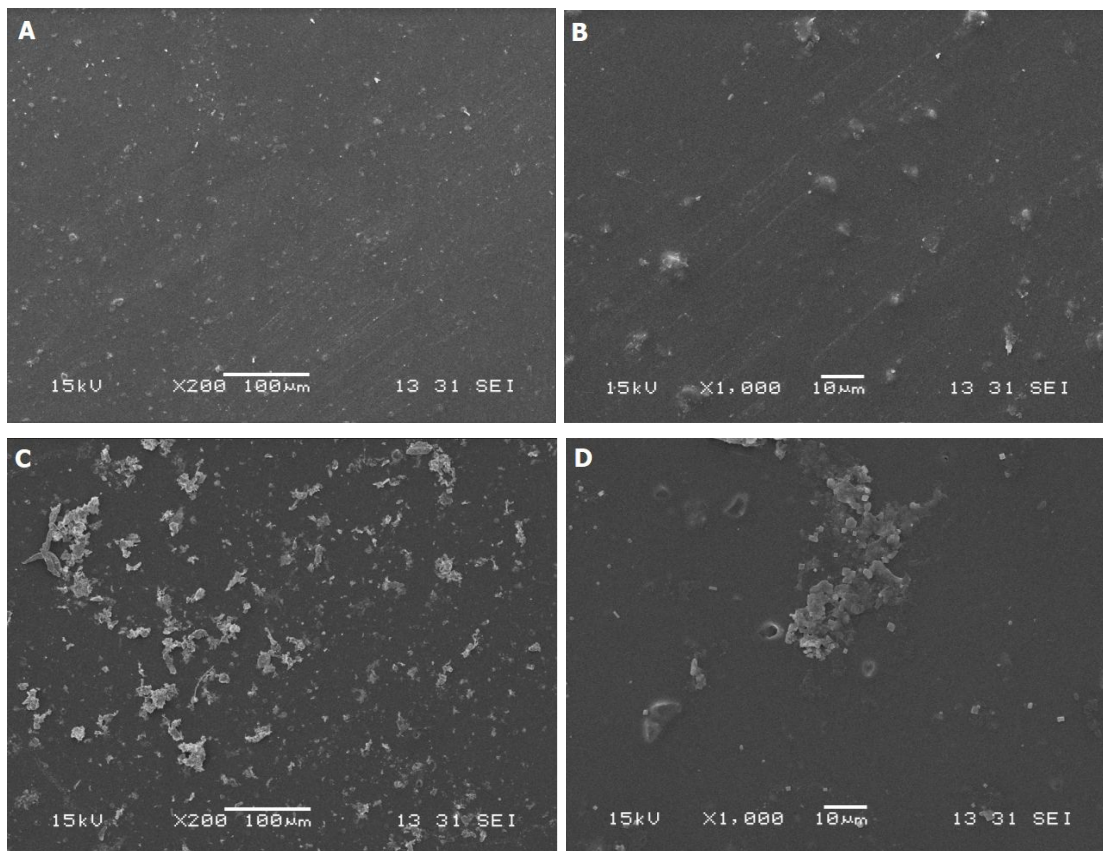


Fig.31. Imagen SEM del recubrimiento con partículas BS: A) Sin inmersión a 200x, B) Sin inmersión a 1000x, C) 14 días de inmersión a 200x y D) 14 días de inmersión a 1000x.

Los resultados para el recubrimiento con partículas de borosilicato BS se presentan en la Figura 31. Al igual que para el biovidrio anterior se obtuvo una buena dispersión de partículas en el film.

Luego del período de inmersión en SBF, se observa una gran cantidad de sales depositadas sobre la superficie. En la imagen 31.D puede verse a mayores aumentos la morfología de los depósitos, los cuales a diferencia del vidrio 13-93 no presentan la forma característica tipo coral, por lo cual se descarta que se trate de hidroxiapatita. Además, se puede observar que existen pocos huecos producto de la disolución de las partículas, las cuales permanecen en el recubrimiento.

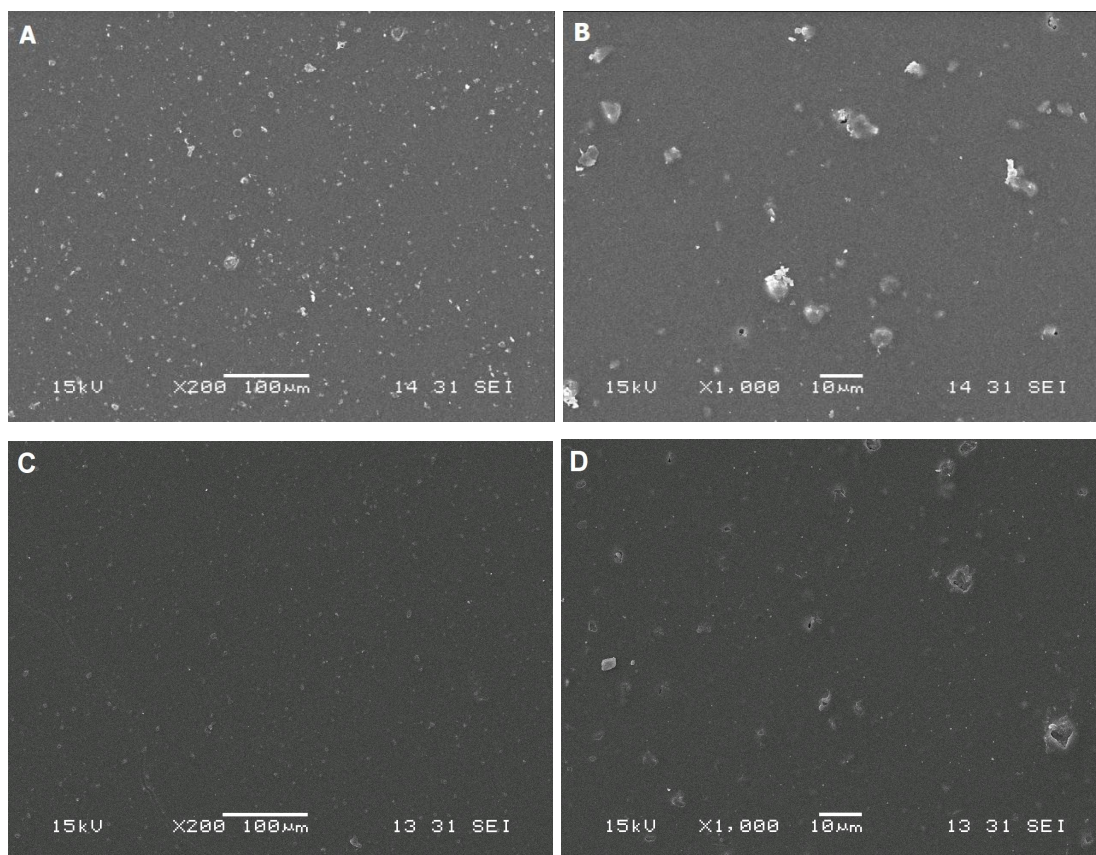


Fig.32. Imagen SEM del recubrimiento con partículas BS-Cu: A) Sin inmersión a 200x, B) Sin inmersión a 1000x, C) 14 días de inmersión a 200x y D) 14 días de inmersión a 1000x.

Finalmente, las imágenes SEM correspondientes al recubrimiento con partículas de borosilicato dopado con cobre se observan en la Figura 32. Nuevamente, la distribución de partículas lograda fue óptima y se aprecia que quedan en el recubrimiento partículas de variado tamaño pero todas menores a $10\mu\text{m}$, indicando que las de mayor tamaño decantaron en el sol antes de ser depositadas.

Después de 14 días de inmersión en solución fisiológica simulada, la zona de la muestra observada no presenta depósitos correspondientes a hidroxiapatita y lo que puede verse es producto de la deposición de sales. Prácticamente no se generaron huecos por disolución de las partículas bioactivas y las cuales permanecen mayormente en el recubrimiento.

Tanto en el caso del BS como en el BS-Cu, el hecho de no haber identificado *clusters* de interés a través de las imágenes SEM no implica que no estén presentes en la muestra, teniendo en cuenta que la observación se hace en zonas puntuales de la misma.

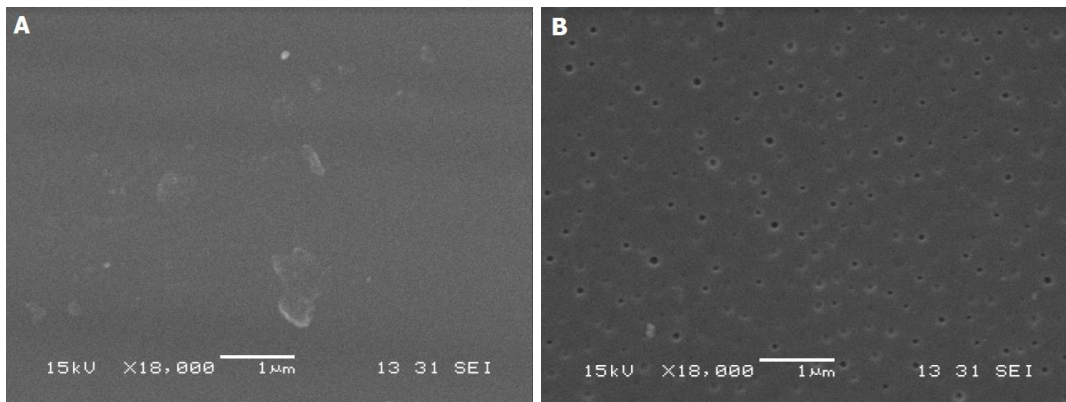


Fig.33. Imagen SEM a 18000x de: A) 1º capa y B) 2º capa del recubrimiento.

Por último, se presentan las imágenes SEM a 18000x de la primera capa del recubrimiento (TM) y de la segunda capa para un film con partículas de biovidrio, ambos sin inmersión en SBF (Figura 33). Se observa claramente que la primera capa del recubrimiento no presenta defectos y se encuentra íntegra, con lo cual resulta una barrera efectiva para evitar la liberación de iones metálicos al organismo. En cuanto a la segunda capa, se puede ver que existe una porosidad submicrónica la cual no era esperada dado que se usó el mismo sol para ambos casos y fueron depositadas en las mismas condiciones. Si bien no se sabe con certeza qué fue lo que causó la porosidad encontrada, podría presumirse que fue producto de la suspensión de las partículas de vidrio al quedar aire atrapado producto de la agitación o por el envejecimiento prematuro del sol utilizado [27].

6.4.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A continuación se presentan los espectros FTIR tomados en modo ATR, comparando todas las muestras sin inmersión en SBF (Figura 34), con 7 días de inmersión (Figura 35) y con 14 días de inmersión (Figura 36). Los espectros para 1 y 3 días de inmersión se omitieron dado que no presentan variaciones sustanciales respecto de las muestras a tiempo cero.

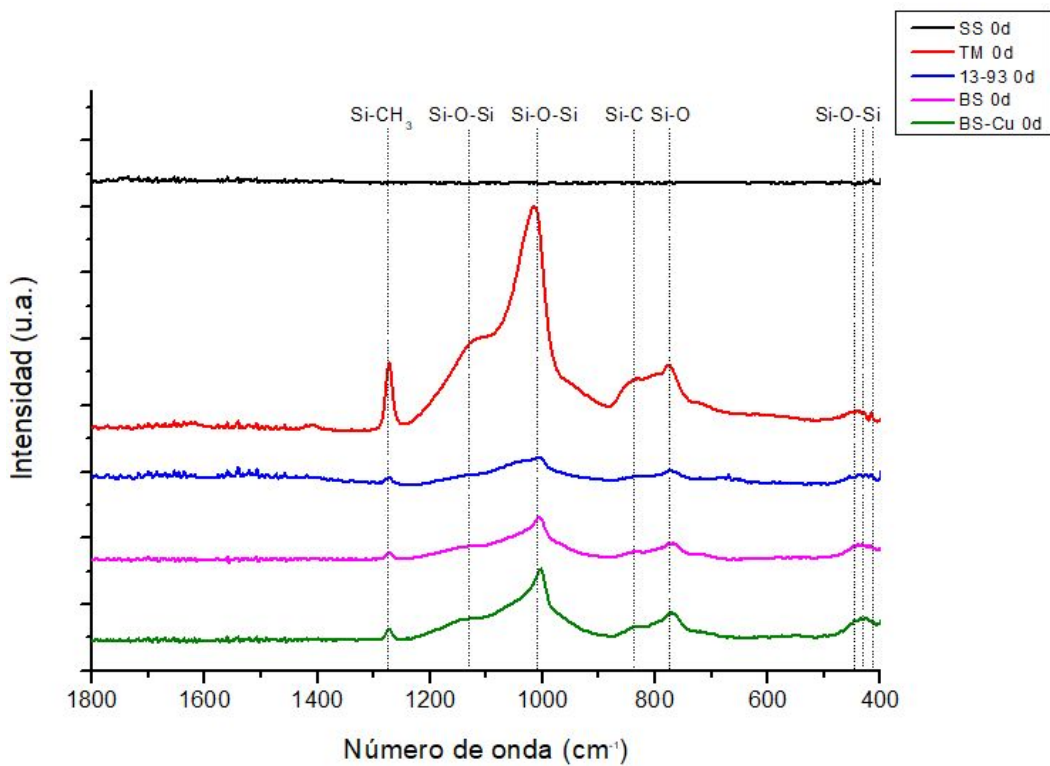


Fig.34. FTIR de las cinco condiciones a tiempo cero (sin inmersión en SBF).

En la Figura 34 puede observarse que el acero inoxidable AISI 316L no genera un espectro característico en FTIR, dado que no posee grupos funcionales orgánicos. Puede notarse que para el caso del TM los picos del espectro coinciden con los determinados para el sol híbrido (ver Tabla 12). Los espectros de las muestras funcionalizadas con partículas bioactivas presentan una combinación de las señales del sol y de los vidrios, ambos de base sílice.

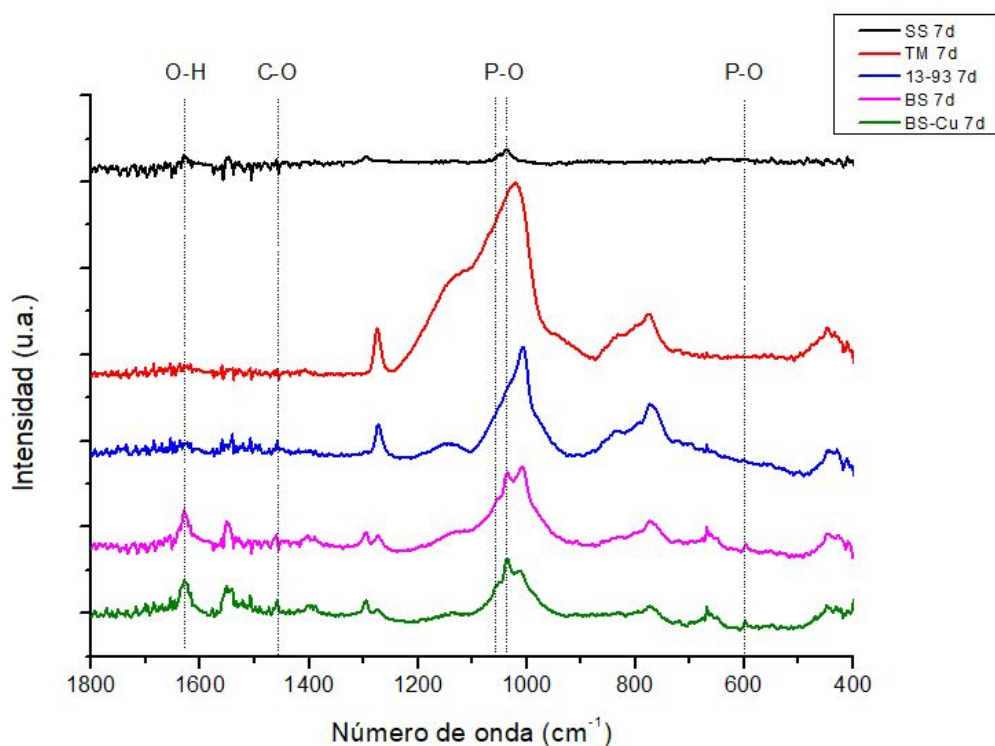


Fig.35. FTIR de las cinco condiciones luego de 7 días de inmersión en SBF.

Luego de 7 días de inmersión en solución fisiológica simulada, comienzan a apreciarse variaciones en los espectros (Figura 35). Los picos identificados para las muestras sin inmersión no son señalados en el gráfico para no entorpecer su comprensión.

En el caso del acero inoxidable desnudo, se observa que existen especies hidratadas a números de onda mayores a 1600cm^{-1} y no se espera que presente otros grupos ya que no es bioactivo. Por otra parte, las muestras con recubrimientos comienzan a desarrollar en su superficie carbonatos (a números de onda mayores a 1400cm^{-1}) y fosfatos de calcio, los cuales muestran un indicio de bioactividad en las muestras. Esto puede verse en el espectro FTIR como la aparición de una señal a aproximadamente 1036cm^{-1} para el pico más intenso, y en menor medida a 1055cm^{-1} y a 600cm^{-1} . Se observa para el BS y el BS-Cu un pico incipiente cercano a 1300cm^{-1} el cual se relaciona con la presencia de boro en la estructura, pudiendo estar apantallado por señales más intensas en los espectros a tiempo cero. Para el TM, no se observa la aparición de dichos picos.

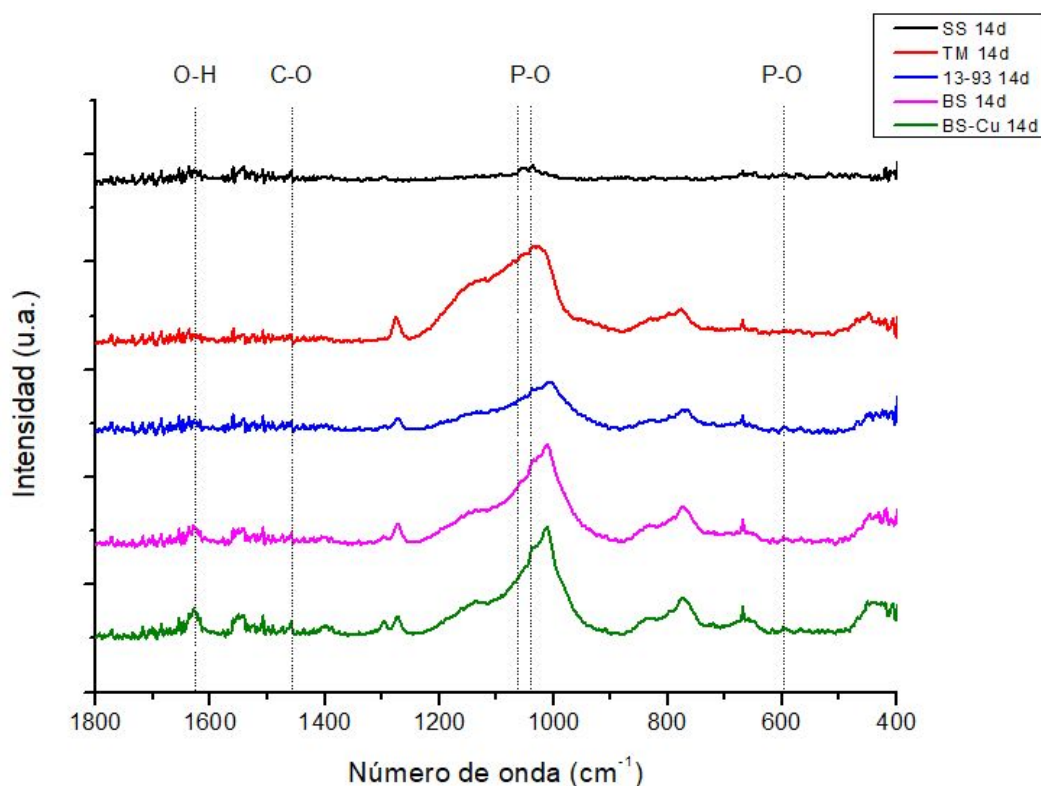


Fig.36. FTIR de las cinco condiciones luego de 14 días de inmersión en SBF.

Por último, se presenta el gráfico del espectro para las muestras luego de 14 días en SBF (Figura 36). Para aquellas con recubrimiento se observa una disminución de la intensidad del pico correspondiente a la unión Si-CH₃ respecto de los 7 días, indicando que estos grupos están sufriendo modificaciones y posiblemente estén participando en la formación de los fosfatos de la hidroxiapatita carbonatada. El pico a 1036cm⁻¹ aumenta ligeramente su intensidad hacia los 14 días, aunque se esperaría que también aumenten aquellos ubicados alrededor de 600cm⁻¹, sobre todo para las muestras bioactivas. Esto puede ser un indicio de que la cantidad de partículas agregadas al sol no fue suficiente para desarrollar el nivel de bioactividad que alcanzan los vidrios por sí mismos para estos tiempos [8].

A modo de resumen, se presenta en la Tabla 14 la asignación de todos los picos del espectro para las muestras recubiertas luego de 14 días en SBF junto con las referencias correspondientes.

Tabla 14

Asignación de los picos del espectro FTIR a 14 días de inmersión para las muestras recubiertas.

Valor de referencia (cm ⁻¹)	Asignación	Referencia	TM 14d	13-93 14d	BS 14d	BS-Cu 14d
1630	O-H	[48,49]	1630	1626	1628	1630
1460	C-O	[8,13,49,50]	-	1458	1460	1458
1300-1500	B-O	[8,51]	-	-	1297	1298

1275	Si-CH ₃	[25,43,44,45]	1275	1272	1273	1272
1130	Si-O-Si	[25,44,45,46]	1124	1135	1134	1136
1055	P-O	[49,50]	-	1055	1055	1055
1036	P-O	[8,13,48,49]	-	1037	1035	1035
1000-1040	Si-O-Si	[8,44]	1015	1006	1006	1011
831	Si-C	[44,45]	840	832	835	831
771	Si-O	[44,45,46]	774	773	773	772
600	P-O	[8,48,49,50]	-	598	598	597
446	Si-O-Si	[8,13]	448	446	448	446
433	Si-O-Si	[8,13]	432	427	427	434
408	Si-O-Si	[8,13]	416	411	408	412

6.5. Respuesta antibacterial

Los ensayos antibacteriales sobre los recubrimientos que contienen partículas de BS y BS-Cu se presentan en la Figura 37. Puede observarse que en los duplicados para ambas muestras no se identificaron halos de inhibición para el crecimiento de la cepa bacteriana empleada.

Si bien el biovidrio BS-Cu posee una actividad antibacterial comprobada, resulta evidente que dicha actividad no puede manifestarse en el sistema conformado por el recubrimiento con el vidrio. Esto puede deberse a que la concentración del vidrio incorporado no sea suficiente como para exhibir el efecto o bien que las partículas que contienen el cobre no pudieron salir del recubrimiento. Si se tienen en cuenta las imágenes SEM para las muestras sin inmersión y luego de inmersión prolongada en SBF (Sección 6.4.3.), donde pudo verse que las partículas permanecieron en el recubrimiento, puede asumirse que prácticamente no existe disolución/desprendimiento de las mismas, con lo cual no puede liberarse el ión Cu²⁺.

Una posibilidad para mejorar la eficiencia antibacterial de estos recubrimientos a tiempos cortos de implantación sería incorporar el cobre en el sol híbrido, a través del agregado de nitrato de cobre (II) (Cu(NO₃)₂), en lugar de incorporarlo al biovidrio.

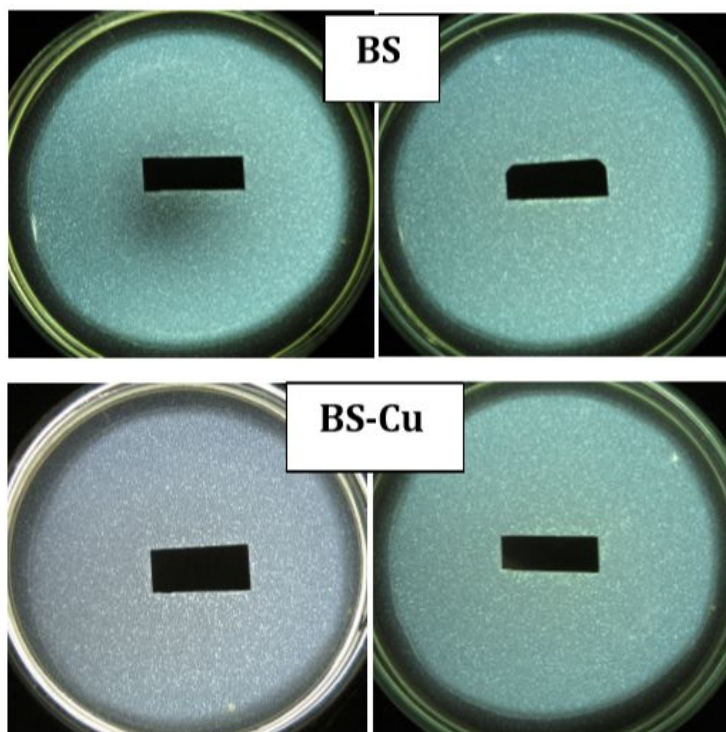
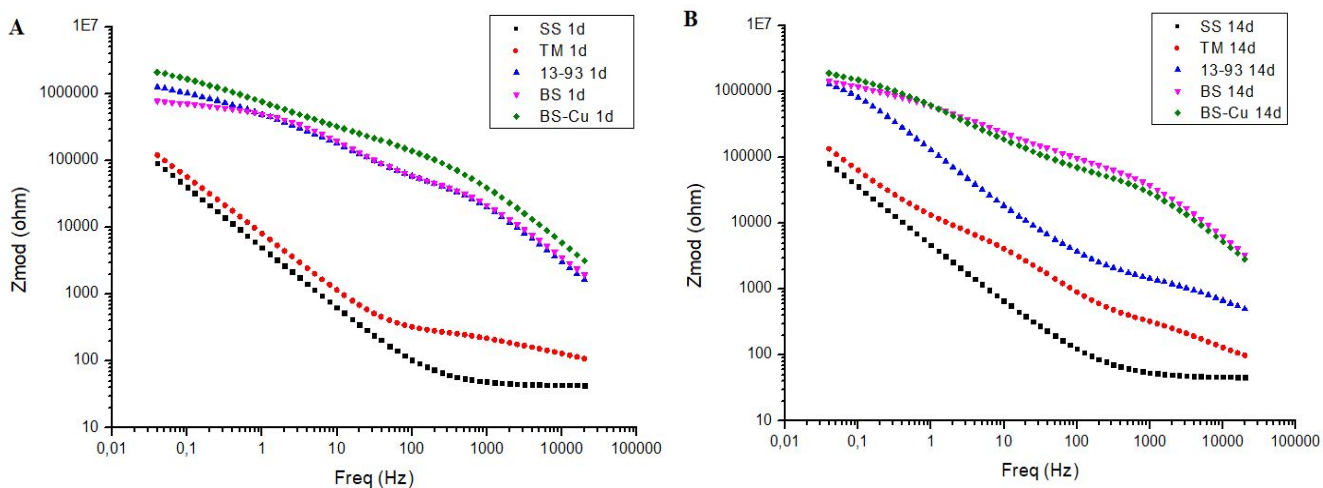


Fig.37. Ensayo de halo de inhibición para los recubrimientos con vidrios BS y BS-Cu.

6.6. Ensayos electroquímicos

6.6.1. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

A continuación se presentan las representaciones de Bode de los ensayos de espectroscopía de impedancia electroquímica para todas las muestras luego de 1 y 14 días de inmersión en SBF (Figura 38).



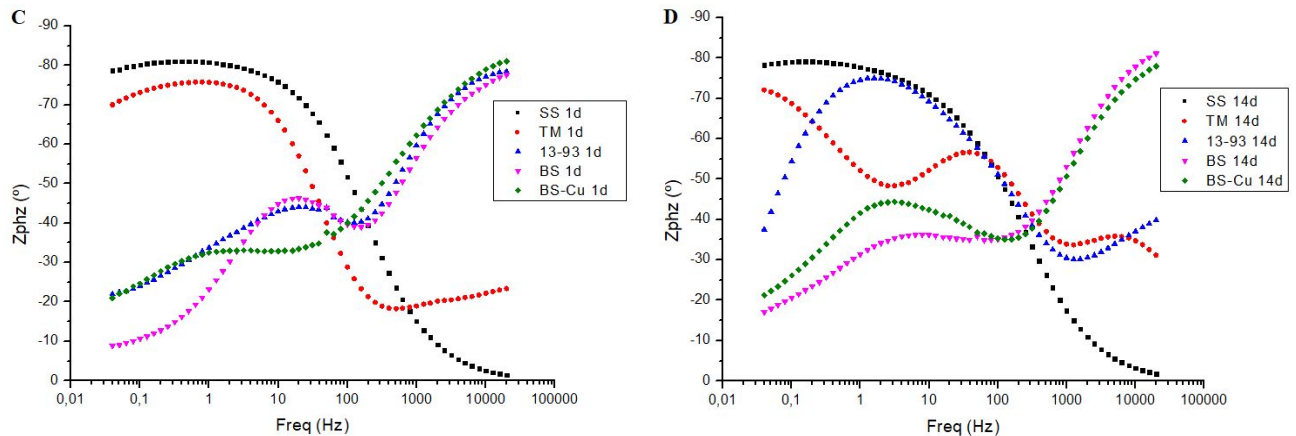


Fig.38. Representación de Bode para todas las muestras luego de 1 y 14 días de inmersión en SBF. A y B: módulo de impedancia vs frecuencia. C y D: ángulo de fase vs frecuencia.

Una forma de analizar el comportamiento electroquímico y con ello la integridad y grado de protección del recubrimiento en el tiempo, es a través de ensayos no destructivos como EIS.

De manera general se observa que todas las muestras recubiertas, ya sea con una o dos capas presentan un mayor valor de módulo de impedancia (extrapolando a frecuencia cero en el gráfico de Bode $|Z|$ vs frecuencia), respecto del acero inoxidable desnudo, tanto a tiempos cortos como largos de inmersión. Las muestras con dos capas presentan una mejora mayor a un orden de magnitud en el módulo de la impedancia.

Luego de 14 días en SBF, el SS se mantiene sin variaciones en su comportamiento electroquímico (Figura 38.B). Para el TM luego de inmersión prolongada se observa que el recubrimiento pasa a tener tres constantes de tiempo en lugar de dos. Esto puede atribuirse a un proceso de degradación del recubrimiento donde se generan poros que permiten el paso de SBF hacia la base de dichos poros pero a la vez pueden ser tapados por compuestos provenientes de la solución o por productos de corrosión generados. Para el 13-93 a 14 días de inmersión se evidencia una importante disminución en el módulo de la impedancia (Figura 39) debido a la disolución de las partículas bioactivas, mientras que el BS y BS-Cu prácticamente no muestran cambios en el comportamiento (Figura 40), presumiblemente porque la velocidad de disolución de las partículas en el recubrimiento es menor, como pudo comprobarse por SEM.

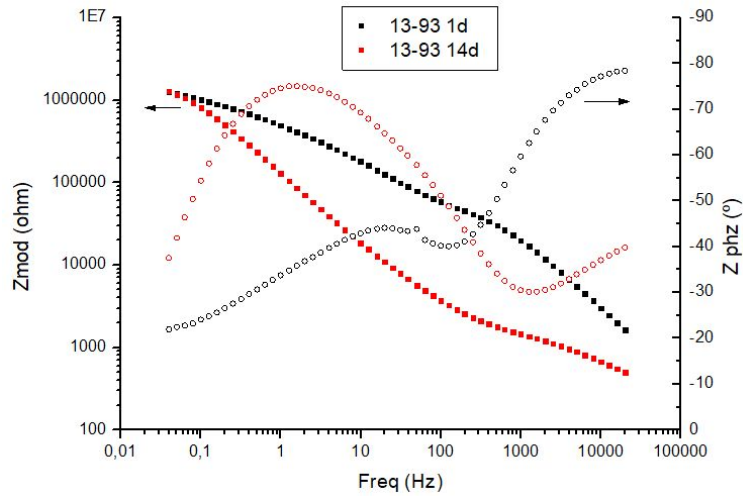


Fig.39. Gráficos de Bode para el 13-93 luego de 1 y 14 días de inmersión.

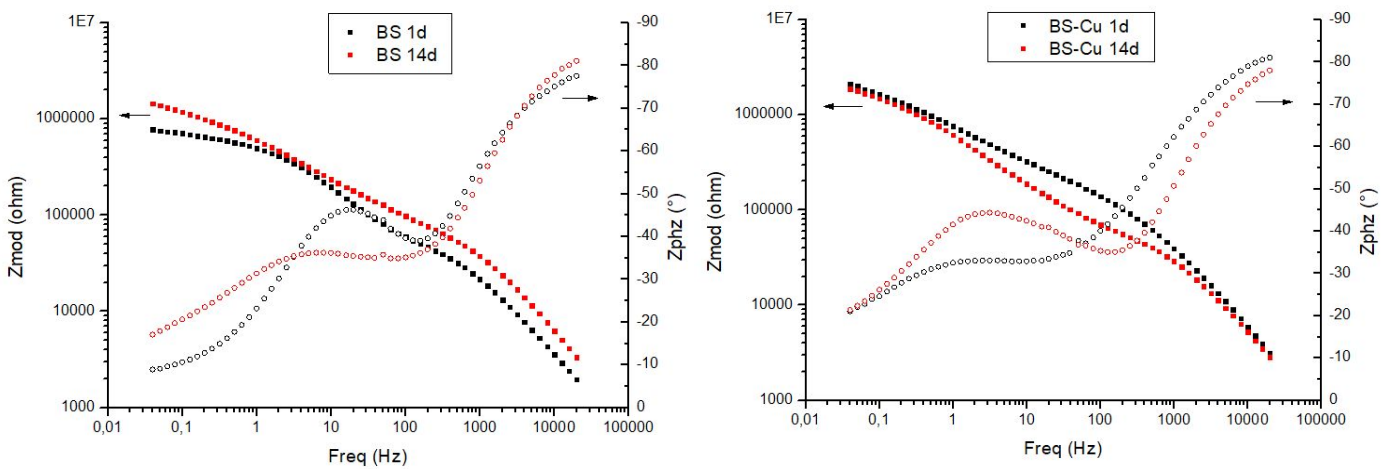


Fig.40. Gráficos de Bode para el BS y BS-Cu luego de 1 y 14 días de inmersión.

Los resultados de todas las muestras, ensayadas por cuadruplicado, fueron modelados a través de circuitos equivalentes que ajustan los datos experimentales obtenidos y facilitan la interpretación de los procesos físicos y de degradación que ocurren en el sistema. El modelo utilizado para todos los casos es el presentado en la Figura 41 [16,53], excepto para el TM luego de 14 días de inmersión para el cual se empleó el circuito de la Figura 42.

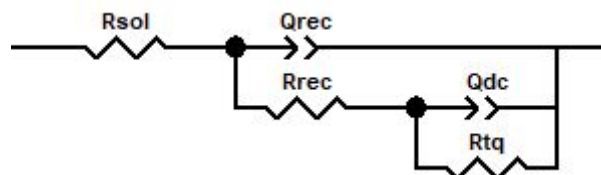


Fig.41. Modelo circuital para todas las muestras excepto para TM 14d.

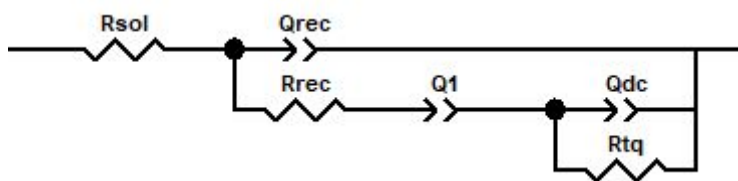


Fig.42. Modelo circuital para TM 14d.

Ambos modelos tienen tres resistencias, las cuales corresponden a la solución (R_{sol}), al recubrimiento o a los poros del óxido para el caso del SS ($R_{rec}/R_{óx}$) y la resistencia a la transferencia de carga en la superficie del metal (R_{tq}). En lugar de capacitores ideales se utilizaron elementos de fase constante llamados CPE, cuando el ángulo de fase es distinto a -90° :

$$CPE = 1/Q(j\omega)^\alpha \quad (Ec.15)$$

Los CPE se utilizan en lugar de capacitores ideales para compensar inhomogeneidades del sistema, como puede ser una superficie rugosa o porosa. Cada uno de estos elementos de fase constante se encuentra afectado por un coeficiente α asociado a la homogeneidad del sistema, siendo 1 el valor correspondiente a un capacitor ideal (ángulo de fase constante igual a -90°) [54].

Así, se representa la pseudocapacitancia del recubrimiento u óxido ($Q_{rec}/Q_{óx}$), la correspondiente a la doble capa electroquímica (Q_{dc}) y una tercera (Q_1) para el modelo del TM 14d, representando productos de corrosión en el fondo de los poros.

Cada muestra fue ajustada al modelo correspondiente obteniendo errores menores al 10%, y se presentan los resultados promedio de las 4 muestras para cada caso (Tabla 15). A modo de ejemplo, se presenta en el gráfico de la Figura 43 los resultados experimentales y el modelo empleado para el TM 1d y 14d, demostrando el buen ajuste que generan los circuitos elegidos.

Tabla 15

Ajuste matemático con modelos de circuitos equivalentes.

Muestra	R_{sol} (Ωcm^2)	$Q_{rec/óx}$ ($S^\alpha/\Omega\text{cm}^2$)	$\alpha_{rec/óx}$	$R_{rec/óx}$ (Ωcm^2)	Q_1 ($S^\alpha/\Omega\text{cm}^2$)	α_1	Q_{dc} ($S^\alpha/\Omega\text{cm}^2$)	α_{dc}	R_{tq} (Ωcm^2)
SS 1d	44	2.63E-05	0.911	1.40E+02	-	-	1.09E-05	0.898	2.03E+06
SS 14d	47	2.77E-05	0.874	3.59E+02	-	-	1.24E-05	0.856	infinito
TM 1d	45	6.29E-06	0.638	2.64E+02	-	-	1.70E-05	0.899	infinito
TM 14d	45	4.09E-06	0.737	1.16E+03	1.14E-05	0.734	1.59E-05	0.852	9.24E+03
13-93 1d	45	1.55E-08	0.927	2.37E+04	-	-	6.47E-07	0.545	1.20E+06

13-93 14d	45	3.08E-07	0.704	5.33E+03	-	-	7.77E-07	0.846	1.72E+06
BS 1d	45	1.55E-08	0.900	3.41E+04	-	-	4.61E-07	0.625	7.53E+05
BS 14d	45	6.15E-09	0.930	4.77E+04	-	-	5.14E-07	0.492	1.19E+06
BS-Cu 1d	45	7.78E-09	0.908	3.96E+04	-	-	8.90E-07	0.469	3.44E+06
BS-Cu 14d	45	1.54E-08	0.864	4.40E+04	-	-	4.32E-07	0.648	1.44E+07

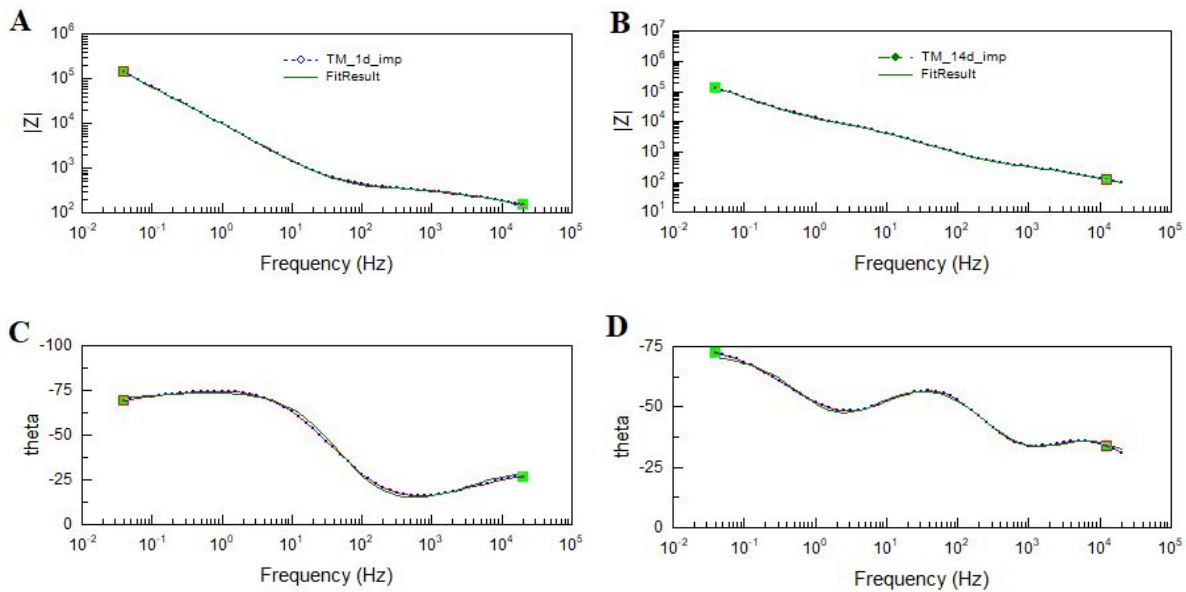


Fig.43. Ejemplo de resultados experimentales y ajuste matemático para el TM: A y B módulo de impedancia vs frecuencia (1 y 14 días), C y D ángulo de fase vs frecuencia (1 y 14 días).

Finalmente, se relacionó la pseudocapacitancia del recubrimiento con una capacidad efectiva (C_{eff}), a partir de la siguiente ecuación, siguiendo el modelo de Brugg [55]:

$$C_{eff} = Q^{1/\alpha} \left(\frac{R_{sol} R_{rec}}{R_{sol} + R_{rec}} \right)^{\frac{1-\alpha}{\alpha}} \quad (\text{Ec.16})$$

Los valores promedio de la capacidad efectiva de las cuatro muestras para cada sistema y la desviación estándar se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16

Capacidades efectivas obtenidas con el modelo de Brugg.

Muestra	Ceff (F/cm ²)
SS 1d	1.32E-05 ± 7.06E-13
SS 14d	1.05E-05 ± 2.39E-12
TM 1d	5.79E-08 ± 1.65E-15
TM 14d	1.15E-07 ± 2.61E-14
13-93 1d	4.09E-09 ± 4.57E-19
13-93 14d	3.41E-09 ± 1.11E-17
BS 1d	3.05E-09 ± 6.36E-19
BS 14d	1.97E-09 ± 1.40E-19
BS-Cu 1d	1.71E-09 ± 4.18E-20
BS-Cu 14d	1.55E-09 ± 1.76E-19

Si bien todas las muestras con doble recubrimiento se mantienen considerablemente estables en el tiempo de inmersión estudiado, los resultados del ajuste matemático muestran que el recubrimiento con partículas de vidrio 13-93 es el que presenta las mayores variaciones en el tiempo en los parámetros del recubrimiento, cambiando un orden de magnitud R_{rec} , tal como se observó en los gráficos de Bode. Para el TM, el cambio que se presenta en el modelo luego de 14 días en SBF puede interpretarse como un deterioro del recubrimiento confirmado por una disminución de la resistencia (R_{rec}). Si bien los poros pueden ser tapados por especies que se depositen provenientes del electrolito o bien por productos generados por la corrosión, se observa un aumento de la capacidad efectiva indicando que no resulta más protector que el recubrimiento antes de degradarse.

Para el BS y el BS-Cu, tanto los parámetros del ajuste con el modelo como la capacidad efectiva indican que casi que no presentan variaciones en los tiempos estudiados.

A partir de estos resultados puede asegurarse que las muestras con recubrimientos bicapa son un mejor dieléctrico respecto del recubrimiento con una sola capa. Como era de esperarse, el recubrimiento monocapa es más capacitivo que el metal desnudo con una capa de óxido superficial. Además, los resultados del modelado electroquímico resultaron del orden de los reportados para sistemas semejantes obtenidos a partir de soles híbridos TEOS/MTES [16].

6.6.2. Curvas de polarización potenciodinámicas

En la Figura 44 se presentan las curvas de polarización potenciodinámicas para todas las muestras luego de 1 y 14 días de inmersión en SBF, y en la Tabla 17 se presenta la comparación para los potenciales más significativos de cada una.

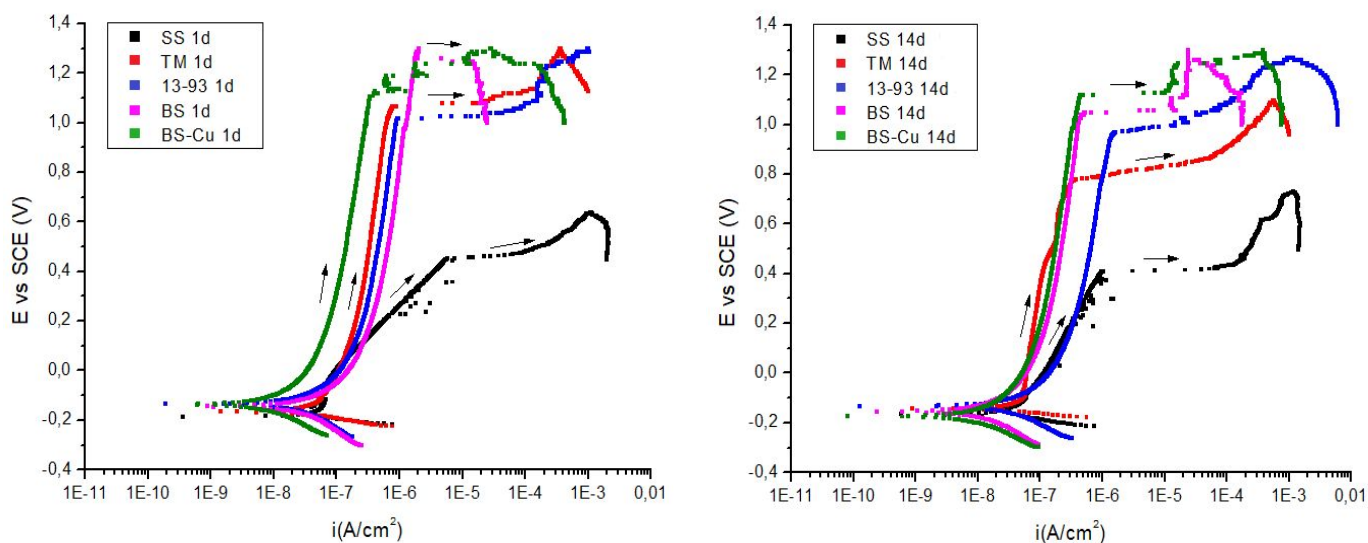


Fig.44. Curvas de polarización para todas las muestras luego de 1 día (izq.) y 14 días (der.) de inmersión en SBF.

Tabla 17

Potenciales significativos para todos los sistemas a 1 y 14 días de inmersión en SBF.

Muestra	E_{OCP} (V)	Erup (V)	Erup- E_{OCP} (V)
SS 1d	-0.18	0.45	0.63
SS 14d	-0.16	0.41	0.57
TM 1d	-0.16	1.06	1.22
TM 14d	-0.14	0.77	0.91
13-93 1d	-0.13	1.01	1.14
13-93 14d	-0.13	0.97	1.10
BS 1d	-0.14	1.27	1.41
BS 14d	-0.15	1.04	1.19

BS-Cu 1d	-0.13	1.11	1.24
BS-Cu 14d	-0.17	1.11	1.28

Para el acero inoxidable luego de 1 día de inmersión en SBF se observa el comportamiento correspondiente a una película pasiva estable hasta 0.23V. A partir de allí y hasta 0.45V (Erup) se observa una zona con picaduras metaestables las cuales crecen y se repasivan sucesivamente como puede verse en el gráfico de la Figura 45. A potenciales mayores que el de ruptura, la repasivación espontánea ya no es posible y las picaduras crecen de forma autocatalítica, dando lugar a la disolución activa del material.

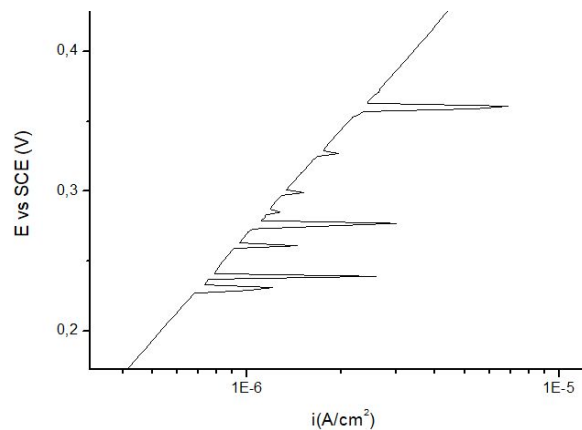


Fig.45. Zona metaestable de pasivación del acero inoxidable.

En comparación con el SS a 1 día de inmersión, las muestras con recubrimientos de una y dos capas presentan potenciales de ruptura cuyo valor al menos duplica al del metal desnudo, variando entre 1.01 y 1.27V. Por otra parte, las densidades de corriente medidas para estas muestras son entre uno y dos órdenes de magnitud menores que para el acero inoxidable, evidenciando el carácter protector de los recubrimientos. El material no sufre picado hasta Erup, manteniendo una densidad de corriente con una variación menor a una década en todos los casos. A partir de las curvas de polarización, no se observa una mejora significativa en la respuesta de los sistemas bicapa respecto de TM con 1 día de inmersión, lo cual puede asociarse a la porosidad de la capa más externa de los recubrimientos funcionalizados con partículas, tal como fue corroborado por SEM.

Luego de 14 días en solución fisiológica simulada, el SS presenta una película pasiva estable donde tanto el Erup como la densidad de corriente se mantienen prácticamente sin variaciones. Para el TM se observa un corrimiento de la densidad de corriente hacia valores menores respecto de las curvas para 1 día de inmersión, indicando que pudieron haberse depositado compuestos provenientes de la solución o productos de corrosión en los poros que pudiera tener la capa. Lo mismo ocurre para la muestra BS donde la densidad de corriente disminuyó respecto de 1 día de inmersión (Figura 46). Esto puede correlacionarse con lo

observado en las imágenes SEM donde se ve que prácticamente no se produjo disolución de las partículas y que existen depósitos de especies en la superficie de las muestras, los cuales pueden generar una mayor resistencia al paso de la solución.

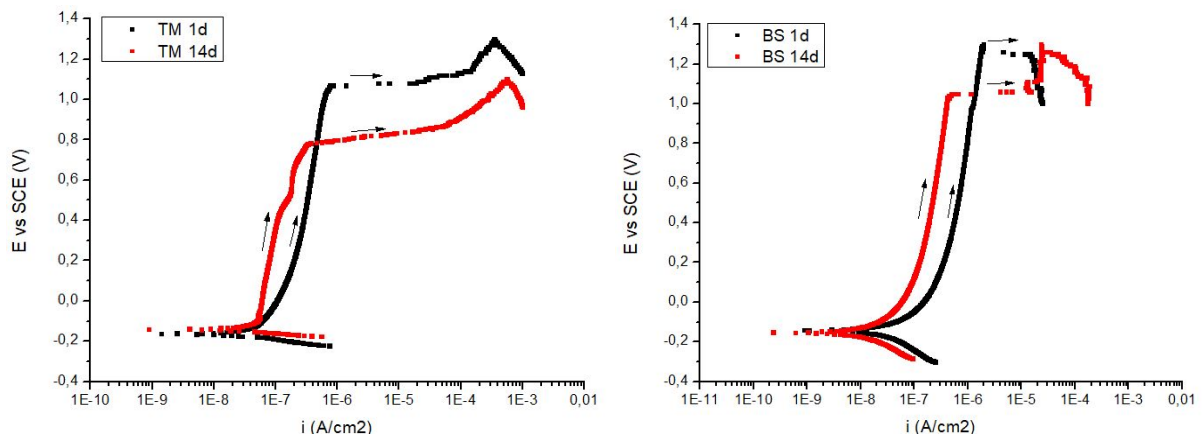


Fig.46. Corrimiento de la curvas de polarización para el TM (izq.) y BS (der.) hacia densidades de corriente menores luego de inmersión prolongada en SBF.

La curva para el BS-Cu se mantuvo prácticamente sin cambios luego de 14 días en SBF, por lo cual no es presentada.

Para el recubrimiento con vidrio 13-93 se observa un muy ligero aumento en la densidad de corriente para tiempos de inmersión prolongados (Figura 47), lo cual puede relacionarse a través de las imágenes SEM con la disolución de las partículas bioactivas las cuales dejan huecos que permiten un mayor paso de la solución a través del mismo.

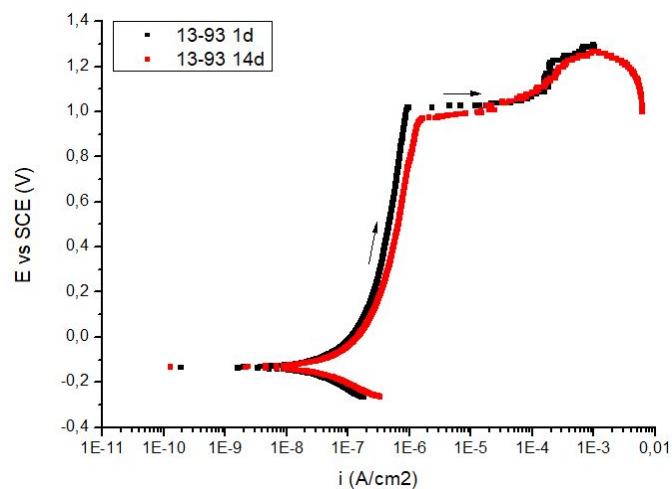


Fig.47. Corrimiento de la curva de polarización para el 13-93 luego de 14 días en SBF.

El potencial de ruptura para el TM disminuye considerablemente respecto de 1 día en SBF aunque sigue manteniéndose por encima del correspondiente al acero inoxidable, lo cual indica que el recubrimiento comenzó a degradarse. Para los recubrimientos con partículas de vidrio 13-93 y BS, el potencial de ruptura también disminuyó un poco pero se mantiene en valores cercanos a 1V, mientras que para el BS-Cu el Erup no mostró variaciones.

7. Análisis económico

La relación costo/beneficio que presenta una prótesis es uno de los puntos a evaluar al momento de su selección. En Argentina, los costos de fabricación de implantes de acero inoxidable de grado quirúrgico resultan mucho menores que para las aleaciones de mayor prestación como las de titanio, razón por la cual siguen siendo los más demandados por el mercado.

Con el objetivo de evaluar la posible inserción en el mercado nacional de implantes de acero inoxidable AISI 316L recubiertos por sol-gel, se realizó un estudio de los costos asociados al recubrimiento y se comparó el costo final con los correspondientes a piezas semejantes fabricadas de la aleación Ti-6Al-4V. Se consideró para el estudio un vástago femoral que compone una prótesis total de cadera, y no se tuvo en cuenta la inversión inicial por la instalación de la planta ni los procesos de fabricación de la pieza sin recubrimiento.

Tabla 18

Costos de fabricación asociados a los recubrimientos por sol-gel para producir 30000 piezas anuales.

Costos directos de producción (USD/año)	
Materias primas	66200
Mano de obra (6 operarios)	60000
Supervisión (2 supervisores)	12000
Servicios (electricidad <i>dip-coater</i> y hornos eléctricos)	25000
Mantenimiento	5000
Suministros	20000
Gastos de laboratorio	3000
Costos fijos (USD/año)	
Depreciación (300000 USD a 30 años por construcción de la planta y 152000 USD a 5 años por equipos comprados)	40400
Impuestos	2500
Seguros	15000
Costos generales (USD/año)	
Administración	15000
Gastos generales de la planta	20000

Total (USD/año)	284100
------------------------	---------------

A partir de la estimación de los costos de fabricación presentada en la Tabla 18, considerando una producción anual de 30000 piezas, el costo del recubrimiento resulta de 9.47 USD/pieza el cual debe sumarse al costo base del implante.

Los precios de los vástagos disponibles actualmente en el mercado internacional son los siguientes:

- AISI 316L cementado (TecnoProt S.A., Argentina): 160 USD
- Ti-6Al-4V cementado (MBA Surgical Empowerment, España): 760 USD
- Ti-6Al-4V no cementado, con HAp por plasma spray (MBA Surgical Empowerment, España): 1550 USD

Por lo tanto, para el vástago de acero inoxidable el incremento en el precio dado por el recubrimiento bicapa es de un 6%, dando un valor final de aproximadamente 170 USD/pieza. Si se tiene en cuenta que el recubrimiento mejora la resistencia a la corrosión y que la presencia de las partículas de vidrio le confiere un carácter bioactivo pudiéndose osteointegrarse con el hueso, los implantes AISI 316L resultan una opción económicamente favorable frente a los de Ti-6Al-4V, siendo factible su producción en Argentina.

8. Conclusiones

Se pudieron obtener exitosamente recubrimientos a partir de un sol híbrido orgánico-inorgánico, funcionalizado con partículas de vidrios bioactivos sobre acero inoxidable de uso quirúrgico. Los resultados y conclusiones más importantes del trabajo realizado son enumerados a continuación.

- Resulta factible emplear un sol híbrido TEOS/MTMS que reemplace en funcionalidad al conocido sistema TEOS/MTES pero a un menor costo, asegurando que los productos de la reacción potencialmente tóxicos para el organismo son correctamente eliminados a través del tratamiento térmico.
- A partir de los estudios por FTIR y NMR, no se observaron cambios estructurales en el vidrio borosilicato con y sin agregado de dopante. Mediante espectrofotometría UV-VIS fue posible confirmar que el cobre se encuentra libre en la estructura como ión cúprico (Cu^{2+}) y se ubica en huecos intersticiales.
- Los recubrimientos obtenidos presentaron buena adherencia con el sustrato y se comprobó su integridad mediante microscopía óptica y electrónica, donde no se observaron fisuras ni defectos que puedan perjudicar la capacidad protectora de los mismos.
- Se encontró mediante SEM que las capas más externas de los recubrimientos bicapa presentan porosidad submicrónica, y si bien se desconoce su origen en esta etapa de estudio, se estima que puede deberse a un envejecimiento prematuro del sol funcionalizado.
- Los recubrimientos con partículas bioactivas presentaron en los estudios *in vitro* signos de bioactividad luego de 7 días de inmersión en solución fisiológica simulada, debido a la presencia de señales de carbonatos y fosfatos de calcio en los espectros FTIR.
- Las muestras recubiertas con vidrios dopados con cobre no presentaron halos de inhibición de crecimiento para la cepa de *Escherichia Coli* empleada, con lo cual su poder antibacterial no pudo ser comprobado. Esto puede deberse a que la cantidad de vidrio incorporado no fue suficiente o bien que las partículas no pudieron salir del recubrimiento para liberar el Cu^{2+} .
- Todas las muestras recubiertas presentaron en los ensayos de espectroscopía de impedancia electroquímica módulos de impedancia mayores que para el acero inoxidable desnudo, mientras que las capacidades efectivas resultaron mucho menores. En las curvas de polarización, se observa que todas las muestras presentaron potenciales de ruptura mayores que para el metal desnudo y densidades de corriente entre uno y dos órdenes de magnitud menores antes de la inmersión en SBF, evidenciando en conjunto el carácter protector de los recubrimientos. Luego de 14 días en SBF, la muestra con una única capa comenzó a degradarse, lo cual se infiere

tanto de la curva de polarización como de EIS. Las muestras con recubrimientos funcionalizados mostraron muy poca degradación con el tiempo, sobre todo para el BS y BS-Cu, mientras que el 13-93 es el que presentó leves variaciones indicando que la velocidad de disolución de las partículas resultó un poco mayor.

- Son necesarios mayores tiempos de inmersión para observar en las muestras cantidades apreciables de hidroxiapatita en la superficie. Esto indica que la cantidad de biovidrios incorporados no fue suficiente como para lograr un alto nivel de bioactividad de los recubrimientos a tiempos cortos, semejante al obtenido para los vidrios sin ser incorporados en el recubrimiento, según bibliografía.
- La fabricación en Argentina de prótesis de acero inoxidable no cementadas con los recubrimientos propuestos en este trabajo resulta económicamente factible, frente a los costos de prótesis análogas de Ti-6Al-4V cementadas o recubiertas con hidroxiapatita por plasma spray fabricadas en el exterior.

9. Referencias

- [1] Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2019). *Biomaterials, Definition, Overview. Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, 85–98.
doi:10.1016/b978-0-12-812258-7.00007-1
- [2] Oliver, J. N., Su, Y., Lu, X., Kuo, P.-H., Du, J., & Zhu, D. (2019). *Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications*. *Bioactive Materials*, 4, 261–270.
doi:10.1016/j.bioactmat.2019.09.002
- [3] Hench, L. L. (1998). *Biomaterials: a forecast for the future*. *Biomaterials*, 19(16), 1419–1423.
doi:10.1016/s0142-9612(98)00133-1
- [4] D. F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, UK, (1999). P. 318
- [5] Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. (2012). *Craig's Restorative Dental Materials*, 109–133.
doi:10.1016/b978-0-323-08108-5.10006-4
- [6] Garcia, C., Durán, A., & Moreno, R. (2005). *Stability of Suspensions of Bioactive Particles Using Hybrid Organic–Inorganic Solutions as Dispersing Media*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 34(3), 211–217.
doi:10.1007/s10971-005-2517-4
- [7] Ribas, R. G., Schatkoski, V. M., Montanheiro, T. L. do A., de Menezes, B. R. C., Stegemann, C., Leite, D. M. G., & Thim, G. P. (2019). *Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review*. *Ceramics International*.
doi:10.1016/j.ceramint.2019.07.096
- [8] Schuhladen, K., Wang, X., Hupa, L., & Boccaccini, A. R. (2018). *Dissolution of borate and borosilicate bioactive glasses and the influence of ion (Zn, Cu) doping in different solutions*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 502, 22–34.
doi:10.1016/j.jnoncrysol.2018.08.037
- [9] Balasubramanian, P., Büttner, T., Miguez Pacheco, V., & Boccaccini, A. R. (2018). *Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering*. *Journal of the European Ceramic Society*, 38(3), 855–869.
doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001

[10] *El cobre, bactericida por naturaleza* (2011).

Artículo on-line: http://www.procobre.org/procobre/acerca_del_cobre/pu_salud_06.html

[11] Lin, Y., Xiao, W., Bal, B. S., & Rahaman, M. N. (2016). *Effect of copper-doped silicate 13–93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells in vitro and on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial defects in vivo*. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 440–452.

doi:10.1016/j.msec.2016.05.073

[12] Kaur, P., Singh, K. J., Yadav, A. K., Sood, H., Kaur, S., Kaur, R., ... Kaur, S. (2018). *Preliminary investigation of the effect of doping of copper oxide in CaO-SiO₂-P₂O₅-MgO bioactive composition for bone repair applications*. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 177–186.

doi:10.1016/j.msec.2017.09.006

[13] Ali, A., Ershad, M., Vyas, V. K., Hira, S. K., Manna, P. P., Singh, B. N., ... Pyare, R. (2018). *Studies on effect of CuO addition on mechanical properties and in vitro cytocompatibility in 1393 bioactive glass scaffold*. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 341–355.

doi:10.1016/j.msec.2018.08.003

[14] Marchetti, E., May, O., Girard, J., Hildebrand, H.-F., Migaud, H., & Pasquier, G. (2010). *Biomateriales en cirugía ortopédica*. EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortopedia y Traumatología, 2(3), 1–24.

doi:10.1016/s2211-033x(10)70083-9

[15] Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2019). *Biomaterials, Definition, Overview*. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, 85–98.

doi:10.1016/b978-0-12-812258-7.00007-1

[16] Omar, S., Repp, F., Desimone, P. M., Weinkamer, R., Wagermaier, W., Ceré, S., & Ballarre, J. (2015). *Sol–gel hybrid coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 425, 1–10.

doi:10.1016/j.jnoncrysol.2015.05.024

[17] Ballarre, J., López, D. A., Schreiner, W. H., Durán, A., & Ceré, S. M. (2007). *Protective hybrid sol–gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel: Surface characterization*. *Applied Surface Science*, 253(17), 7260–7264.

doi:10.1016/j.apsusc.2007.03.007

- [18] D. A. Jones, *Principles and Prevention of corrosion*. New York: Macmillan Publishing Company, (1992).
- [19] Okazaki, Y. & E. Gotoh, *Comparison of metal release from various biocompatible metals in vitro*. *Biomaterials*, 2005. 26(1): p. 11-21.
- [20] Sivakumar, M., Kumar Dhanadurai, K. S., Rajeswari, S., & Thulasiraman, V. (1995). *Failures in stainless steel orthopaedic implant devices: A survey*. *Journal of Materials Science Letters*, 14(5), 351–354.
doi:10.1007/bf00592147
- [21] Manam, N. S., Harun, W. S. W., Shri, D. N. A., Ghani, S. A. C., Kurniawan, T., Ismail, M. H., & Ibrahim, M. H. I. (2017). *Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review*. *Journal of Alloys and Compounds*, 701, 698–715.
doi:10.1016/j.jallcom.2017.01.196
- [22] Wang, D., & Bierwagen, G. P. (2009). *Sol–gel coatings on metals for corrosion protection*. *Progress in Organic Coatings*, 64(4), 327–338.
doi:10.1016/j.porgcoat.2008.08.010
- [23] Innocenzi, P. C., Guglielmi, M., Gobbin, M., & Colombo, P. (1992). *Coating of metals by the sol-gel dip-coating method*. *Journal of the European Ceramic Society*, 10(6), 431–436.
doi:10.1016/0955-2219(92)90018-9
- [24] Brinker, C. J., Frye, G. C., Hurd, A. J., & Ashley, C. S. (1991). *Fundamentals of sol-gel dip coating*. *Thin Solid Films*, 201(1), 97–108.
doi:10.1016/0040-6090(91)90158-t
- [25] Innocenzi, P., Abdirashid, M. O., & Guglielmi, M. (1994). *Structure and properties of sol-gel coatings from methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 3(1), 47–55.
doi:10.1007/bf00490148
- [26] Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nakanishi, K., Soga, N., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1992). *Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid*. *Journal of the American Ceramic Society*, 75(8), 2094–2097.
doi:10.1111/j.1151-2916.1992.tb04470.x
- [27] McDonagh, C., Sheridan, F., Butler, T., & MacCraith, B. D. (1996). *Characterisation of sol-gel-derived silica films*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 194(1-2), 72–77.
doi:10.1016/0022-3093(95)00488-2

- [28] Ballarre, J., Manjubala, I., Schreiner, W. H., Orellano, J. C., Fratzl, P., & Ceré, S. (2010). *Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants*. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1601–1609.
doi:10.1016/j.actbio.2009.10.015
- [29] García, C., Ceré, S., & Durán, A. (2004). *Bioactive coatings prepared by sol-gel on stainless steel 316L*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 348, 218–224.
doi:10.1016/j.jnoncrysol.2004.08.172
- [30] Balgude, D., & Sabnis, A. (2012). *Sol-gel derived hybrid coatings as an environment friendly surface treatment for corrosion protection of metals and their alloys*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 64(1), 124–134.
doi:10.1007/s10971-012-2838-z
- [31] Schwartz, Z., Lotz, E. M., Berger, M. B., & Boyan, B. D. (2017). 7.22 *The Effect of Substrate Microtopography on Osteointegration of Titanium Implants*. *Comprehensive Biomaterials II*, 429–443.
doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.10218-8
- [32] Echevarria, A.E.C. (2006). *Evaluación de la modificación de elementos (Mo, Mn, Ti) en el comportamiento frente a la corrosión de aceros inoxidable austeníticos*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
- [33] Hoppe, A., Meszaros R., Stahli C., Romeis S., Schmidt J., Peukert W., Marelli B., Nazhat S., Wondraczek L., Lao J., Jallot E., Boccaccini A. (2013). *In vitro reactivity of Cu dopper 45S5 Bioglass derived scaffolds for bone tissue engineering*. *Journal of Materials Chemistry*.
- [34] Hayashi, S. (1994). *High-resolution Solid-state NMR Studies on Ceramics*. *Annual Reports on NMR Spectroscopy Volume 28*, 29–90.
doi:10.1016/s0066-4103(08)60091-5
- [35] Galliano, P. G. (1994). *Vidrios y vitrocerámicos bioactivos de silicofosfatos alcalinotérreos*. Tesis de doctorado, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- [36] Bachar, A., Catteaux, R., Duée, C., Désanglois, F., Lebecq, I., Mercier, C., & Follet-Houttemane, C. (2019). *Synthesis and Characterization of Doped Bioactive Glasses*. *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses*, 69–123.
doi:10.1016/b978-0-08-102196-5.00003-3

- [37] Gupta, N., Santhiya, D., Murugavel, S., Kumar, A., Aditya, A., Ganguli, M., & Gupta, S. (2018). *Effects of transition metal ion dopants (Ag, Cu and Fe) on the structural, mechanical and antibacterial properties of bioactive glass*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 393–403.
doi:10.1016/j.colsurfa.2017.11.023
- [38] Lopes, J. H., Fonseca, E. M. B., Mazali, I. O., Magalhães, A., Landers, R., & Bertran, C. A. (2017). *Facile and innovative method for bioglass surface modification: Optimization studies*. *Materials Science and Engineering: C*, 72, 86–97.
doi:10.1016/j.msec.2016.11.044
- [39] Souza, M. T., Crovace, M. C., Schröder, C., Eckert, H., Peitl, O., & Zanotto, E. D. (2013). *Effect of magnesium ion incorporation on the thermal stability, dissolution behavior and bioactivity in Bioglass-derived glasses*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 382, 57–65.
doi:10.1016/j.jnoncrysol.2013.10.001
- [40] Zhao, P., Boekfa, B., Nishitoba, T., Tsunoji, N., Sano, T., Yokoi, T., ... Ehara, M. (2019). *Theoretical study on 31P NMR chemical shifts of phosphorus-modified CHA zeolites*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 109908.
doi:10.1016/j.micromeso.2019.109908
- [41] Durán, A., Rodríguez, M.A., Oteo, J.L. & Fernández Navarro, J.M. (1985). *Absorción óptica de vidrios conteniendo CuO*. Instituto de Cerámica y Vidrio, Madrid.
- [42] Chu P.M., Guenther F.R., Rhoderick G.C. & Lafferty W.J. (1999). *The NIST quantitative infrared database*. *J Res Natl Inst Stand Technol*;104(1):59–81.
doi:10.6028/jres.104.004.
- [43] Juan-Díaz, M. J., Martínez-Ibáñez, M., Lara-Sáez, I., da Silva, S., Izquierdo, R., Gurruchaga, M., & Suay, J. (2016). *Development of hybrid sol–gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance*. *Progress in Organic Coatings*, 96, 42–51.
doi:10.1016/j.porgcoat.2016.01.019
- [44] Amoriello, S., Bianco, A., Eusebio, L., & Gronchi, P. (2010). *Evolution of two acid steps sol–gel phases by FTIR*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 58(1), 209–217.
doi:10.1007/s10971-010-2379-2
- [45] Procaccini, R. A., Studdert, C. A., & Pellice, S. A. (2014). *Silver doped silica-methyl hybrid coatings. Structural evolution and antibacterial properties*. *Surface and Coatings Technology*, 244, 92–97.
doi:10.1016/j.surfcoat.2014.01.036

[46] Serra, J., González, P., Liste, S., Serra, C., Chiussi, S., León, B., & Hupa, M. (2003). *FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 332(1-3), 20–27.

doi:10.1016/j.jnoncrysol.2003.09.013

[47] Asri, R. I. M., Harun, W. S. W., Hassan, M. A., Ghani, S. A. C., & Buyong, Z. (2016). *A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol–gel and electrochemical depositions on biocompatible metals*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 57, 95–108.

doi:10.1016/j.jmbbm.2015.11.031

[48] Park, K., Kim, S., Hwang, M., Song, H. & Park, Y. (2016). *Biomimetic fabrication of calcium phosphate/chitosan nanohybrid composite in modified simulated body fluids*. *Polymer Letters Vol.11, No 1*, 14-20.

[49] Koutsopoulos, S. (2002). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(4), 600–612.

doi:10.1002/jbm.10280

[50] Ciro, E., Zapata, N., & López, E. (2015). *Elaboración de un cemento óseo de fosfato de calcio con una adición de biovidrio*. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 54(2), 84–92.

doi:10.1016/j.bsecv.2015.03.006

[51] Ouis, M., Abdelghany, A., & Elbatal, H. (2012). *Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench's bioglass*. *Processing and Application of Ceramics*, 6(3), 141–149.

doi:10.2298/pac1203141o

[52] Jaiswal, S., McHale, P., & Duffy, B. (2012). *Preparation and rapid analysis of antibacterial silver, copper and zinc doped sol–gel surfaces*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 170–176.

doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.035

[53] López, D. A., Rosero-Navarro, N. C., Ballarre, J., Durán, A., Aparicio, M., & Ceré, S. (2008). *Multilayer silica-methacrylate hybrid coatings prepared by sol–gel on stainless steel 316L: Electrochemical evaluation*. *Surface and Coatings Technology*, 202(10), 2194–2201.

doi:10.1016/j.surfcoat.2007.09.007

[54] *Zplot for Windows*, Electrochemical Impedance Software Operating Manual, part 1 Scribner Ass. Inc. Southern Pines, NC (1998).

[55] Hirschorn, B., Orazem, M. E., Tribollet, B., Vivier, V., Frateur, I., & Musiani, M. (2010). *Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters*. *Electrochimica Acta*, 55(21), 6218–6227.
doi:10.1016/j.electacta.2009.10.065

10. Trabajo a futuro

A partir de lo desarrollado en el presente trabajo, se proponen los siguientes ítems para continuar con el estudio de los sistemas propuestos:

- Estudiar la evolución del sistema a mayores tiempos de inmersión (por ejemplo a 21 y 30 días) tanto electroquímicamente como *in vitro*.
- Estudiar el origen de la porosidad hallada en las capas externas de los recubrimientos funcionalizados.
- Aumentar la cantidad de partículas bioactivas añadidas al sol (por ejemplo a 10 o 15% p/p) para tratar de mejorar la bioactividad del sistema a tiempos cortos y el poder antibacterial de los recubrimientos.
- Caracterizar mediante difracción de rayos X (DRX) los sustratos con y sin inmersión en SBF para comprobar la existencia de fases cristalinas de HAp luego del ensayo *in vitro*.
- Efectuar ensayos de adhesión y proliferación celular sobre el recubrimiento.
- Estudiar en un modelo *in vivo* el desempeño de los recubrimientos que presenten los mejores resultados *in vitro*.

Anexo

Diseño y obtención de la celda electroquímica

Se diseñó y confeccionó una celda electroquímica de tres electrodos, adaptada al sistema implante-recubrimiento para el cual se evaluó la resistencia a la corrosión. La misma consta de un recipiente, una tapa y un portamuestras, cuyos planos constructivos son adjuntados a continuación.

En particular, para el diseño del portamuestras se consideraron los siguientes aspectos:

- Exponer un área controlada y repetitiva de las muestras, en la cara de interés.
- Lograr un completo sellado de forma que el electrolito alcance únicamente dicha área de la muestra.
- Evitar inducir corrosión por rendijas (*crevice*).
- Evitar introducir materiales que puedan reaccionar con el electrolito o contaminarlo.

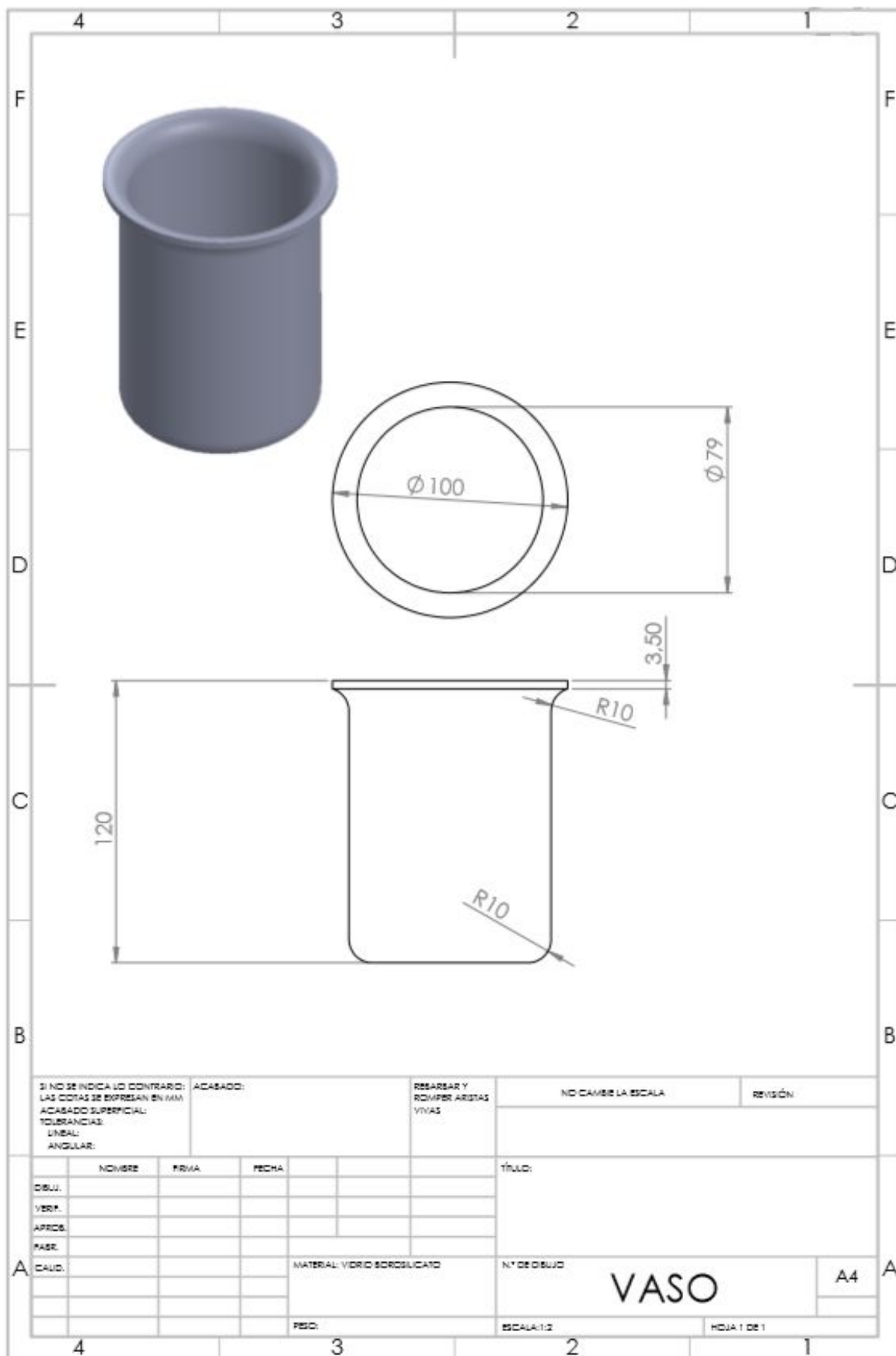
Para la fabricación tanto de la tapa como del portamuestras se seleccionó como material el polioximetileno (POM) más conocido por su marca comercial Delrin®, que es un polímero termoplástico de gran dureza y resistencia. Posee estabilidad dimensional desde -40 hasta 115°C permitiendo su uso a 37°C, temperatura a utilizar en los ensayos.

Este material es fácilmente mecanizable, permitiendo torneear roscas y realizar secciones controladas a partir de una barra redonda del material.

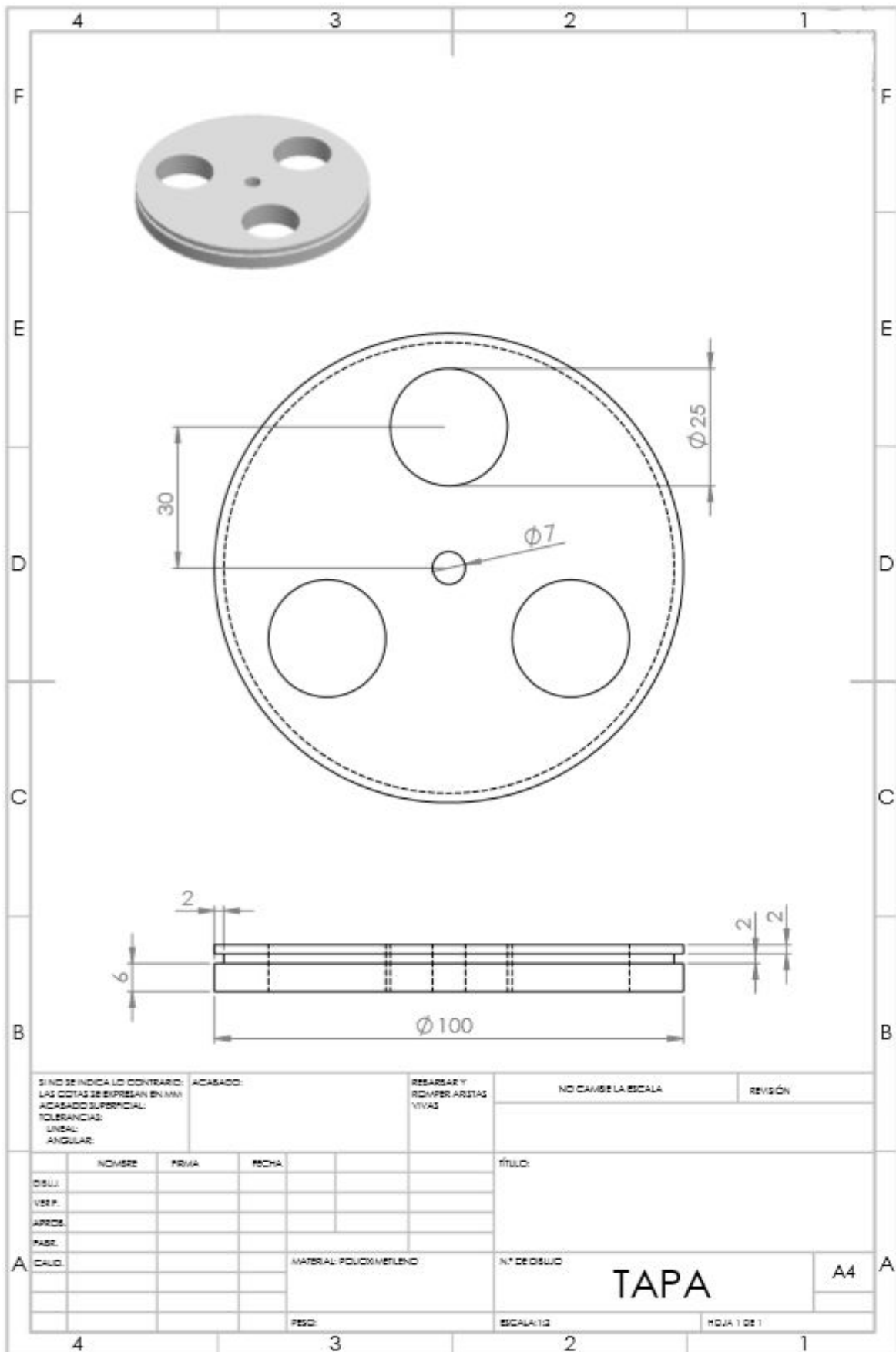
Para lograr un sellado eficiente del sistema se utilizaron juntas redondas (*o'ring*) de elastómero resistente a la temperatura y la presión. Esto permitió delimitar un área de manera controlada para exponer al electrolito en el portamuestras, y evitar la evaporación del electrolito en el caso de la tapa.

El vaso o recipiente fue obtenido a partir de vidrio de borosilicato por su durabilidad y resistencia química y a la temperatura.

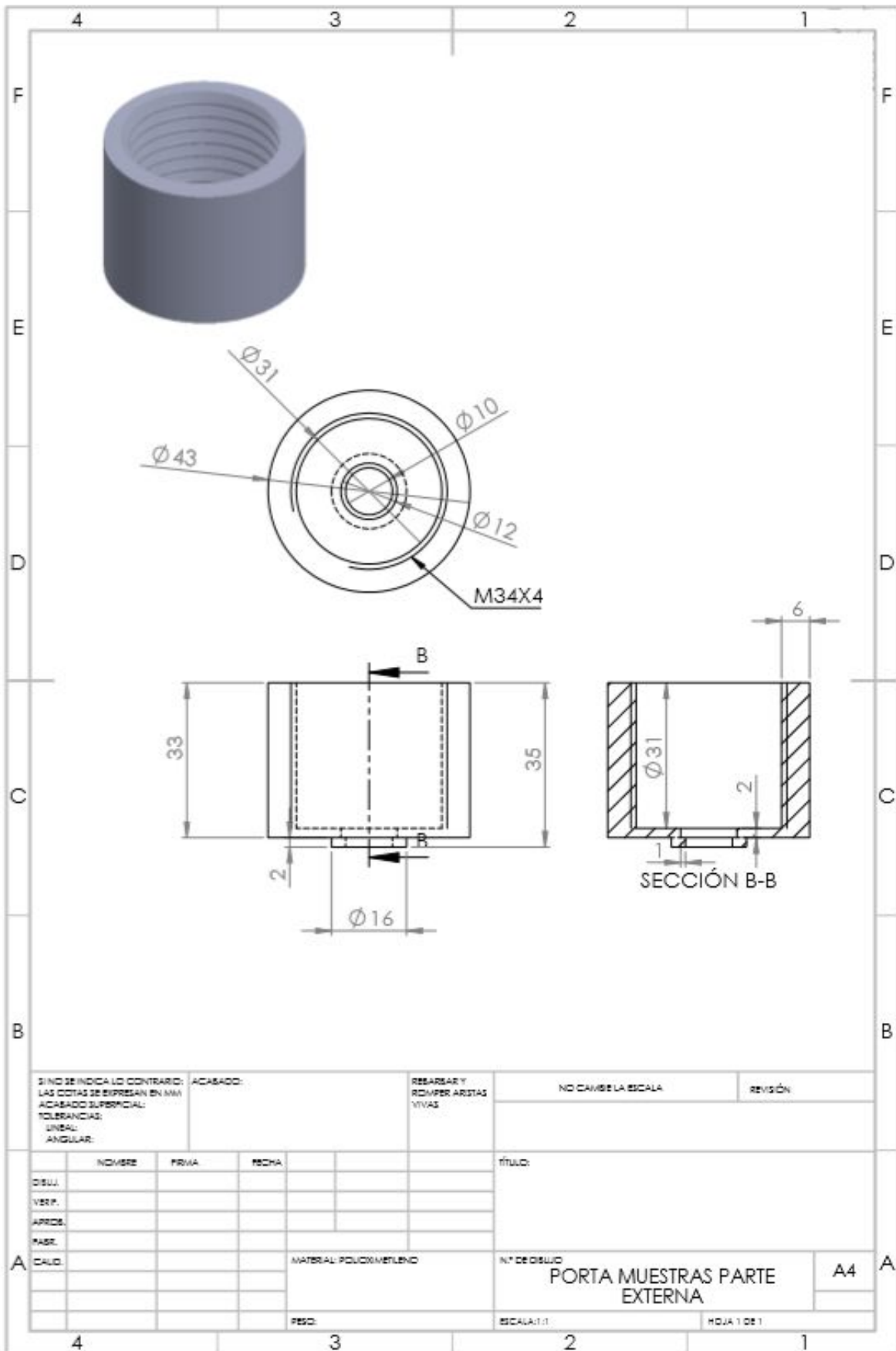
Una vez obtenido el prototipo de celda y portamuestras, se procedió a verificar el diseño a través de pruebas electroquímicas para comprobar el correcto sellado del sistema y la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Las pruebas realizadas fueron exitosas y el sistema electroquímico pudo ser empleado de forma confiable para el análisis de las muestras.



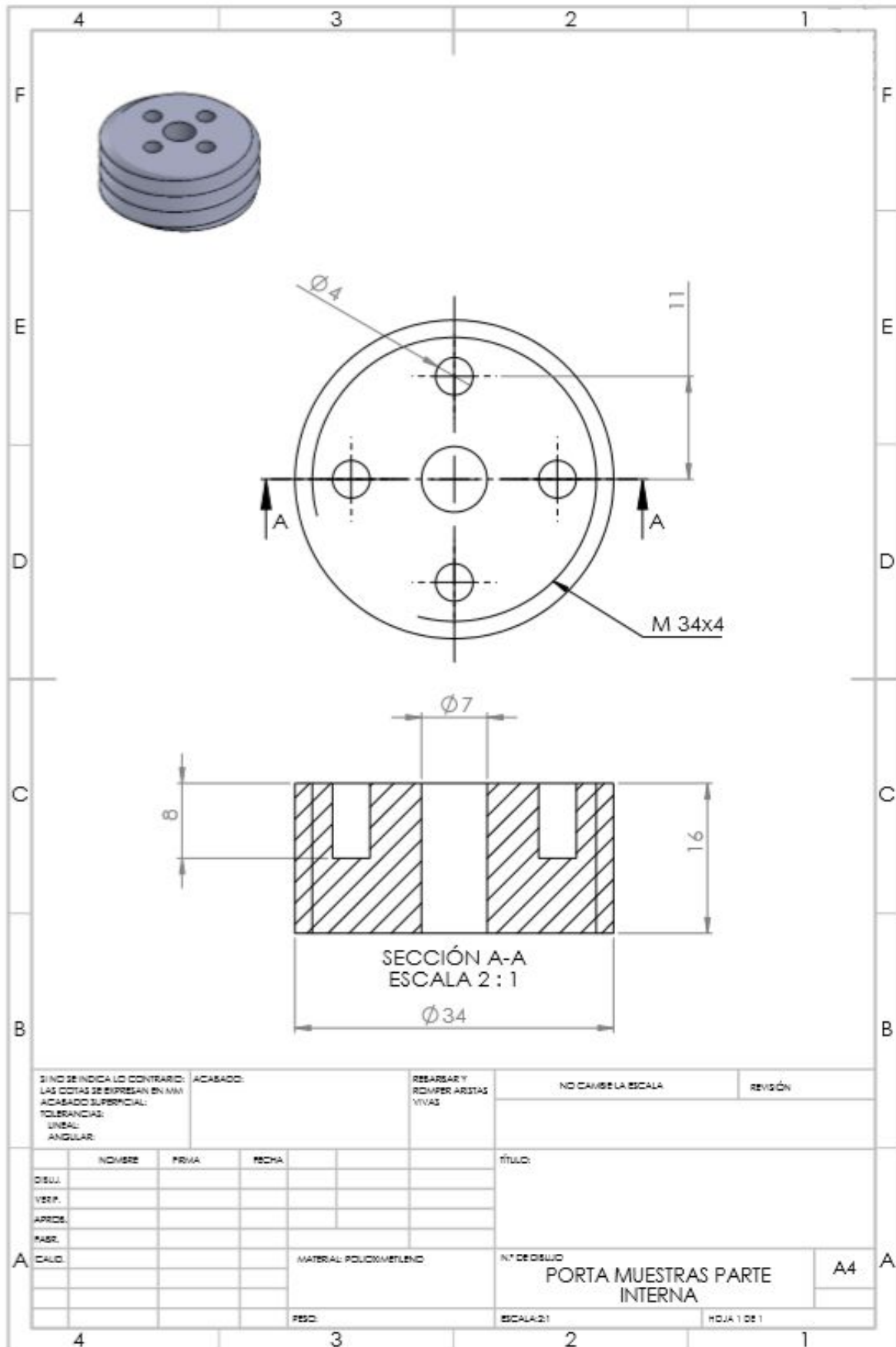
SI NO SE INDICA LO CONTRARIO: LAS COTAS SE EXPRESAN EN MM ACABADO SUPERFICIAL: TOLERANCIAS: LINEAL: ANGULAR:		ACABADO:	REBASAR Y ROMPER ARISTAS VIVAS		NO CAMBIE LA ESCALA	REVISIÓN:
NOMBRE		PRIMA	FECHA	TÍTULO:		
DIBUJ.				VASE		
VERIF.						
APROB.						
FASE						
CAUD.	MATERIAL: VIDRIO BOROSILICATO			Nº DE DIBUJO	A4	
		PROJ.	ESCALA: 1:2	HOJA 1 DE 1		



SI NO SE INDICA LO CONTRARIO: LAS COTAS SE EXPRESAN EN MM ACABADO SUPERFICIAL: TOLERANCIAS: LINEAL: ANGULAR:			ACABADO:	RESARBY ROMPER ARISTAS VIVAS	NO CAMBE LA ESCALA	REVISIÓN
NOBRE	PRVA	FECHA			TÍTULO:	
DISUJ.					N.º DE OBJUO	
VERP.					TAPA	
APROB.						
PABR.					A4	
CALC.				MATERIAL: POLICOMETLENO	ESCALA: 1:2	
				FECD:	HOJA 1 DE 1	



SI NO SE INDICA LO CONTRARIO: LAS COTAS SE EXPRESAN EN MM ACABADO SUPERFICIAL: TOLERANCIAS: LINEAL: ANGULAR:			ACABADO:		REBARBAR Y REDIMPER ARISTAS VIVAS	NO CAMBIE LA ESCALA		REVISIÓN
NOVISE			PRIMA	FECHA		TÍTULO:		
DIJL						Nº DE DIBUJO PORTA MUESTRAS PARTE EXTERNA		
VERP.								
APROB.								
PASR.								
CAUD	MATERIAL: POLICIMETILENO				ESCALA: 1:1		HOJA 1 DE 1	
							A4	



SI NO SE INDICA LO CONTRARIO:
LAS COTAS SE EXPRESAN EN MM
ACABADO SUPERFICIAL:
TOLERANCIAS:
LINEAL
ANGULAR:

ACABADO:

REBARBAR Y
ROMPER ARISTAS
VIVAS

NO CAMBIE LA ESCALA

REVISIÓN

	NOMBRE	PRIMA	FECHA
DISUJ.			
VERIF.			
APROB.			
FABR.			
CAUD.			

TÍTULO:	
N.º DE DISEÑO	
PORTA MUESTRAS PARTE INTERNA	
MATERIAL: POLICARBONATO	A4
PESO:	ESCALA: 2:1
	HOJA 1 DE 1