

FACULTAD
de INGENIERÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA

Biofuncionalización de circonio anodizado con potencial aplicación en el campo biomédico

PROYECTO FINAL DE CARRERA

ALUMNA

Valentina Mariscotti Cumino

DIRECTORA

Dra. Silvia Ceré

CO-DIRECTORA

Dra. Florencia Tano de la Hoz

Ingeniería en Materiales – UNMdP | División Electroquímica Aplicada – INTEMA – CONICET

- diciembre 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/).

AGRADECIMIENTOS

Primero y principal quiero agradecer a mis directoras, Silvia Ceré y Florencia Tano de la Hoz, por la valiosa y desmedida ayuda que me dieron desde el primer día hasta este preciso instante. Agradecerles, y también a María Rosa Katunar, por integrarme al equipo con ese amor y alegría que las caracteriza. Por haberme dado la oportunidad de aprender de todo su conocimiento y experiencia, por acompañarme durante la realización de este Trabajo Final permitiéndome equivocarme y ayudándome a salir adelante cada vez que no supe cómo, simplemente gracias.

Muchísimas gracias a todos los profesionales y técnicos que colaboraron o de alguna manera participaron de este proyecto, especialmente a Andrea Gómez Sánchez del CCT CONICET de Córdoba, por el apoyo en la obtención y discusión de los espectros XPS.

A Luciana Barbini y Melisa Micheletti del Departamento de Química de la FCEyN, por la ayuda para realizar de los estudios *in vitro* de cultivo celular.

A Diego Colombo del Grupo de Tecnología Mecánica, por el apoyo en la obtención de los perfiles de rugosidad.

A Rubén Beramendi del Taller de Tornería y Pablo Kalafatovich del Taller de Vitroplastía del INTEMA, por su trabajo en la construcción de la celda electroquímica.

A Sabrina Carrizo Angélico, por la asistencia en la obtención de los espectros Raman, así como también a Raúl Procaccini y los demás integrantes la División Electroquímica Aplicada del INTEMA, por haber estado ahí para ayudarme.

Les agradezco un montón a mi mamá Andrea, y a mi papá Diego, a Mirta, a Mauro y a mis hermanos Lorenzo y Augusto por asegurarse de que no me falten las palabras de aliento y por darme una mano cada vez que me hizo falta, sin necesidad que se los pida.

A mis amigos del colegio, siempre presentes, a esos amigos de la vida y a mis amigos de la facultad que ojalá no me dejen nunca. No sé qué haría sin todos ustedes. Imposible mencionarlos a todos pero Mili, Sofi, Rodri y Nacho se merecen el cielo de solo haberme aguantado. Y en especial quiero reconocer y agradecerle a Jupe no por las tantas crisis y catarsis compartidas, pero por haberme impulsado durante toda la carrera.

Por último agradezco a la Universidad Nacional de Mar del Plata y no quiero dejar de extender mi gratitud a los jurados, por su flexibilidad y buena predisposición ante esta situación particular.

Gracias de todo corazón.

RESUMEN

Debido a su biocompatibilidad y a que posee propiedades mecánicas adecuadas, el circonio (Zr) es uno de los metales que puede ser utilizado para la fabricación de implantes ortopédicos y dentales. El Zr y algunas de sus aleaciones presentan muy baja citotoxicidad, en algunos casos incluso menor a la del titanio, y tienen además la capacidad de promover la oseointegración. El buen comportamiento *in vivo* del Zr ha sido atribuido a la presencia de una capa de óxido superficial protector que se forma en contacto con aire o electrolitos oxigenados. Esta película superficial disminuye ampliamente la velocidad de corrosión del metal, minimizando la liberación de iones al medio biológico. Entre las diferentes estrategias para la modificación de superficies, el anodizado es un método económico que se ha utilizado ampliamente para obtener una capa de óxido uniforme con el objetivo de mejorar el desempeño de implantes en servicio. En trabajos anteriores, este tratamiento electroquímico ha sido realizado sobre Zr puro, demostrando que la anodización en ácido fosfórico modifica la topografía y aumenta el espesor de ZrO_2 nativo junto con la incorporación de P en la estructura del óxido. Esto, a la vez que mejora resistencia a la corrosión, puede inducir la precipitación de compuestos de Ca-P sobre la superficie del ZrO_2 . Además, las pruebas *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la superficie de ZrO_2 creada por oxidación anódica a 60 V mejora la adhesión y proliferación celular y la integración del material al tejido óseo. En la última década, numerosos estudios se han centrado en controlar la interacción entre el tejido y el material implantado mediante la inmovilización de biomoléculas funcionales que simulan el ambiente de la matriz extracelular del tejido óseo con el fin de estimular la estabilización temprana de implantes no cementados. A pesar de las reconocidas ventajas de los implantes biofuncionalizados, esta estrategia todavía no había sido aplicada a implantes de circonio.

En este trabajo se presenta el comportamiento de Zr anodizado modificado superficialmente con péptidos bioactivos (péptidos RGD) como potencial material de fabricación de implantes oseointegrables. Para tal fin, muestras de Zr 702 fueron anodizadas durante 60 min en solución H_3PO_4 1 mol.L⁻¹ y a un potencial constante de 60 V respecto del electrodo auxiliar. El proceso de funcionalización se realizó utilizando silanos (APTES) como agentes de acoplamiento para formar un enlace químico entre el metal y las moléculas orgánicas. Las superficies de Zr anodizado (Zr60, control) y Zr funcionalizado (Zr60RGD) se caracterizaron en soluciones que simulan fluidos corporales (SBF). El estudio se llevó a cabo por medio de diferentes técnicas de caracterización, que incluyen

espectroscopía Raman, espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS), microscopía electrónica de barrido (SEM), perfilometría mecánica y ángulo de contacto estático. Asimismo, se determinó el comportamiento electroquímico de ambas superficies (Zr60 y Zr60RGD) en SBF por medio de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y curvas de polarización. Para ello, se diseñó y construyó una celda electroquímica a fin de realizar los ensayos a temperatura controlada y con exposición de un área seleccionada. Por último, se evaluó la biocompatibilidad del material en un modelo celular *in vitro*.

El análisis de la superficie Zr60 por espectroscopía Raman mostró que la estructura cristalina del óxido formado por anodización es predominantemente monoclinica. A su vez, se identificó un pico cercano a los 1000 cm^{-1} que es atribuible a la presencia de P en la estructura del óxido. El estudio por XPS mostró la presencia de péptidos en la superficie después de la funcionalización, aunque es probable que la deposición de la película orgánica no haya sido uniforme. El análisis mediante SEM mostró que la película anódica que se observa tanto en Zr60 como en Zr60RGD es compacta, cubre completamente la muestra y presenta una morfología irregular. En ninguna de las superficies se observaron diferencias apreciables luego de 48 h de inmersión en SBF. El análisis de los parámetros de rugosidad indicó que la superficie de Zr60RGD resulta ligeramente más rugosa en dirección a las líneas de pulido y menos anisotrópica respecto del control. Además, se estimó un aumento de la energía libre superficial luego del anclaje peptídico.

Se realizaron pruebas electroquímicas en SBF para determinar el efecto de la funcionalización sobre la resistencia a la corrosión del Zr anodizado. Los resultados indicaron que tanto las superficies anodizadas como las funcionalizadas con péptidos RGD presentan una excelente resistencia a la corrosión en SBF después de 48 h de inmersión. Los resultados de EIS evidenciaron que ambas superficies se comportan como capacitores no ideales, característico de las películas pasivas formadas sobre metales de estas características como Ta, Hf, Nb y Ti. Finalmente, mediante SEM se observó mayor adhesión y extensión celular sobre las muestras de Zr60RGD en comparación con el material sin el recubrimiento peptídico.

De este modo, los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento de funcionalización con péptidos RGD no provoca ningún efecto perjudicial sobre el óxido anódico formado sobre el Zr durante la anodización y, a su vez, aumenta la biocompatibilidad *in vitro* del material a tiempos cortos. Estos resultados sugieren que la inmovilización de péptidos RGD sobre piezas de Zr anodizado representaría una estrategia óptima para promover e incrementar la bioactividad del material y con ello la oseointegración de implantes fabricados a base del mismo.

ÍNDICE

1. Introducción	8
1.1. Biomateriales	8
1.2. Uso de metales en biomedicina	10
1.2.1. Fenómenos de corrosión	11
1.2.2. Resistencia a la corrosión de biomateriales metálicos	12
1.2.3. Pasivación por oxidación anódica	13
1.3. Implantes permanentes ligados al sistema óseo	13
1.3.1. Metales para implantes permanentes	15
1.3.1.1. Circonio.....	16
1.3.1.2. Circonio anodizado	17
1.4. Bioactividad de implantes ligados al tejido óseo.....	18
1.4.1. Regeneración del tejido óseo.....	18
1.4.2. Bioactivación de superficies metálicas	19
1.4.2.1. Biofuncionalización con péptidos RGD.....	20
1.5. Proceso de aprobación de materiales para su uso en biomedicina	22
1.5.1. Estudios de biocompatibilidad en SBF	22
1.5.2. Estudios in vitro de cultivo celular	23
1.6. Propiedades y técnicas de caracterización de materiales	24
1.6.1. Características físicas de la superficie	24
1.6.1.1. Ángulo de contacto estático	24
1.6.1.2. Rugosidad superficial	25
1.6.1.3. Microscopía electrónico de barrido (SEM)	29
1.6.2. Composición química de la superficie	30
1.6.2.1. Espectroscopía Raman.....	30

1.6.2.2.	Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS).....	31
1.6.3.	Comportamiento electroquímico	31
1.6.3.1.	Resistencia a la polarización	32
1.6.3.2.	Espectroscopía de impedancia electrostática (EIS).....	32
1.6.3.3.	Curvas de Polarización	35
2.	Objetivos e hipótesis de trabajo	36
2.1.	Objetivo general.....	36
2.2.	Objetivos específicos.....	37
2.3.	Hipótesis de trabajo.....	37
3.	Materiales y métodos	38
3.1.	Materiales de partida.....	38
3.1.1.	Sustrato base.....	38
3.1.2.	Biomolécula funcional.....	38
3.2.	Modificación del material de base	38
3.2.1.	Preparación de la superficie.....	38
3.2.1.1.	Remoción del óxido natural.....	38
3.2.1.2.	Anodizado	39
3.2.2.	Biofuncionalización.....	40
3.3.	Evolución del material en fluido corporal simulado	41
3.3.2.	Ensayos <i>in vitro</i> en SBF.....	43
3.4.	Caracterización de la superficie	43
3.4.1.	Evaluación de las propiedades fisicoquímicas	43
3.4.1.1.	Técnica de espectroscopía Raman	43
3.4.1.2.	Técnica de espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)	44
3.4.2.	Observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	44
3.4.3.	Determinación de los principales parámetros de rugosidad superficial	45

3.4.4. Medición del ángulo de contacto estático	45
3.5. Determinación del comportamiento electroquímico del material	46
3.5.1. Resistencia a la polarización (Rp).....	46
3.5.2. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	47
3.5.3. Curvas de polarización	47
3.5.4. Diseño y construcción de una celda electroquímica	47
3.6. Evaluación de la viabilidad celular	49
3.6.1. Cultivo celular	49
3.6.2. Técnica de microscopía electrónica de barrido	49
4. Resultados y discusión	50
4.1. Caracterización de la superficie	50
4.1.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas	50
4.1.1.1. Espectroscopía Raman.....	50
4.1.1.2. Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS).....	54
4.1.2. Inspección visual de la superficie al microscopio de barrido electrónico	59
4.1.3. Análisis de la rugosidad superficial	62
4.1.4. Interpretación del ángulo de contacto estático medido.....	65
4.2. Evaluación del comportamiento electroquímico del material	68
4.2.1. Resistencia a la polarización (Rp).....	68
4.2.3. Curvas de polarización potenciodinámicas	72
4.3. Evaluación de la biocompatibilidad	72
4.3.1. Evolución del material tras la inmersión en SBF.....	72
4.3.2. Ensayos <i>in vitro</i> de viabilidad celular	73
5. Análisis económico	76
5.1. Introducción al análisis de factibilidad económica	76
5.2. Definición del mercado objetivo.....	77

5.3. Ingeniería de la producción	77
5.4. Análisis de costos.....	79
5.5. Determinación del precio de venta.....	80
5.6. Conclusiones sobre la rentabilidad.....	80
6. Consideraciones finales y conclusión.....	81
7. Trabajo futuro	83
REFERENCIAS.....	84
Anexo I	102
Planos: Hoja n°1.....	103
Planos: Hoja n°2.....	104
Planos: Hoja n°3.....	105
Planos: Hoja n°4.....	106
Planos: Hoja n°6.....	108
Planos: Hoja n°7.....	109
Anexo II.....	110
Anexo III	111

1. Introducción

En las últimas décadas, la demanda de implantes dentales y ortopédicos ha crecido rápidamente y de manera constante a nivel mundial [1]. El valor del mercado global de implantes ortopédicos en 2015 era de 4.3 billones de dólares, y se estimaba entonces que continuaría creciendo a razón de un 3% anual hasta 2020 [2]. Este incremento se debe en parte a que el aumento de la esperanza de vida y consecuente envejecimiento de la población mundial implicó un grave aumento de las enfermedades y afecciones musculoesqueléticas como fracturas, osteoporosis y metástasis óseas [3]. Por otro lado, los avances en la cirugía ortopédica han logrado que el reemplazo articular sea una opción viable para tratar pacientes jóvenes con afecciones óseas degenerativas, pero cuanto más joven el paciente más probable que requiera una o más operaciones de revisión en el futuro, con todos los riesgos que esto conlleva, ya que los metales que se usan actualmente tienen una expectativa de vida útil de entre 10 y 15 años, luego de lo cual el riesgo de falla y la probabilidad de requerir una cirugía de revisión se tornan muy elevados [4-6]. Como resultado, el desarrollo e investigación de la industria biomédica de medicina regenerativa e ingeniería de tejido óseo se impulsa actualmente con amplias expectativas económicas, de salud y tecnología.

1.1. Biomateriales

El término “biomaterial” ha sido redefinido en numerosas ocasiones. En líneas generales, todas las definiciones asocian el prefijo ‘bio’ con la idea de ‘introducirlo en la vida’ (y no con extraerlo de ella) por lo que desde sus orígenes hasta el día de hoy, el concepto de biomateriales está ligado al cuidado de la salud e involucra la interacción con tejidos y fluidos biológicos. Paralelamente, la ciencia de los materiales evolucionó a tal punto que el concepto de ‘material’ se abrió más allá del convencional objeto sólido, tangible, obtenido por los métodos de procesamiento clásicos. En la actualidad, puede entenderse como biomaterial a “cualquier sustancia o combinación de sustancias, distinta de las drogas, de origen sintético o natural, que pueda ser utilizada por cualquier período de tiempo, que aumente o reemplace parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, para mantener o mejorar la calidad de vida del individuo”, según el Instituto Nacional de Salud Estadounidense (NIH) [7]. Por su parte, las definiciones propuestas por David F.

Williams a lo largo de los últimos 20 años [8-10] giran torno a dos características esenciales:

- son materiales diseñados (generalmente por ingeniería) para dirigir tratamientos terapéuticos o diagnósticos;
- interactúan controladamente con sistemas vivos y así conducen dichos procesos.

En cuanto a sus características, los materiales utilizados para la fabricación de dispositivos médicos implantables, así como su diseño, deben cumplir requisitos de resistencia y composición dados por la aplicación que tendrá dicho dispositivo. Estos requerimientos que deben satisfacer no son sólo físicos y mecánicos, sino también de índole química y biológica. Estrictamente, los dispositivos biomédicos deben presentar dos cualidades básicas: biofuncionalidad y biocompatibilidad [11, 12]. La primera implica tener capacidad de sustituir una función particular o de desempeñar una tarea específica en el cuerpo humano con respecto a un objetivo terapéutico. Por otra parte, la biocompatibilidad se define como la capacidad del material de generar una respuesta biológica aceptable durante el tiempo y modo de contacto que involucre su aplicación. Esto significa que no se produzca el rechazo del dispositivo implantable por parte del sistema inmune del organismo receptor, y que la toxicidad y los posibles efectos indeseables tanto locales (en el entorno del implante) como sistémicos (inducidos sobre otros órganos o partes del cuerpo) sean nulos o a lo sumo mínimos [13, 14]. Se entiende por efectos indeseables procesos inflamatorios, reacciones alérgicas, necrosis del tejido circundante, desarrollo de trombos y/o tumores cancerígenos, entre otros [15]. En estos casos al material se lo clasifica como “tóxico” y no es apto para su uso en biomedicina.

Según cómo sea de favorable la respuesta biológica que exhiba el organismo ante la presencia de un implante, los biomateriales se clasifican en inertes, bioactivos y biodegradables [16, 17]. El comportamiento “inerte” está caracterizado por la formación de una delgada cápsula fibrosa acelular que prácticamente no se adhiere al tejido circundante, por lo que la respuesta inmune es mínima [18]. En cuanto a los biomateriales bioactivos, estos son capaces de inducir respuestas biológicas específicas en la interfaz implante-tejido de forma controlada [18, 19]. Se profundizará acerca de esta característica en la sección 1.4. Por su parte, los biomateriales biodegradables inciden sobre la interfaz desencadenando la reabsorción del propio implante a través de una descomposición química controlada cuyos productos no resulten tóxicos y puedan ser

eliminados metabólicamente [20]. De este modo, el material extraño al organismo es gradualmente reemplazado por la regeneración del tejido, hasta el punto en el cual, idealmente, no se distinga el sitio de la implantación del resto del organismo huésped [19, 21].

La selección de un material para su utilización en el campo biomédico va a depender principalmente de una serie de factores que contemplan la aplicación específica para la cual se destina al implante, el lugar de implantación, por cuánto tiempo permanecerá implantado (temporal o permanentemente), la naturaleza de las sollicitaciones mecánicas y esfuerzos a los cuales va a estar sometido, entre otros. A modo general, los metales y sus aleaciones son ampliamente utilizados para aplicaciones que requieran soporte de cargas mecánicas elevadas. Los cerámicos, en cambio, no son funcionales si se los somete a grandes esfuerzos mecánicos que no sean puramente compresivos pero pueden ser usados como relleno o recubrimientos, dada su elevada dureza y excelente resistencia al desgaste. Por último, los polímeros se utilizan para el reemplazo de tejidos blandos y todo tipo de aplicaciones biomédicas no estructurales. Al presente, la investigación en biomateriales se centra en obtener la combinación adecuada de propiedades fisicoquímicas y biomecánicas para mejorar la eficacia del tratamiento y reducir, en la medida de lo posible, los tiempos de recuperación [15].

1.2. Uso de metales en biomedicina

A lo largo de la historia, se utilizaron todo tipo de materiales diferentes con objetivos médicos y/o terapéuticos. Particularmente, los metales resultan atractivos por sus buenas propiedades mecánicas en términos de tensión de fluencia, ductilidad, maleabilidad, resistencia a la fatiga y por su buena conductividad eléctrica, pero en especial por su tenacidad a la fractura [12, 15, 22, 23]. A ello se suma una excelente conformabilidad, siendo posible fabricar dispositivos médicos de formas simples y complejas con relativa facilidad, a partir de técnicas de fabricación bien establecidas y ampliamente disponibles como son la fundición, la forja y el mecanizado [15, 23]. Debido a estas propiedades, los metales son, aún al día de hoy, los biomateriales de elección en aplicaciones donde es indispensable brindar estabilidad y soporte mecánico inmediato [3]. Los principales campos de aplicación de los metales en biomedicina son la ortopedia y la odontología. Estos son utilizados en tratamientos de restauración dentaria, reemplazo de articulaciones, tratamiento de fracturas con dispositivos de fijación y cirugías ortopédicas en general [3, 22]. Asimismo, los biomateriales metálicos son utilizados como dispositivos

cardiovasculares (válvulas cardíacas artificiales, conductos sanguíneos y otros componentes de dispositivos de asistencia cardíaca) e implantes neurovasculares (clips de aneurisma, por ejemplo). Por otra parte, su buena conductividad eléctrica favoreció el uso de metales en dispositivos de estimulación neuromuscular, siendo el ejemplo más común los marcapasos cardíacos.

En su gran mayoría, los metales y aleaciones satisfacen cómodamente los requerimientos biofuncionales estructurales [3]. Sin embargo, la selección de biomateriales metálicos es muy limitada ya que solo unos pocos metales cumplen con el requisito de biocompatibilidad [12]. La presencia de electrones libres en su estructura hace que la mayoría de los metales sean muy reactivos [15], de manera que al encontrarse con el entorno fisiológico, que es severamente corrosivo y hostil, a la vez que extremadamente sensible a especies extrañas, el resultado de dicha interacción lleva a la degradación del metal [12] y, a excepción de los metales biodegradables, los fenómenos de corrosión y degradación son considerados perjudiciales y conducen al rechazo del implante por parte del organismo [14]. En vistas que el alcance del presente trabajo se circunscribe a implantes permanentes, las pertinencias a implantes biodegradables no serán tratadas o tenidas en cuenta en los análisis que siguen a continuación.

1.2.1. Fenómenos de corrosión

La corrosión es el resultado destructivo de la reacción química entre un metal o aleación y el medio que lo rodea. Prácticamente todos los procesos corrosivos comprenden la transferencia de carga electrónica entre el ánodo (sitio donde ocurren las reacciones de oxidación) y el cátodo (sitio donde ocurre la reducción de especies químicas) en soluciones acuosas que actúan como electrolito transportando iones. Las reacciones de corrosión en medio acuoso se consideran un fenómeno electroquímico y son termodinámicamente factibles bajo casi cualquier condición, ya que lleva a las especies involucradas a un estado de mínima energía. Consecuentemente, el deterioro de metales y aleaciones por fenómenos de corrosión se podría minimizar controlando su velocidad de corrosión. Al entrar en contacto con agua o aire, muchos materiales metálicos experimentan naturalmente un proceso conocido como pasivación dado por la aparición de una delgada película protectora de óxido (producto de la corrosión). Este proceso disminuye la reacción de disolución del ánodo, provocando una fuerte caída en la velocidad de corrosión para un dado valor de potencial. Sin embargo, este recubrimiento pasivo puede

romperse y desencadenar la corrosión a altas velocidades en áreas muy pequeñas (corrosión localizada) atentando contra la integridad estructural de la pieza [24].

Al colocar un implante en el cuerpo, el material entra en contacto con fluidos corporales extracelulares, en presencia de iones cloruro en concentraciones iguales a 113 meq.L^{-1} para el plasma sanguíneo y 117 meq.L^{-1} para el líquido intersticial [12, 25]. Para los metales este entorno ya es severo, pero a su vez, a la naturaleza químicamente corrosiva de los fluidos corporales se suma que los aminoácidos y proteínas del líquido extracelular influyen considerablemente sobre la corrosión, acelerando el proceso [12, 26]. Esto hace que ningún biomaterial metálico sea completamente inerte *in vivo* sino que son todos susceptibles, en mayor o menor medida, a la corrosión [26, 27]. Dicho fenómeno es una de las posibles causas de falla no tanto por el deterioro a la integridad estructural del implante sino por la liberación de los productos de corrosión al tejido circundante dada por la disolución del material [12, 27]. Cuando las partículas o iones metálicos se liberan de la superficie del implante, pueden migrar sistémicamente, permanecer en los espacios intercelulares cerca del sitio donde fueron liberados, combinarse con biomoléculas como proteínas y enzimas o ser absorbidos por macrófagos [25-27]. En altas concentraciones, o a tiempos largos, este fenómeno puede interferir en los procesos fisiológicos y ejercer un efecto tóxico sobre el organismo [15, 25].

1.2.2. Resistencia a la corrosión de biomateriales metálicos

En su mayoría, los metales que presentan una resistencia a la corrosión aceptable para su empleo como biomateriales poseen y conservan *in vivo* una película de óxido pasiva nativa que los protege del ataque electroquímico [28]. Existen también algunos otros metales compuestos por elementos más nobles que no dependen de la formación de una película pasiva y que aun así son biocompatibles y aptos para ser utilizados como implantes quirúrgicos o dispositivos dentales (por ejemplo, oro y platino). Por el contrario, los metales que sí dependen de la protección pasiva de una película de óxido son extremadamente reactivos en entornos que contienen oxígeno. Dado que muchas veces la protección nativa resulta insuficiente, debe recurrirse a modificaciones superficiales para optimizar las propiedades del implante y maximizar su bioactividad [29]. En este sentido, es posible aprovechar ventajosamente la característica reactividad de estos materiales para formar espontáneamente películas de óxido densas y bien adheridas sobre su superficie. Las mismas actuarán como una barrera efectiva al transporte iónico y electrónico. Son varios los métodos por los cuales se puede modificar la superficie de

biomateriales mecánicos, estos incluyen tratamientos químicos (con ácidos o álcalis), procesos electroquímicos como la oxidación anódica, procesos sol-gel y deposición física o química en fase de vapor, y tratamientos térmicos (oxidación por aire) y constituyen el paso final en la fabricación de implantes a partir de estos metales [2, 22, 23].

1.2.3. Pasivación por oxidación anódica

El anodizado es una técnica electroquímica simple, de bajo costo, aplicable a todo tipo de geometría y tamaño de pieza, mediante la cual se forma una película de óxido compacta y estable, de mejores propiedades (incremento de espesor, disminución de la porosidad) que el óxido nativo formado naturalmente sobre la superficie del metal. La biocompatibilidad de los implantes metálicos, tanto en términos de comportamiento a la corrosión como en relación a la respuesta biológica que provocan, dependerá de la composición, el espesor y la homogeneidad del óxido formado sobre la superficie [2, 28]. Entre los metales puros y aleaciones que se pueden anodizar, son de interés para el campo biomédico el titanio, el magnesio y el circonio [2].

En sí, el proceso de anodización consiste en conectar la superficie de un componente metálico como ánodo de una celda electroquímica, sumergido dentro de un electrolito acorde, mientras que un material inerte o que no interfiera en el proceso, como puede ser grafito, platino, o acero inoxidable, es utilizado como cátodo. Se aplica un potencial eléctrico entre los electrodos que fuerza el flujo de corriente en el sentido del contraelectrodo e induce una reacción de oxidación en la superficie del ánodo [2, 30]. Este proceso puede ser llevado a cabo ya sea a diferencia de potencial constante (potenciostáticamente) o a corriente constante (galvanostáticamente) [31]. Luego, el ajuste de los parámetros electroquímicos que incluyen tiempo de anodizado, voltaje o corriente aplicada, temperatura, composición y concentración del electrolito, permite tener control sobre el espesor, la morfología y la porosidad de la película anódica que se forma sobre el sustrato metálico. El espectro de la luz cambia según el nivel del óxido sobre la superficie del metal, por lo que la superficie obtenida refleja así un color característico del voltaje (o corriente) al cual fue anodizada la pieza [32].

1.3. Implantes permanentes ligados al sistema óseo

En un primer momento, los materiales empleados en la fabricación de dispositivos médicos para reemplazar tejido duro (hueso) dañado, eran aquellos disponibles en el mercado y que, como tales, estaban destinados a aplicaciones no-biomédicas,

principalmente ingeniería aeroespacial. Sin embargo, en el pasado reciente se han dedicado esfuerzos significativos en pos de desarrollar materiales que presenten mejor biocompatibilidad con el tejido óseo. El éxito del tratamiento con implantes permanentes está ligado a la prevalencia de la fijación, la cual depende en gran medida de la regeneración del hueso alrededor del dispositivo. Por consiguiente, es altamente deseable que la superficie implantada estimule el proceso de oseointegración [14], del cual se hablará más adelante (ver apartado 1.4).

El período de fijación inicial inmediato a la implantación del dispositivo médico es de vital importancia para el éxito de la cirugía. En este tiempo, el implante debe fijarse al huésped y para lograrlo existen tres métodos diferentes:

- cementando el implante en el hueso, usualmente con polimetilmetacrilato (PMMA).
- modificando la topografía del implante en la que el hueso puede crecer.
- cubriendo la superficie del implante con una sustancia bioactiva que estimule la aposición ósea.

Al contrario que para los implantes cementados, los últimos dos métodos mencionados presentan la ventaja de que el implante se fija directamente al hueso (prótesis no cementadas), evitando el uso de un material sintético de menor resistencia mecánica en la interfaz [33]. Si bien por cualquiera de las tres técnicas se logra una correcta fijación inicial, sucede que para los implantes cementados ésta es mucho más rápida, lo cual es favorable, pero no siempre se mantiene en el tiempo. Si se pierde, deja al implante ligeramente suelto, libre de realizar pequeños movimientos. Estos desplazamientos desgastan tanto al implante como al cemento y las partículas liberadas al entorno celular desencadenan una reacción inflamatoria que causa la resorción del hueso y consecuente falla del tratamiento. Este suceso comenzó a observarse en los pacientes jóvenes, ya que no solo son más activos sino que también requieren que el implante dure muchos más años [34]. Por el contrario, los implantes no cementados mantienen la cohesión con el tejido circundante con un mínimo desbalance en la distribución de la carga, ocasionando que presenten una tasa de supervivencia altamente superior [35-37]. Su principal desventaja está en que el tiempo requerido para lograr la fijación inicial es mayor, pero al cabo de este período el resultado final es mucho mejor que para las prótesis cementadas.

Dependiendo de la aplicación y de dónde esté ubicado el implante, serán los requisitos asociados al biomaterial que lo conforma. Los reemplazos de articulaciones, de huesos largos o aquellos elementos utilizados en las cirugías de fusión espinal, se requiere que brinden soporte mecánico durante toda la vida y, por lo tanto, tienen altos requisitos de osteointegración. Es importante que los implantes establezcan una unión fuerte y estable con el tejido huésped lo más rápido posible. De lo contrario, es probable que se produzca la encapsulación del mismo en un tejido fibroso, lo que posiblemente lleve a la falla del tratamiento y consecuente necesidad de remover el implante[3].

1.3.1. Metales para implantes permanentes

El uso de biomateriales metálicos como componentes estructurales de dispositivos médicos en reemplazo de tejido duro data de mucho tiempo atrás [38]. En este último tiempo, numerosas investigaciones se han centrado en Ti, las aleaciones de base Cr-Co y ciertos aceros inoxidable austeníticos, siendo estos algunos de los metales que se emplean con mayor frecuencia en contacto directo con los tejidos del organismo huésped.

Los implantes quirúrgicos de acero inoxidable más utilizados son de tipo 316 L debido a sus excelentes propiedades mecánicas y su resistencia a la corrosión asociada al alto contenido de Cr (16%) y Mo (2%), y al bajo contenido de C (<0.03%). El Ti puro y sus aleaciones tienen una resistencia similar al acero inoxidable pero son mucho más ligeros en comparación. Las aleaciones de Ti ofrecen mayor resistencia a la carga que el titanio comercialmente puro y, por lo tanto, son ideales para aplicaciones ortopédicas que requieran soporte mecánico. Al mismo tiempo, poseen un módulo de elasticidad más bajo, lo que las hace más propicias para minimizar la tensión en la interfaz [3]. El Zr es otro metal de transición con aplicaciones en biomedicina, pero aunque presenta varias propiedades en común con el Ti, su uso en este campo aún no está muy difundido [27, 39].

Los biomateriales metálicos mencionados son altamente reactivos y desarrollan rápidamente una capa de óxido al exponerse a ambientes fluidos o aire. La misma delimita la interfaz entre el entorno biológico y la estructura metálica, y regula la respuesta biológica al implante aportando pasividad al metal [26]. En términos de biocompatibilidad, el Ti y sus aleaciones, el Zr, las aleaciones Ta, Co-Cr-Mo y Co-Ni, las aleaciones de Ti-Ni y ciertos aceros inoxidable austeníticos dependen de tales capas de óxido pasivo para resistir a la corrosión. Por otra parte, se encuentran los metales Pt y Pt-Ir, las aleaciones de Au y de Pd, cuya inherente estabilidad química los vuelve resistentes a la corrosión

incluso en condiciones extremas y como tales son empleados en aplicaciones biomédicas específicas [22, 23].

1.3.1.1. Circonio

El Zr es uno de los elementos más abundantes y ampliamente distribuidos en la corteza terrestre. Se presenta en la naturaleza como óxido ZrO_2 (badelita) o asociado en muchos minerales con otros metales, formando parte de un complejo de óxidos, siendo el más común entre ellos el ZrO_4SiO_2 (circón). Se trata de un metal duro, brillante y dúctil, que funde a 1855 °C, semejante a acero inoxidable en apariencia y químicamente similar al Ti. Se puede trabajar en caliente para formar losas, varillas y lingotes fundidos por arco. Por trabajado en frío puede producirse en forma de láminas, barras, alambres y tubos. En todos los casos, su obtención debe realizarse en una atmósfera libre de vapor de agua, oxígeno y nitrógeno; pues de lo contrario el metal se vuelve quebradizo e imposible de fabricar [27, 40, 41]. En particular, cuando el circonio entra en contacto con oxígeno, la migración de iones O^{2-} hacia el seno del metal resulta en la formación espontánea del óxido cerámico ZrO_2 , obteniéndose una película rígida, de algunos nanómetros de espesor y de muy alta resistencia al desgaste [42].

Según varios autores [39, 41, 43–47] la elasticidad, resistencia a la corrosión, al desgaste y otras propiedades fisicomecánicas del Zr y sus aleaciones los convierten en materiales adecuados para ser usados en implantes biomédicos. Trabajos previos reportan el uso de los mismos en la fabricación de implantes para aplicaciones traumatológicas, ortopédicas y dentales, obteniéndose resultados muy satisfactorios [39, 43]. Aún así, al momento no se usan ampliamente en el campo de la biomedicina dado que la fabricación comercial de implantes de Zr y sus aleaciones resulta muy costosa. En su lugar, la mayor parte de los implantes metálicos se fabrican hoy en día a partir de Ti [27].

No obstante, la necesidad de mejorar la longevidad del implante en pacientes más jóvenes replantea la valoración costo-beneficio de producir dispositivos biomédicos de Zr, ya que estudios previos muestran que el Zr y sus aleaciones tienen mejor resistencia y menor susceptibilidad magnética que el Ti [48]. Respecto al óxido nativo que se forma sobre la superficie de ambos materiales de manera equivalente, estudios previos mostraron un comportamiento relativamente reactivo para el Ti, mientras que la superficie del Zr se encontraba oxidada de forma estable, señal de una película más pasiva y protectora que la exhibida por el Ti [49]. Incluso se reportó, en muchos casos, una mejor respuesta biológica

evidenciada por mayor oseointegración y menor citotoxicidad para los implantes de Zr por sobre los de Ti [22, 26, 27, 50].

1.3.1.2. Circonio anodizado

Está comprobado que el aumento del grosor y los cambios en la topografía y morfología del óxido de Zr que se originan a raíz del anodizado de la superficie propician fuertemente la respuesta ósea [51, 52]. Asimismo, se ha demostrado que la anodización del Zr puro en H_3PO_4 afecta simultánea y positivamente la química y la topografía del óxido superficial formado [53]. Trabajos anteriores *in vitro* mostraron que la modificación superficial que imparte el proceso de anodización a un potencial constante de 60 V sobre el sustrato metálico, Zr en este caso, estimula la adhesión y proliferación de células óseas [54–56]. Estudios *in vivo*, llevados a cabo 60 días luego de la cirugía de implantación, mostraron que tanto las muestras de Zr anodizado como de Zr sin anodizar estimularon el crecimiento de hueso sobre sus respectivas superficies, con la particularidad de que sobre las muestras anodizadas se evidenció una mayor tasa de aposición mineral [57]. Además, el proceso de anodizado genera un óxido relativamente homogéneo, libre de poros o fisuras, que aumenta la resistencia al desgaste de la superficie, de modo que el anodizado de Zr o sus aleaciones resulta en un material significativamente más resistente al desgaste que las análogas aleaciones de Cr-Co [41].

De esta forma, una pieza conformada por Zr puro o aleado, luego de ser anodizada, combina las propiedades de su superficie cerámica con la ventaja de poseer un seno metálico. Esto significa tener los beneficios de resistencia a la corrosión y a la fricción de los materiales cerámicos, pero sin el riesgo de fractura que presentaría la pieza si fuese íntegramente cerámica [58]. El vástago femoral de las prótesis de cadera está sujeto a fuerzas de fricción y consecuente desgaste, siendo uno de los principales factores que limitan la performance a largo plazo del implante, por lo que es fundamental reducir su velocidad de desgaste para así aumentar su prestación. Numerosos trabajos reportan que la interacción con óxido de circonio resulta en una disminución en la tasa de desgaste del polietileno de hasta 89%, en comparación con otras opciones [41, 58]. Según la Fundación Internacional de Artritis, los implantes “tradicionales” duran unos 15 años, y los fabricados en Zr anodizado tienen el potencial de durar hasta 20 o 25 años.

1.4. Bioactividad de implantes ligados al tejido óseo

Se define como material bioactivo aquel que provoca una respuesta biológica específica en la interfaz del material y como resultado genera una unión entre el tejido huésped y el biomaterial [16]. En el contexto de los implantes permanentes dirigidos al sistema óseo, se denominan bioactivos aquellos materiales que muestran adherencia directa al tejido óseo después de la implantación [59]. Esta conexión directa, estructural y funcional que se genera entre el hueso y la superficie de un implante, capaz de soportar y transferir carga, se conoce como oseointegración. La capacidad del tejido duro de retener el implante adherido dependerá fuertemente de que se regenere hueso alrededor del mismo, para lo cual es muy deseable que la superficie implantada promueva el proceso de biomineralización [14]. Numerosos estudios demostraron que aquellos implantes capaces de inducir efectivamente el proceso de oseointegración presentan una tasa de reemplazo mucho menor respecto a los materiales que presentan una integración ósea deficiente [60, 61]. Este hecho no es menor ya que las operaciones de reemplazo son más complejas técnicamente que la primera operación debido a que la presencia del implante provoca la progresiva pérdida de hueso y daño a los tejidos blandos. Esto hace que quirúrgicamente sea más difícil lograr un nuevo implante estable que posteriormente no falle [4], y por ello es tan importante prolongar la vida del implante original.

1.4.1. Regeneración del tejido óseo

El hueso se compone por una combinación de fase mineral, en la que el componente principal es hidroxiapatita (fosfato cálcico), pero también posee citratos, carbonatos, fluoruros e iones hidroxilo; y una fase orgánica que representa el 22% en peso del hueso, compuesta principalmente por colágeno, células del tejido óseo (células osteoprogenitoras, células de revestimiento óseo, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [62]) y agua (solo un 9% de la fase) [15]. Cuando esta matriz ósea se expone al líquido extracelular, como ocurre al producirse una fractura o como resultado de la cirugía de implantación, se liberan proteínas no colágenas y factores de crecimiento que activan la reparación ósea. Atraídas por el mecanismo de quimiotaxis, las células osteoprogenitoras de la médula ósea y del tejido de revestimiento óseo (endostio y periostio) migran hacia el sitio de la lesión donde proliferan y se diferencian en precursores de osteoblastos y células de revestimiento óseo. Allí, los mismos comienzan el depósito óseo en las paredes del defecto, los extremos del fragmento y posiblemente en la superficie del implante. Los osteoblastos son células formadoras de hueso diferenciadas que principio producen la matriz extracelular no

mineralizada (osteoide) y luego inducen la mineralización para proporcionar al hueso su característica rigidez [62].

La mayoría de los materiales bioactivos inducen el proceso de oseointegración a través de una capa de apatita que se forma sobre sus superficies una vez implantados. Esta apatita superficial parecería activar las mismas vías de señalización y los mismos tipos celulares que desencadenan la formación de hueso [63] ya que su composición, estructura y morfología es muy similar a la hidroxiapatita que compone al tejido óseo [64]. Las interacciones entre el implante y las células circundantes están mediadas por la producción y el depósito de proteínas de la matriz extracelular ósea sobre la superficie del biomaterial, fenómeno que se produce inmediatamente al entrar en contacto con los fluidos biológicos [15]. Estas proteínas, como el colágeno tipo I y la fibronectina, se caracterizan por presentar en su secuencia de aminoácidos el motivo RGD (argenina-glicina-arpantato). Este último actúa como sitio de anclaje entre la matriz extracelular y las células osteoblásticas, promoviendo su adhesión. Luego, los osteoblastos podrían exhibir un comportamiento similar al que presentan sobre la superficie de un hueso fracturado, esto es, proliferar y diferenciarse preferentemente para producir colágeno y apatita, regenerando el tejido [65].

Se ha demostrado ampliamente que el éxito o el fracaso del proceso de oseointegración está determinado por las características de la superficie [57]. Con el fin de obtener una superficie bioactiva que favorezca de algún modo los procesos biológicos involucrados en la oseointegración, existen distintos tipos de tratamientos superficiales destinados a modificar la topografía, la mojabilidad y/o la química de la superficie.

1.4.2. Bioactivación de superficies metálicas

Para muchas aplicaciones biomédicas en odontología, ortopedia y traumatología, los metales no son los mejores materiales en términos de bioactividad. Para compensar esta desventaja, estos son a menudo tratados superficialmente, recubiertos por algún material que promueva la oseointegración [15]. Los materiales bioactivos causan una reacción tisular favorable por dos vías alternativas. La primera consiste en establecer enlaces químicos con los componentes minerales del tejido [66] y en el pasado fue el mecanismo usado predominantemente para modificar la superficie de biomateriales metálicos. Existen en la literatura numerosos estudios que reportan resultados óptimos para implantes metálicos (en su mayoría de Ti) recubiertos por hidroxiapatita o fosfato

tricálcico [35, 67–69]. La otra vía se basa en promover la actividad celular involucrada en la formación de la matriz ósea. En la última década, la ciencia de los biomateriales se centró en el diseño y la producción de materiales biomiméticos capaces de inducir respuestas celulares específicas mejorando la formación de tejido óseo por reconocimiento molecular. Las investigaciones más recientes se han centrado en controlar la interacción entre el tejido y el material implantado mediante la inmovilización de biomoléculas funcionales que simulan el ambiente de la matriz extracelular [30, 70–75]

1.4.2.1. Biofuncionalización con péptidos RGD

Con el objetivo de fomentar la oseointegración de los implantes metálicos, una práctica ampliamente utilizada es la biofuncionalización de su superficie. Esto se logra inmovilizando moléculas bioactivas sobre la cara del material que entrará en contacto con el tejido biológico. El principio básico de la biofuncionalización consiste en encontrar un método para unir de manera estable una biomolécula a una superficie. Desde la perspectiva del dispositivo, es importante que el método de biofuncionalización utilizado no altere ni obstaculice significativamente el rendimiento del mismo. En el aspecto biológico, una de las consideraciones más importantes que debe conocerse es la orientación de la molécula. La elección del método de biofuncionalización dependerá de la superficie del sustrato, la naturaleza de la biomolécula seleccionada y las necesidades particulares de cada aplicación, pero desde ya que para lograr mantener la estabilidad del implante a largo plazo, se prefiere la unión covalente de la biomolécula [76].

Diversos estudios han logrado funcionalizar superficies con distintas moléculas biológicamente activas, tales como colágeno tipo I, celulosa de carboximetil fosfatado, péptidos con secuencias RGD, inmovilización de sulfato de condroitina, sialoproteínas y proteína morfogenética ósea Tipo 2 (BMP2) [77–84]. Al principio, las biomoléculas utilizadas eran proteínas de cadena larga de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina y laminina. Más recientemente, el uso de péptidos cortos para la funcionalización de la superficie reveló un enfoque ventajoso sobre el uso de proteínas completas. Actualmente, se ha demostrado que tras ser adsorbidas en la superficie del biomaterial, las proteínas tienden a plegarse aleatoriamente provocando, muchas veces, que el receptor no llegue a hacer contacto con el sitio de unión debido a impedimentos estéricos.

Desde un punto de vista económico, las proteínas que promueven la adhesión celular son generalmente difíciles de obtener en gran cantidad y con alta pureza. Mientras que los

péptidos biomiméticos son más accesibles, están disponibles en gran cantidad y con alta pureza, y resultan ser relativamente más estables durante los procesos de modificación superficial [85]. Entre los distintos péptidos estudiados, se destacan los resultados obtenidos con la inmovilización de péptidos cortos bioactivos RGD, llamados así porque su estructura química incluye la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-aspartato. Ciertamente, dicha secuencia se encuentra en una gran cantidad de glicoproteínas de la matriz extracelular ósea [86, 87] y posee la capacidad de inducir reacciones específicas en diferentes tipos celulares a través de la unión con sus receptores de membrana (integrinas) [88, 89]. Los trabajos citados previamente comprenden estudios *in vitro* llevados a cabo con diferentes tipos de células osteoblásticas, donde se evidenciaron mejoras en la respuesta celular sobre los materiales de superficie modificada con péptidos en comparación con superficies sin biofuncionalizar.

No existe una única técnica para funcionalizar los implantes con moléculas orgánicas, al contrario, se han propuesto diferentes métodos para adherir biomoléculas de interés a la superficie, siendo los principales la fisorción, el auto-ensamblaje de monocapas y la unión química covalente generalmente mediada por silanos. El primero de ellos presenta serias limitaciones asociadas a un pobre control de la cantidad, densidad y estabilidad de las moléculas adsorbidas, así como la pérdida de conformación de los péptidos y proteínas, con consecuencias directas sobre su bioactividad. Las técnicas de unión covalente, en cambio, posibilitan la inmovilización y la orientación específica de las moléculas sobre la superficie. Para el paso de silanización se utilizan agentes químicos llamados organosilanos que son capaces de crear un enlace entre la superficie del material y las biomoléculas de interés. Los organosilanos además de ofrecer una mayor estabilidad de la molécula inmovilizada, poseen agentes espaciadores (cadenas alquílicas) que dan lugar a un movimiento flexible de la biomolécula, lo que proporciona a la silanización una ventaja sobre las demás técnicas de biofuncionalización [70, 72, 90]. La inmovilización de péptidos en superficies metálicas previamente silanizadas ha demostrado ser exitosa, además de ser una de las técnicas más utilizadas por su alta reproducibilidad en la funcionalización de este tipo de superficie [73, 75, 91]. En la última década varios autores han demostrado que diferentes tipos de organosilanos pueden reaccionar con materiales metálicos, ofreciendo mejoras en sus enlaces con biomoléculas [72, 92]

1.5. Proceso de aprobación de materiales para su uso en biomedicina

La norma internacional que regula la evaluación de biocompatibilidad de materiales es la norma ISO 10993. La misma consta de varias partes donde se indican los ensayos a realizar en función del tiempo y tipo de contacto del biomaterial con los tejidos del organismo vivo. La realización de estos ensayos *in vitro* e *in vivo*, requiere de un laboratorio multidisciplinario especializado en los mismos, con incumbencia de profesionales de diferentes áreas, tanto de la medicina, como de la biología, veterinaria, química e ingeniería.

La primera etapa corresponde al desarrollo de nuevos biomateriales implantables, que abarca los pasos de procesamiento y de caracterización física y microestructural del material resultante. Las propiedades de rugosidad, mojabilidad y estado de oxidación de la superficie, en caso de haber sido modificada, son de suma relevancia en el campo de los biomateriales. La etapa siguiente consiste en evaluar la toxicidad y citocompatibilidad *in vitro* mediante el uso de líneas celulares específicas del tejido huésped. A continuación, deben realizarse pruebas de oseointegración *in vivo* clínicamente relevantes. Estas implican esencialmente la implantación del material en un modelo animal y la evaluación de la oseointegración. Por último se procede a realizar ensayos clínicos en pacientes humanos [15].

En el caso particular de materiales potencialmente bioactivos para uso en materia ósea, se acostumbra a realizar un ensayo de biocompatibilidad *in vitro* adicional descrito en profundidad en la sección 1.5.1.

1.5.1. Estudios de biocompatibilidad en SBF

La bioactividad de un material es comúnmente evaluada *in vitro* en relación a la tendencia o no al crecimiento de fosfatos de calcio (en particular hidroxiapatita) sobre su superficie a partir de una solución fisiológica simulada. La formación *in vivo* de compuestos de apatita sobre un biomaterial se relaciona con su capacidad de unión al hueso. Este fenómeno es reproducible *in vitro*, resultando útil para predecir la biocompatibilidad de nuevos materiales previo a los experimentos en animales [93]. No obstante, esta capacidad de los biomateriales de formar apatita similar a la hidroxiapatita ósea tras un período de inmersión en SBF no guarda ninguna relación con la biología ni la bioquímica del sistema [94]. A pesar de que su uso esté fuertemente instaurado en el campo de estudio de los biomateriales, numerosos estudios arrojaron resultados controversiales al

punto que incluso los mismos autores que impusieron y normalizaron estos ensayos cuestionan su utilidad [95, 96].

Existe un amplio espectro de soluciones que simulan los fluidos biológicos, pudiendo contener o no componentes orgánicos [14]. Por ejemplo el medio α -Eagle modificado (α -MEM) contiene numerosos componentes orgánicos como aminoácidos y vitaminas (alanina, ácido aspártico, glicina, biotina, vitamina C, ácido fólico, riboflavina) y sales inorgánicas. También se utilizan soluciones buffer como el PBS (buffer fosfato salino) que, por el contrario, imitan únicamente las concentraciones biológicas de aquellos componentes inorgánicos considerados esenciales para mantener la viabilidad celular. Otros ejemplos de esta clase son la solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y el SBF (fluido corporal simulado). Este último fue propuesto por Kokubo et al. [97] y es uno de los medios más elegidos para estudiar el comportamiento *in vitro* de biomateriales en desarrollo. De haberse depositado apatita en la superficie, su aparición puede detectarse mediante espectrometría de difracción de rayos X (XPS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman y/o microscopía electrónica de barrido (SEM) [98, 99].

1.5.2. Estudios in vitro de cultivo celular

Las interacciones entre las células y la superficie de un material afectan los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular. En primer lugar, la adhesión celular juega un papel integral en la comunicación y regulación celular, siendo un factor fundamental para el desarrollo y supervivencia de las células [65]. Por otra parte, cualquier célula que encuentre que un material es citocompatible cambiará su morfología, de modo que la observación y el análisis de la disposición celular sobre la superficie de un sustrato se considera un determinante clave para evaluar el rendimiento de un nuevo biomaterial. La morfología celular, la adhesión y la propagación proporcionan indicaciones claras sobre el comportamiento de crecimiento y las respuestas celulares apropiadas al material probado. Si una célula permanece esférica, entonces indica una falta de interacción con un sustrato o una célula no viva. Un análisis de los cambios morfológicos celulares mediante técnicas microscópicas primordial para la caracterización de biomateriales [15].

1.6. Propiedades y técnicas de caracterización de materiales

1.6.1. Características físicas de la superficie

1.6.1.1. Ángulo de contacto estático

El ángulo de contacto es un parámetro que se usa en materiales para caracterizar sus propiedades de humectabilidad. Luego, acorde a lo discutido en la sección 1.4, la medida del ángulo de contacto es un dato muy relevante para la ciencia de los biomateriales, en cuanto a que tiene implicancias sobre la biocompatibilidad de los mismos. También sirve para observar el efecto de modificaciones en las superficies [100].

Existen varias técnicas para evaluar los valores de ángulo de contacto estático. Entre ellas, el método de la gota sésil es el más utilizado debido a su simplicidad, y consiste en la medida del ángulo de contacto que se forma a ambos lados de una gota sésil y axisimétrica de un líquido en concreto del que se conoce su tensión superficial, al ser ésta depositada sobre una superficie sólida.

La forma que asume la gota depende de la acción de las fuerzas que intervienen en la línea de contacto sobre la superficie del sólido, en la que se encuentran las tres fases; sólido-líquido, líquido-gas y sólido-gas. La expresión que representa el equilibrio entre la superficie sólida y el líquido es la ecuación de Young [101]:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (1.1)$$

donde γ_{SV} , γ_{SL} y γ_{LV} son las energías superficiales sólido-vapor, sólido-líquido y líquido-vapor, respectivamente.

Los métodos más frecuentemente utilizados para el cálculo de las energías libres superficiales (SFE, por sus siglas en inglés) se basan en los enfoques de Owens-Wendt [102] y Van Oss [103]. Ambos plantean la separación de la SFE en componentes (una polar y otra dispersiva o apolar) [104]. Existe también una descripción alternativa del ángulo de contacto que está basada en un enfoque termodinámico [105], donde las tensiones interfaciales se relacionan mediante una ecuación de estado [106], que permite predecir γ_{SV} y γ_{SL} a partir de la medición del ángulo de contacto con un solo líquido. Esta aproximación no discierne a la γ_{SL} en componentes [104].

1.6.1.2. Rugosidad superficial

La superficie de todo material presenta una textura particular denominada topografía, que puede ser más o menos regular, y es producto de los procesos que se hayan llevado a cabo para su obtención. Como se mencionó en la sección 1.4, esta textura influye fuertemente sobre la interacción de las células del tejido huésped con la superficie de un implante, por lo tanto, su análisis es de suma importancia para el estudio de biomateriales.

La topografía de una superficie puede determinarse utilizando un rugosímetro, (o perfilómetro) de contacto. El principio de funcionamiento de este instrumento consiste en colocar sobre la superficie un palpador con punta cónica, llamado estilete (ver Figura 1.1) y registrar el desplazamiento vertical que sufre el mismo al realizar un barrido horizontal a velocidad constante. Estos desplazamientos se convierten luego en señales eléctricas, con la ayuda de un transductor, que son amplificadas y transmitidas a un monitor.

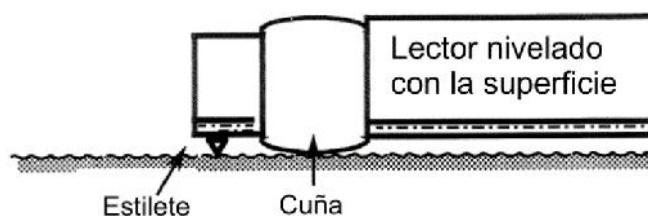


Figura 1.1 - Principio de funcionamiento [107]

A priori, esta medición no discrimina entre la rugosidad de la superficie dada por los pequeños surcos que dejan los agentes que atacan la superficie en el proceso de mecanizado y posteriores tratamientos superficiales; y la ondulación propia del alabeo del sustrato u otras irregularidades de escala más bien mayor. Por lo tanto, en el tratamiento analítico de los datos se determina un perfil de ondulación que se excluye del perfil medido de forma directa y de esta forma se obtiene el perfil de rugosidad (ver apartado 4.1.3). Para su evaluación se define una longitud de corte o de muestreo ("cut off") en base al proceso de acabado empleado y a la rugosidad esperada, según la norma ISO 4288. El software luego se vale de esta longitud de corte para extraer el perfil de rugosidad a partir del de ondulación [107, 108]. La longitud de evaluación puede contener una o más longitudes de muestreo (ver Figura 1.2). Para evaluar correctamente la rugosidad de una superficie la longitud de evaluación debe ser cinco veces la longitud de muestreo y la longitud total de recorrido del palpador debe ser seis veces la longitud de muestreo para

descartar los extremos inicial y final del recorrido donde el palpador se está acelerando o deteniendo [107, 108].

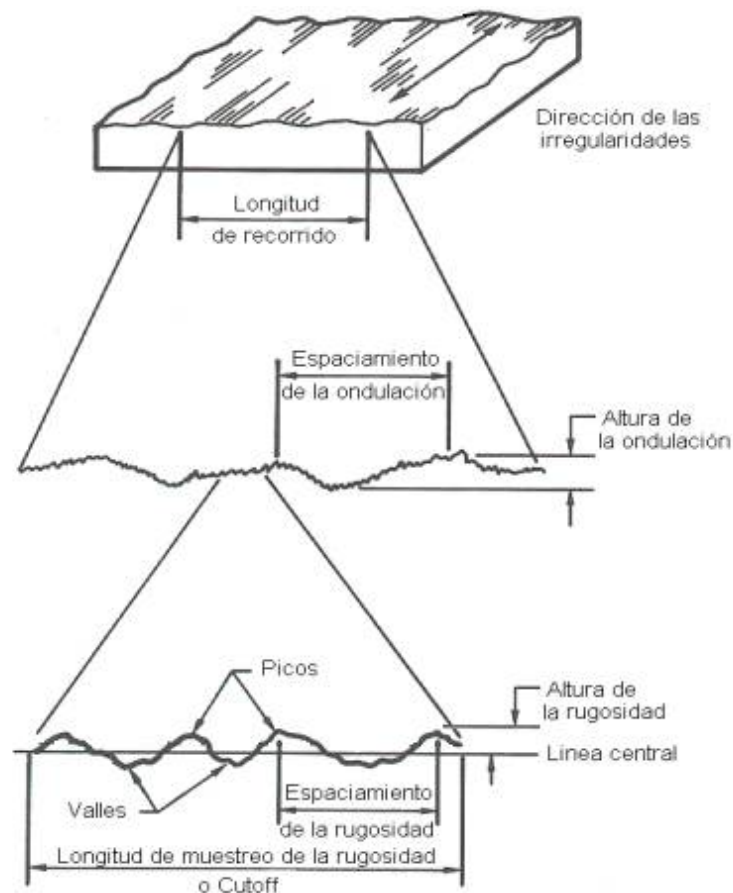


Figura 1.2 - Ondulación y rugosidad de la topografía de superficie.

A partir del perfil de rugosidad, el equipo de medición otorga información cuantitativa de las características superficiales del material a través de definiciones abstractas basadas en líneas de referencia que solo existen como una construcción teórica, como la línea central o línea media. Conceptualmente, la línea media vendría a ser una línea ubicada sobre el perfil de rugosidad de manera tal que el área que encierra la curva del perfil de rugosidad con dicha línea media, por encima y por debajo de ésta, es exactamente la misma [108]. Los parámetros de rugosidad se definen en base a la línea media y se clasifican en parámetros de amplitud, de espaciado, o híbridos, según si miden la profundidad de la rugosidad (es decir, la altura vertical de los picos y valles), si son una medida de las desviaciones horizontales de la topografía, o bien una mezcla de ambos, respectivamente.

Los parámetros más utilizados en la caracterización de rugosidad de superficies son los parámetros de amplitud R_a (rugosidad media aritmética) y R_z (rugosidad media). En el

presente trabajo también se incluye un análisis del parámetro Rq (rugosidad cuadrática media) también conocido como RMS, por sus siglas en inglés [107-109].

- Ra es el parámetro universalmente reconocido y por lo tanto más frecuentemente hallado en la literatura. Se define como la media aritmética de la suma de los valores absolutos de las ordenadas de los puntos del perfil de rugosidad en relación a la línea media dentro de la longitud de medición (Ecuación 1.2), lo cual se explica gráficamente en la Figura 1.3 [109].

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (1.2)$$

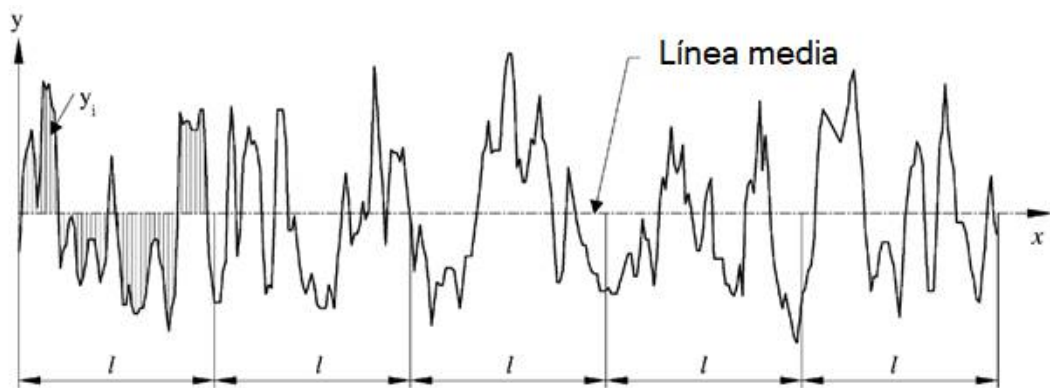


Figura 1.3 - Definición del parámetro Ra [109]

Se trata de un parámetro muy útil cuando se desea realizar una evaluación rápida dado lo fácil que es su obtención. Sin embargo, presenta algunas desventajas como que al estar dado por la media de la rugosidad, un pico o valle no típico en una superficie alteraría el valor de la medida, no representando fielmente el valor medio de la rugosidad. Además, el valor de Ra no define la forma de la irregularidad del perfil, por lo que se pueden obtener valores de Ra prácticamente iguales para superficies con procesos de acabado diferentes [108, 110]. Por este motivo suele reportarse en conjunto con otros parámetros complementarios.

- Rz se calcula a la suma de las ordenadas (en valor absoluto) de los puntos más alejados de la línea media dentro de cada longitud de corte (Ecuación 1.3). Siendo p_i y v_i la distancia a la línea media de los puntos máximos y mínimos del perfil,

respectivamente (Figura 1.4), luego, R_z será la media aritmética de n pares de valores de distancia pico-valle comprendidos en el recorrido total de la longitud de medición [109].

$$R_{z(ISO)} = \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n p_i - \sum_{i=1}^n v_i \right) \quad (1.3)$$

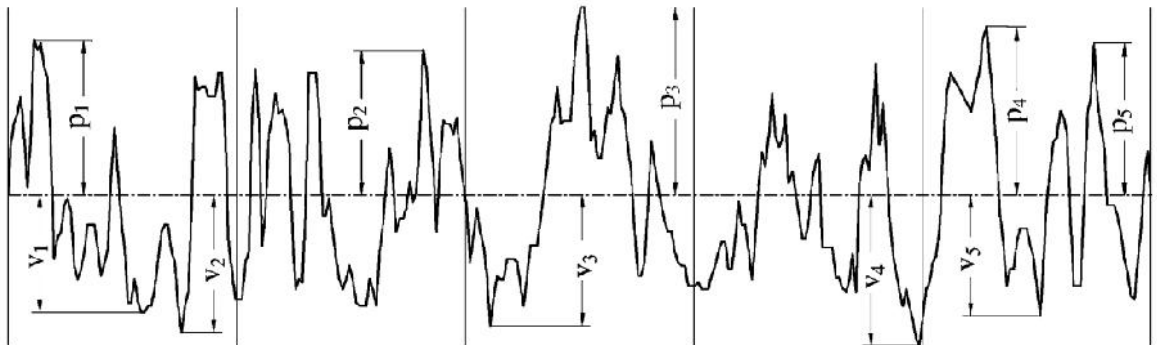


Figura 1.4 - Definición del parámetro R_z [109]

- R_q representa la desviación estándar de la distribución de alturas de la superficie (Ecuación 1.4), por lo que es un parámetro importante para describir la rugosidad de la superficie estadísticamente. Este parámetro es más sensible que R_a a grandes desviaciones de la línea media [109].

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (1.4)$$

Como se dijo anteriormente, en el contexto del presente trabajo es muy importante caracterizar la rugosidad de la superficie en estudio ya que se ha demostrado que ésta influye en el comportamiento celular y en la velocidad y calidad de formación de nuevos tejidos en contacto estrecho con el implante [111-113]. Generalmente, se prefieren superficies rugosas (valores de R_a en el orden de los micrones) frente a superficies lisas debido a que poseen mayor área superficial. Es por esto que se han desarrollado varias técnicas de modificación de superficie, entre ellas la técnica de anodizado [113]. Se ha demostrado que, en el rango de rugosidad de unos pocos micrones, se maximiza el anclaje y se mejora la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas [112]. Igualmente,

aún se debate cuál es la mejor rugosidad ya que una mayor rugosidad también puede producir aumento de procesos inflamatorios indeseados y mayor liberación de iones al entorno biológico [114, 115]. Asimismo, los perfiles del orden de los nanómetros también resultan interesantes pues al aumentar la energía superficial mejoran la adsorción de determinadas proteínas y la adhesión de células, incrementando la velocidad en los procesos de osteointegración [113-115].

1.6.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica muy utilizada para realizar análisis de la morfología superficial [116] ya que permite obtener imágenes de alta resolución de la superficie bajo estudio. Los microscopios ópticos tienen una capacidad de resolución de hasta 0,1-0,2 μm , limitada por la longitud de onda de la fuente de iluminación. Los microscopios electrónicos presentan la ventaja de que, en lugar de luz, utilizan como fuente de radiación un haz de electrones de alta energía [117] alcanzando resoluciones de 1-20 nm.

El principio operativo del equipo SEM consiste en aplicar una diferencia de potencial entre 0,1 y 30 keV sobre una fuente de electrones en una columna de alto vacío. Esto provoca la emisión de un haz de electrones que al ser irradiado focalizadamente sobre una muestra conductora, la interacción haz-muestra arranca electrones de esta última (llamados electrones secundarios) y estos son captados por detectores situados en la columna del microscopio. A partir de la información proporcionada por estos detectores, el sistema de control del microscopio elabora una imagen en escala de grises de la superficie de la muestra. El contraste que se observa en la micrografía proviene de las variaciones en la topografía de la muestra: las protuberancias se traducen en una mayor colección de electrones secundarios por lo que las salientes aparecen más brillantes que las cavidades o depresiones, hecho que permite la interpretación directa e inmediata de las imágenes [117, 118].

La microscopía electrónica de barrido resulta una herramienta útil en la determinación de las características de un recubrimiento u óxido anódico ya que permite observar la facilidad con la que el óxido crecido copia la forma del sustrato metálico, así como la morfología del óxido y defectos presentes como poros o rajaduras, que resultan de mucha importancia si se considera que la adaptabilidad del hueso a la prótesis metálica depende en gran forma de la calidad y morfología del óxido crecido [47].

1.6.2. Composición química de la superficie

1.6.2.1. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica analítica de alta resolución que permite conocer la composición química y la estructura interna de muestras de cualquier tipo ya que es capaz de detectar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. Una de las principales ventajas es que se trata de una técnica no destructiva que no requiere especial preparación previa de la muestra [119].

Los iones y átomos enlazados químicamente, para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales. Al hacer incidir un haz de luz monocromático de una dada frecuencia (ν_0) sobre la superficie de un material, es posible examinar la luz que se dispersa producto de la interacción con estos átomos e iones que componen la materia. Esto es interesante ya que una fracción muy pequeña de luz va a ser dispersada inelásticamente, experimentando ligeros cambios de frecuencia. Este fenómeno se conoce como dispersión Raman y se origina a partir de que algunos fotones al chocar intercambian parte de su energía con el material. Los cambios de energía que experimentan se traducen en un cambio de frecuencia característico de la naturaleza química y el estado físico del material analizado, y son independientes de la frecuencia de la luz incidente. A cada movimiento vibracional y rotacional de una molécula le corresponde un valor determinado de energía molecular, de modo que los espectros Raman proporcionan información sobre la composición molecular de la muestra [119, 120]. En el eje x del espectro se representa la diferencia entre la frecuencia Raman y la de excitación del láser ($\nu - \nu_0$) en número de ondas por cm (cm^{-1}), ya que es el cambio en la frecuencia del fotón lo que interesa. En el eje y se representa la intensidad de la luz dispersada para cada valor de energía [120].

Un espectro Raman, por lo tanto, está formado por una serie de desplazamientos Raman característicos, cada uno de ellos asociado con un modo vibracional (o rotacional). Así, el espectro es único para cada material y permite identificarlo. La espectroscopía Raman es una de las técnicas superficiales que más se utiliza para estudiar la presencia y composición de diferentes depósitos o productos del proceso de corrosión sobre un sustrato [121]. En el caso del presente trabajo, es muy valiosa en la caracterización *in vitro* de biomateriales para determinar la composición superficial de las muestras antes y después de su inmersión en SBF.

1.6.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS, por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis superficial de alta sensibilidad que proporciona información acerca de la composición elemental de materiales sólidos. Esto se logra utilizando fotones de rayos X de alta energía para inducir la fotoemisión de los electrones centrales de los átomos de la superficie de la muestra que escapan con una energía cinética específica del elemento químico emisor, que es detectada por el equipo [122, 123].

La energía de enlace de los electrones de la banda de valencia no solo depende de la composición elemental sino también de las características del material, como la fase cristalina y otras, mientras que en el caso de los electrones internos, la energía de enlace es una característica de la fuente de los átomos y del nivel electrónico. Cuando un fotón incide en la superficie de la muestra, su energía puede ser absorbida completamente por la nube electrónica de los átomos presentes en la muestra. Si la energía es lo suficientemente alta, esto puede provocar la ionización de la muestra y la expulsión de los llamados fotoelectrones con una energía cinética que está determinada por la energía de enlace de los electrones expulsados y la energía de fotones, de acuerdo con la ecuación de Einstein:

$$E_k = h \cdot \nu - E_B \quad (1.5)$$

donde E_B es la energía de enlace del electrón en el átomo, $h \cdot \nu$ equivale a la energía de la fuente de rayos X, y E_k es la energía cinética del electrón [122, 123].

Teniendo en cuenta la baja profundidad de escape de los fotoelectrones, la profundidad de penetración en esta técnica es de aproximadamente 1-3 nm. Esto hace que sea la más adecuada para las aplicaciones que involucren películas delgadas y/o fenómenos de superficie [122]. Para el caso particular del estudio de biomateriales funcionalizados con películas orgánicas, se trata de una técnica muy valiosa ya que es capaz de detectar la presencia de biomoléculas depositadas sobre la superficie a partir del análisis de los elementos que las conforman [124, 125].

1.6.3. Comportamiento electroquímico

En este trabajo, se realizaron ensayos de resistencia a la polarización, espectroscopía de impedancia electroquímica y curvas de polarización potenciodinámicas para estudiar *in vitro* el comportamiento a la corrosión del Zr anodizado y biofuncionalizado (Zr60RGD) para su potencial uso como biomaterial. Estas técnicas de caracterización electroquímicas

permiten evaluar (incluso en algunos casos de forma acelerada) la respuesta del material en un entorno fisiológico modelo.

1.6.3.1. Resistencia a la polarización

Cualquier material metálico sumergido en un medio corrosivo tiene un potencial característico, que se conoce como potencial de reposo o de circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés). A pequeños sobrepotenciales respecto del OCP existe una relación lineal entre la polarización y la corriente. El ensayo de resistencia a la polarización es un ensayo no destructivo en el cual se registra la corriente a medida que varía el voltaje, en el entorno próximo al OCP. El procedimiento se basa en que las curvas de polarización tienen un comportamiento lineal cercano al potencial de corrosión. La pendiente de la recta resultante es igual a la resistencia de polarización (ver Figura 1.5) y este valor es inversamente proporcional a la velocidad con la que se corroe el sistema [24, 126].

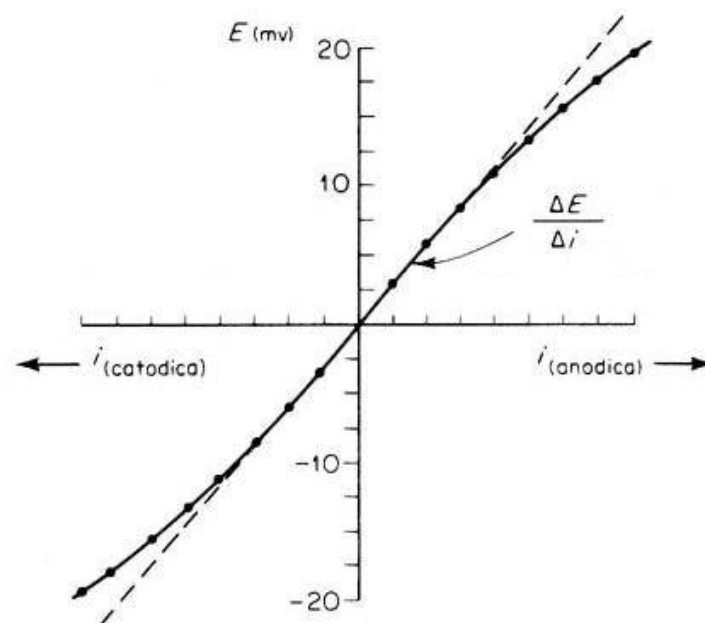


Figura 1.5 - Esquema de cálculo de la resistencia a la polarización

1.6.3.2. Espectroscopía de impedancia electrostática (EIS)

Impedancia es el término utilizado en circuitos de corriente alterna para designar al parámetro que es equivalente a la resistencia eléctrica en corriente continua, es decir, la impedancia es una medida de la capacidad de un circuito para resistir el flujo de corriente eléctrica que depende de la frecuencia de la señal aplicada.

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se trata de una técnica no destructiva en la cual, generalmente, se aplica al electrodo de trabajo una excitación de potencial que varía sinusoidalmente y se registra una señal de corriente alterna como respuesta [127]. Esta excitación multifrecuencia permite la medición de varios fenómenos superficiales que tienen lugar a diferentes velocidades [128]. La magnitud de dicha excitación es muy pequeña (solo unos pocos mV por encima y por debajo del OCP) por lo que, de acuerdo con lo que descrito en la sección 1.6.3.1, la respuesta de corriente obtenida es lineal, es decir que reproduce la forma de la señal entrante (una senoide de misma frecuencia) pero experimenta un corrimiento de fase [127]. Por medio de esta técnica es posible obtener información acerca de las características de las películas (óxidos o recubrimientos) formadas sobre la superficie del material en estudio y permite evaluar su respuesta a la corrosión en un determinado medio a través del tiempo.

Para realizar los ensayos de EIS es fundamental que el OCP se encuentre estabilizado en el tiempo. Una vez que esto se verifica, el equipo registra y procesa las mediciones de potencial $E(t)$ y corriente $i(t)$ en el tiempo dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada (espectro de impedancias). A partir de una expresión equivalente a la Ley de Ohm, pero llevada a corrientes alternas, es posible calcular la impedancia del sistema a cada frecuencia como:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{i(t)} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{i_0 \sin(\omega t + \theta)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \theta)} \quad (1.6)$$

donde t es el tiempo, E_0 e i_0 son las amplitudes de las señales de potencial y corriente, ω es la frecuencia radial [rad/s] función de la frecuencia en Hertz [s^{-1}] y θ es el ángulo de fase entre $E(t)$ y $I(t)$.

Por lo tanto, la impedancia queda expresada en términos de una magnitud Z_0 y un ángulo de fase θ [127]. A partir del desarrollo matemático de la teoría que fundamenta la técnica de EIS, la impedancia de un sistema puede expresarse en términos de una componente real y una componente imaginaria (Ecuación 1.6).

$$Z(\omega) = Z_0 \exp(j\theta) = Z_0 (\cos\theta + j\sin\theta) \quad (1.6)$$

Los resultados obtenidos por esta técnica se plasman gráficamente en los diagramas de Nyquist y de Bode (Figura 1.6). El diagrama de Nyquist es la representación de la componente imaginaria de la impedancia total con signo negativo ($-Z''$) en función de la componente real de la impedancia total (Z'). Cada punto del este diagrama equivale a la

impedancia a una cierta frecuencia. En los diagramas de Bode se representan el módulo de impedancia $|Z|$ y el ángulo de fase θ en función del logaritmo de la frecuencia ($|Z|$ vs $\log f$ y θ vs $\log f$) [127, 129].

Los espectros de impedancia obtenidos suelen ser interpretados mediante circuitos eléctricos equivalentes compuestos por elementos tales como resistencias (R), capacitancias (C) e inductancias (L), como se ejemplifica en la Figura 1.6. El ajuste de dichos circuitos a los datos experimentales permite obtener valores de los parámetros que caracterizan las películas, los cuales pueden ser utilizados para obtener información tanto de velocidades como de mecanismos de corrosión del sistema [127, 129]. Pueden existir varios circuitos eléctricos que ajusten con la misma exactitud a los datos experimentales del sistema bajo estudio. De todas las combinaciones de elementos posibles, se selecciona la más simple que permita explicar el paso de corriente existente desde el electrolito hacia el metal base manteniendo un correlato entre los componentes del circuito y los parámetros físicos del sistema en estudio [127].

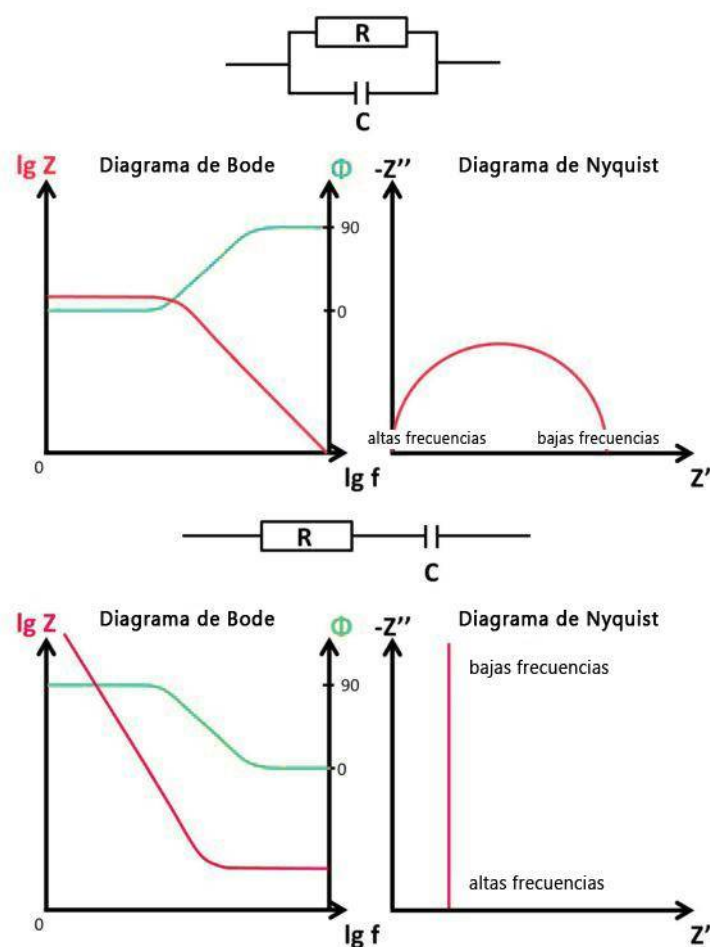


Figura 1.6 - Diagramas de Nyquist y Bode con sus respectivos circuitos equivalentes

La impedancia de los componentes eléctricos básicos de un circuito estándar se lista en la Tabla 1.1 [127].

Tabla 1.1 - Impedancia de elementos eléctricos comunes [127]

Componente	Impedancia
Resistor	$Z = R$
Inductor	$Z = j\omega L$
Capacitor	$Z = 1/j\omega C$

Generalmente, la respuesta obtenida en EIS no es puramente capacitiva (los ángulos de fase son distintos de 90°). En estos casos, se utilizan elementos de fase constante (CPE, por sus siglas en inglés) que representan capacitores no ideales [130]. La impedancia para el elemento CPE, llamada Z_{CPE} , puede escribirse como:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^\alpha Q} \quad (1.7)$$

Donde Q (pseudocapacitancia) y α son los parámetros del CPE, independientes de la frecuencia. Cuando $\alpha = 1$, Q tiene unidades de capacitancia ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s} = \text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$) y representa la capacitancia C de un capacitor ideal. Cuando $\alpha < 1$, el parámetro Q (con unidades $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^\alpha$) no puede representar la capacitancia pero puede relacionarse con la capacidad efectiva (C_{EF}) del recubrimiento analizado a través de distintos modelos matemáticos como el de Brugg o el de Hsu y Mansfeld [131–133]. El comportamiento no ideal del sistema se relaciona con una distribución de capacitancias en la película y suele atribuirse a heterogeneidades de la superficie (rugosidad superficial, porosidad del electrodo, variaciones en la composición del óxido) así como a la distribución no uniforme de corriente y/o potencial a lo largo de la superficie del electrodo [130, 131, 134].

1.6.3.3. Curvas de Polarización

El ensayo de polarización dinámico es un ensayo destructivo ya que se realiza un barrido lineal de potencial desde un valor inicial hasta un valor prefijado muy por encima de las condiciones de utilización. En ese punto el barrido se invierte para observar el comportamiento a la polarización cíclica, donde pueden ocurrir fenómenos de histéresis o repasivación. Para obtener las curvas de polarización se le aplica al electrodo de trabajo un sobrepotencial positivo (remoción de electrones en polarización anódica) o negativo

(suministro de electrones en polarización catódica) respecto del OCP y se registran las corrientes medidas para el sistema. A partir de los datos obtenidos, se grafica el potencial E [V] en función del logaritmo de la densidad de corriente j [$A \cdot cm^{-2}$] [24].

Las curvas de polarización proporcionan información sobre los procesos de activación, pasivación y picado, si los hubiera, así como de los procesos de reducción que pueden estar ocurriendo sobre el material (Figura 1.7).

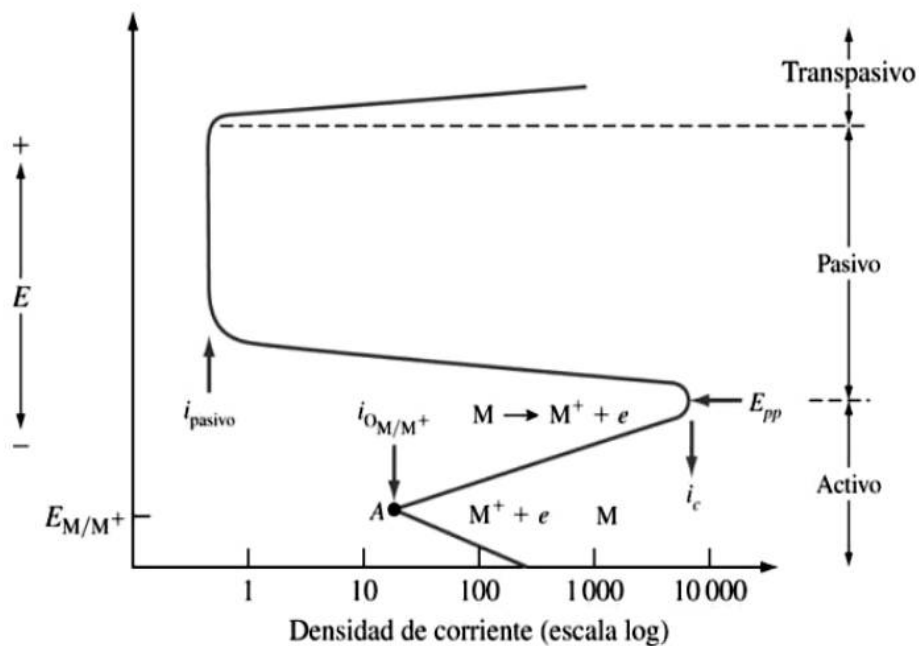


Figura 1.7 - Esquema de una curva de polarización de un metal donde transcurren fenómenos de activación, pasivación y picado

2. Objetivos e hipótesis de trabajo

2.1. Objetivo general

La estabilización primaria de prótesis no cementadas es uno de los pasos cruciales para el éxito de una implantación. La biofuncionalización se presenta como una alternativa prometedora para lograr este fin acelerando el proceso de oseointegración. No han sido reportados hasta el momento estudios que implementen la estrategia de biofuncionalización sobre la superficie anodizada de circonio metálico de pureza comercial, lo que constituiría una gran oportunidad para introducir al mercado nuevos productos bioactivos que presenten rápida oseointegración y baja velocidad de liberación de iones al

medio. Este proyecto tiene como objetivo el desarrollo de una nueva modificación superficial sobre circonio (Zr) con potenciales usos en cirugía ortopédica para implantes permanentes no cementados. Para ello se propone un estudio sistemático *in vitro* del efecto que tendría la funcionalización con péptidos RGD de cadena corta de Zr anodizado a 60 V en medio ácido sobre las propiedades superficiales del material.

El desarrollo de este Trabajo Final de Grado está enmarcado dentro de un proyecto más amplio de la División Electroquímica Aplicada del INTEMA basado en el desarrollo, caracterización y análisis de las superficies de contacto (interfaces) generadas entre implantes mejorados superficialmente por estrategias de modificación basadas en métodos electroquímicos.

2.2. Objetivos específicos

El presente trabajo propone seguir la línea de investigación en cumplimiento de los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar las características químicas y topográficas de las superficies de circonio anodizado antes y después del tratamiento de funcionalización mediante técnicas de análisis superficial.
- Determinar el comportamiento electroquímico de ambas superficies (Zr60 y Zr60RGD) en soluciones de medio biológico simulado.
- Evaluar la biocompatibilidad del material en un modelo celular *in vitro*.

2.3. Hipótesis de trabajo

La funcionalización de superficies metálicas con biomoléculas orgánicas genera cambios superficiales que modifican la topografía y la química del material. En lo que respecta a la ciencia e ingeniería de materiales, el proceso de biofuncionalización no provoca el detrimento de las propiedades superficiales del sustrato base (Zr60). A nivel biológico, el proceso de funcionalización sobre la superficie de Zr anodizado, favorece la adhesión celular sin ejercer efecto citotóxico.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales de partida

3.1.1. Sustrato base

El material utilizado en este proyecto fue Zr 702 laminado y recocido en vacío según norma ASTM B551 (ANKURO Int. GmbH, Alemania). Se trata de circonio 99,5%, cuya composición química puede verse en la Tabla 3.1. Se utilizaron láminas planas de aproximadamente 15 x 15 mm de superficie y 0,1 mm de espesor.

Tabla 3.1 – Composición química nominal del Zr 702 (ANKURO Int. GmbH)

	Zr+Hf	Hf	Fe+Cr	H	C	O
%	≥99,2	≤4,5	≤0,2	≤0,005	≤0,05	≤0,16

3.1.2. Biomolécula funcional

La superficie del sustrato utilizado en este trabajo fue modificada con péptido RGD (Sigma-Aldrich, A8052), cuya configuración y estructura química pueden verse en la Figura 3.1. El protocolo de funcionalización utilizado se explica en el punto 3.2.2.

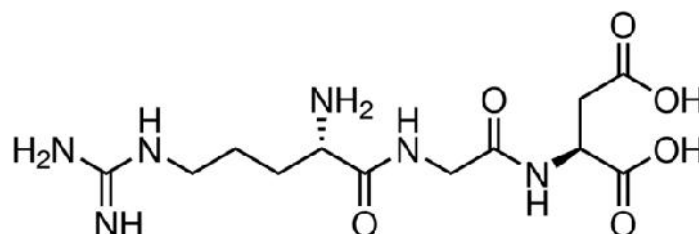


Figura 3.1 – Estructura química del péptido RGD ¹

3.2. Modificación del material de base

3.2.1. Preparación de la superficie

3.2.1.1. Remoción del óxido natural

El circonio es en realidad un metal altamente reactivo, su pasividad se atribuye a la densa, adherente e impermeable, película protectora de óxido que forma naturalmente por

¹ Sigma-Aldrich, catálogo web. Enlace al sitio: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8052

exposición al aire o al agua a temperatura ambiente [40]. Para remover esta capa de óxido, las muestras fueron pulidas con lijas al agua de SiC (granulometría 600) y luego colocadas en un baño ultrasónico de alcohol isopropílico durante 6 min para desprender los restos de material abrasivo de la superficie.

3.2.1.2. Anodizado

Trabajos previos del grupo de investigación han demostrado que la biocompatibilidad del circonio y su resistencia a la corrosión en medio biológico aumentan notablemente si la capa nativa de óxido ZrO_2 se engrosa mediante un proceso de anodizado [135]. El mismo se lleva a cabo en una celda electrolítica como se muestra en la Figura 3.2. En la presente investigación se utilizó H_3PO_4 1 mol.L^{-1} preparado a partir del reactivo concentrado al 85,0% (grado analítico, Sigma-Aldrich) como electrolito, una muestra de Zr 702 previamente pulida como ánodo y una malla de acero inoxidable que funciona como cátodo [13]. Este arreglo experimental es análogo al utilizado por Bardwell et al. [136] en sus estudios sobre películas de óxido en circonio anodizado, donde los resultados obtenidos con un contraelectrodo de acero inoxidable no mostraron diferencias comparados con aquellos obtenidos con un contraelectrodo de platino [138]. En este sentido, el potencial de anodizado reportado en el presente trabajo está expresado en relación al potencial de un electrodo de pseudo-referencia de acero inoxidable.



Figura 3.2 – Sistema utilizado para el anodizado de las muestras

Para realizar esta investigación, las muestras de Zr 702 fueron anodizadas durante 60 min en solución H_3PO_4 1 mol.L⁻¹ y a un potencial constante de 60 V respecto del electrodo auxiliar. La elección de estos parámetros se basó en resultados de estudios previos que evidencian que el anodizado a 60 V estimula en ensayos *in vitro* la adhesión y proliferación celular de la línea pre-osteoblástica murina MC3T3. En lo que respecta a los ensayos *in vivo*, se observó un mayor espesor del tejido óseo formado en contacto con la superficie anodizada a 60 V, acompañado de una mayor velocidad de aposición mineral en comparación con las muestras sin anodizar [135].

Al finalizar, las muestras fueron enjuagadas con acetona y se dejaron secar durante 24 h. Una vez anodizada, la superficie de las muestras presentó un color dorado tal como se aprecia en la Figura 3.3. En el presente estudio, las muestras de Zr 702 anodizadas fueron consideradas como control, que en adelante se denomina Zr60.



Figura 3.3 – Muestras de Zr 702 anodizadas a 60 V

3.2.2. Biofuncionalización

Para lograr inmovilizar péptidos RGD sobre la superficie de las muestras de Zr60 se procedió según el protocolo que se presenta a continuación. Primero se sumergieron las muestras en alcohol isopropílico a temperatura ambiente durante 24 h. Al retirarlas, las muestras se secaron por capilaridad apoyando uno de sus extremos contra un paño de

papel absorbente. A partir de este punto, las muestras se manipularon de manera tal que siempre quedase expuesta una misma cara, sobre la cual posteriormente se llevaron a cabo todos los análisis. Se preparó entonces una solución 0,05 %v/v de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) en agua destilada a temperatura ambiente, y se cubrió cada muestra con dicha solución dentro de un recipiente limpio y al resguardo de la luz. Las muestras permanecieron en APTES durante 19 h y a continuación se realizaron tres lavados con agua destilada. Las muestras silanizadas (Zr60APTES) se colocaron en solución 1% v/v de glutaraldehído en 0,1 mol.L⁻¹ buffer fosfato durante 4 h a temperatura ambiente, siempre cubiertas de la incidencia de luz directa. Al cabo de este tiempo se realizaron tres lavados con buffer fosfato. Finalmente, las muestras se sumergieron durante 19 h en una solución conteniendo péptidos RGD disueltos en buffer fosfato a una concentración de 1 mg.mL⁻¹. Se realizaron otros tres lavados con buffer, seguido de tres lavados con agua destilada y luego se mantuvo a las muestras al resguardo de la luz hasta que la superficie estuviera completamente seca. Una vez listas, fueron inmediatamente sometidas a los ensayos y estudios correspondientes. De aquí en más se refiere a estas muestras como Zr60RGD.

3.3. Evolución del material en fluido corporal simulado

3.3.1. Preparación de SBF

Los modelos *in vitro* propuestos para analizar la biocompatibilidad del material requieren la utilización de fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés). Dentro de la gama de soluciones que cumplen este requerimiento propuestas por distintos autores, en este trabajo se seleccionó una solución con concentración de iones inorgánicos similar al plasma sanguíneo (ver Tabla 3.2) que permite reproducir los procesos que tienen lugar en la superficie de materiales bioactivos cuando estos son implantados [97]. La misma se preparó según el protocolo de Kokubo et al. 1990 [97], a partir de NaCl y CaCl₂ anhidro (Cicarelli), KCl (Riedel-de-Haen), MgCl₂·6H₂O (Merck), K₂HPO₄ (Biopack) y NaHCO₃ (J.T. Baker) disueltos en agua destilada. Las cantidades agregadas de cada reactivo fueron pesadas con una tolerancia de ± 0,002 g en una balanza analítica (Denver APX200, Estados Unidos). El pH de la solución se ajustó añadiendo 6,057 g de tris(hidroximetil)aminometano (Aldrich) por litro de SBF y goteando HCl 1 mol.L⁻¹ hasta alcanzar un valor de pH entre 7,25 y 7,35 medido con un pHmetro (Orion, Singapur). La solución se mantuvo refrigerada a 5°C hasta su utilización y por un máximo de 30 días [95].

Tabla 3.2 – Concentración de iones en SBF y en plasma sanguíneo humano

	Concentraciones iónicas [mmol.L ⁻¹]						
	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ⁻²
Plasma sanguíneo	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

3.3.2. Ensayos *in vitro* en SBF

Para seguir la evolución del material tras un período de inmersión en SBF, se sumergieron duplicados de Zr60 (control) y Zr60RGD (material biofuncionalizado) en SBF y se mantuvieron en estufa a $36.5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Estos fueron luego estudiados mediante espectroscopía Raman, microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), y ensayos electroquímicos.

En todos los ensayos se utilizó el mismo volumen de SBF, siendo siempre superior al mínimo estipulado por Kokubo et al. 2006 [95], así como también se llevó la solución a temperatura antes de colocar las muestras en inmersión. Las muestras se dispusieron inclinadas respecto de la horizontal para evitar que pudieran depositarse sobre su superficie aquellos precipitados que decantasen por gravedad. Al cabo de las 48 h, cada muestra se enjuagó cuidadosamente con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente en un recipiente entreabierto, minimizando así la contaminación por partículas del entorno. Una vez que estuvieron secas se procedió a evaluar los cambios que este ensayo *in vitro* pudiera haber introducido sobre la superficie.

3.4. Caracterización de la superficie

3.4.1. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas

3.4.1.1. Técnica de espectroscopía Raman

La estructura y composición química de los compuestos presentes en la superficie del material fue estudiada por espectroscopía Raman. Para ello, se tomaron muestras de Zr60 y Zr60RGD obtenidas al cabo de los procesos de anodizado y de biofuncionalización, respectivamente; considerándose estas condiciones como “tiempo cero” (t0). Asimismo, se tomaron muestras de Zr60 y Zr60RGD provenientes de los ensayos *in vitro* de inmersión en SBF descritos en 3.3.2 y las mismas se registraron como condición a 48 horas (t48).

Los espectros se obtuvieron utilizando un microscopio Raman confocal inVia Reflex (Renishaw, Reino Unido). En primer lugar, se calibró el equipo con una muestra de referencia interna de Si, y luego se realizaron barridos de 100 a 3200 cm^{-1} sobre tres puntos de cada muestra a analizar. Para medir se utilizó un láser diodo de 785 nm de longitud de onda, al 100 % de potencia y bajo un objetivo de 50x, tomando cinco adquisiciones por cada medición.

3.4.1.2. Técnica de espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)

Se utilizó un espectrómetro de fotoelectrones de Rayos-X K-alpha (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para evaluar los cambios en la composición química de las muestras de Zr después de someterlas a proceso de biofuncionalización. Para ello, se analizaron muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD, todas a t_0 , es decir después de los procesos de anodizado, silanización y anclaje de los péptidos, respectivamente. Las mismas fueron introducidas en una cámara de alto vacío que contaba con una fuente de radiación monocromática de Al $K\alpha$ y se midió con un ángulo de incidencia de 90° . Los espectros generales se tomaron a 1 eV de energía de paso, mientras que para espectros estrechos se optó por un paso de 0,1 eV. De este modo, se recogieron espectros de alta resolución para O 1s, C 1s, N 1s, P 2p, Si 2p y Zr 3d. En todos los casos la energía de enlace se ajustó al pico C 1s de carbono residual como referencia (energía de enlace igual a 284,8 eV), ya que el mismo está presente en todas las mediciones [85, 139]. Los picos observados en los espectros se analizaron utilizando el software XPSPEAK 4.1. Los análisis de composición elemental reportados tienen una precisión de $\pm 10\%$. Todas las energías de enlace informadas presentan un error en el rango de $\pm 0,2$ eV.

3.4.2. Observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La superficie de las muestras fue evaluada mediante un microscopio electrónico de barrido JSM-6460LV (Jeol, Japón) aplicando al haz de electrones una tensión de aceleración de 15 kV en alto vacío. El análisis se llevó a cabo sobre muestras de Zr60 y Zr60RGD a t_0 y t_{48} , sobre las cuales fue necesario depositar una capa de oro-paladio a fin de lograr una superficie conductora. Se obtuvieron imágenes en modo de electrones secundarios (SE) a distintos aumentos para cada muestra y luego se compararon cualitativamente las diferentes condiciones.

3.4.3. Determinación de los principales parámetros de rugosidad superficial

Se midieron los perfiles de rugosidad sobre muestras de Zr60 y Zr60RGD a t₀, utilizando un rugosímetro de contacto Surtronic 3+ (Taylor-Hobson, Inglaterra). El equipo posee una resolución de 10 nm en sentido vertical y de 1 μm en horizontal. Se realizaron entre 3 y 4 lecturas por muestra sobre diferentes sectores de la superficie, registrando de manera independiente la rugosidad en la dirección del pulido (coincidente con la dirección de laminado del material) y en la dirección perpendicular a ésta. De los perfiles resultantes se extrajeron, de acuerdo a la norma ISO 4287, los parámetros de amplitud Rz, Ra y Rq descritos en la sección 1.6.1.2.

3.4.4. Medición del ángulo de contacto estático

Para caracterizar las propiedades de humectabilidad del material se realizaron medidas del ángulo de contacto a t₀ sobre Zr60 y Zr60RGD, mediante la técnica de gota sésil. Se utilizó un goniómetro Ramé-Hart (Estados Unidos), equipado con una cámara B/N MV-50 y zoom 6X. Las muestras se fijaron con cinta bifásica sobre una placa móvil de modo tal que la dirección de observación fuese perpendicular a la dirección en la que fueron pulidas (Ver Figura 3.4). Luego, con una micropipeta se dispusieron gotas de 4 μl de diiodometano en distintos puntos de la superficie, de modo que cupieron entre 4 y 6 gotas por muestra.

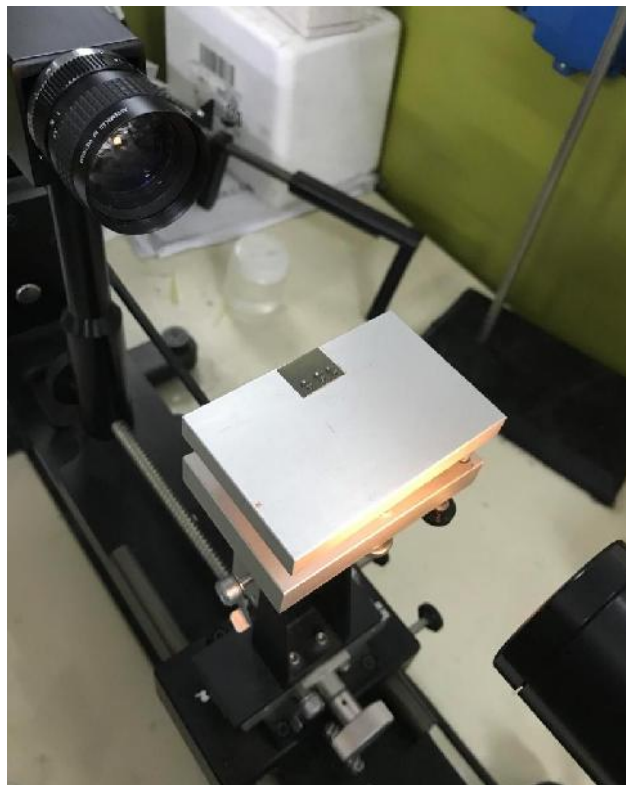


Figura 3.4 – Equipamiento y “set-up” para la medición del ángulo de contacto

Se realizó el análisis de la forma de gotas axisimétricas (ADSA, por sus siglas en inglés) para determinar el ángulo de contacto por medio del software DROPimage Advanced, tomando medidas directas del ángulo que forma la tangente en el punto de contacto entre las tres fases (superficie del material sólido, gota líquida de solvente y aire) a ambos lados del perfil de la gota sésil. Se registraron valores cada 1 segundo, durante un total de 10 segundos, y luego se realizó un tratamiento estadístico de los datos. Se evaluaron 4 gotas sobre una muestra de Zr60RGD y 14 gotas sobre 3 muestras de Zr60, computando así 80 y 280 valores de ángulos respectivamente. Dado que los mismos no presentaron una distribución normal, se aplicó la desigualdad de Chebyshev para expresar los resultados [140].

3.5. Determinación del comportamiento electroquímico del material

Con el propósito de conocer si la resistencia a la corrosión del material se vio afectada por el tratamiento superficial de biofuncionalización, se realizaron ensayos electroquímicos sobre muestras de Zr60 y Zr60RGD, tanto a t_0 como a t_{48} . Los ensayos se realizaron por duplicado en una unidad electroquímica Gamry Reference 600 (Gamry Instruments, Estados Unidos). Se utilizó una disposición de tres electrodos, usando como referencia un electrodo de Calomel saturado (SCE por sus siglas en inglés, Radiometer Analytical, Francia), como electrodo de trabajo la muestra control o biofuncionalizada y como contraelectrodo una espiral de platino. Todos los ensayos se realizaron en SBF a 37 ± 2 °C. Fue necesario diseñar y construir una celda electroquímica a medida (ver apartado 3.5.4) de modo que solo una cara de las muestras quedase expuesta a la solución, puesto que la deposición de los péptidos RGD se llevó a cabo sobre una sola de las caras de las muestras de Zr60RGD. Dentro de dicha celda se condujo la secuencia de ensayos electroquímicos. Previo a ellos, el sistema se dejó estabilizar midiendo el potencial de corrosión a circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés) durante un mínimo de 40 min. Luego de este tiempo, se realizaron los ensayos electroquímicos uno a continuación del otro, y se registró el OCP entre un ensayo y el siguiente.

3.5.1. Resistencia a la polarización (R_p)

Se midió la resistencia a la polarización (R_p) de manera potenciodinámica de acuerdo a la norma ASTM G 102-89 [141]. Esto se logra aplicando una perturbación en potencial y registrando la respuesta en corriente. Se aplicó un potencial 20 mV más negativo que el OCP obtenido, a partir del cual se realizó un barrido en dirección anódica a $0,1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta llegar a un potencial 20 mV por encima del OCP. Para el cálculo del R_p se determinó

la pendiente del gráfico de potencial (E) vs densidad de corriente (j) en un entorno más acotado alrededor del OCP, comprendido entre 5–15 mV por encima y debajo del mismo, donde se puede asegurar el comportamiento lineal de j y E.

3.5.2. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS por sus siglas en inglés) se midió modulando el potencial con una perturbación de ± 10 mV de amplitud respecto del OCP en un rango de frecuencias entre 20 kHz y 0,05 Hz. Los diagramas de EIS obtenidos se modelaron con circuitos eléctricos equivalentes a través del software Zplot para Windows [142].

3.5.3. Curvas de polarización

Se realizó un barrido potenciodinámico partiendo de 150 mV por debajo del OCP hasta alcanzar un potencial de 1000 mV respecto al electrodo de referencia, y en el sentido inverso de regreso hasta 400 mV. La velocidad de barrido fue de $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.5.4. Diseño y construcción de una celda electroquímica

Considerando que los tres electrodos (de trabajo, de referencia y contraelectrodo) deben estar sumergidos en la solución, próximos entre sí pero sin entrar en contacto, y que sistema debe estar termostatzado a aproximadamente 37°C durante todo el ensayo, se diseñó y mandó a fabricar una celda electroquímica como se describe a continuación y cuyos planos de diseño se encuentran en el Anexo I.

La celda consta de dos cilindros concéntricos posicionados de manera horizontal, uno interior de vidrio de 60 mm de diámetro externo y 2 mm de espesor y otro exterior de acrílico de 65 mm de diámetro interno y 6 mm de espesor. Este último dispone de dos válvulas roscadas en la parte superior de la pared para ser conectado a través de dos mangueras a la bomba de un baño termostatzado Vicking 4100 (Argentina), de modo que entre los dos cilindros circule agua destilada a 37°C . Esta camisa de líquido mantiene la temperatura del interior de la celda que se llena con el electrolito, en este caso SBF previamente llevado a 37°C en estufa, el cual se recambia con cada muestra. La elección de los materiales se basó en el requerimiento de mínima pérdida de calor hacia el medio externo (aire circundante) y máxima transferencia de calor entre la camisa y la solución contenida dentro de la celda, optando a su vez por materiales que no impidiesen al operario ver dentro de la celda. Entre las opciones, se escogió el vidrio como material por su coeficiente de transferencia de calor y su transparencia, fabricado de un espesor

reducido para el cilindro interno, y se usó un polímero de mayor espesor para el cilindro externo, ya que estos materiales se caracterizan por tener bajo coeficiente de transferencia de calor; particularmente acrílico, nuevamente por ser transparente.

La celda se cierra por ambos extremos con tapas de poliamida 6, también conocida comercialmente como “Grilon”, sobre las cuales se dispusieron orificios que permiten introducir los electrodos en la solución. Este material presenta las propiedades adecuadas en cuanto a que posee excelente estabilidad dimensional y resistencia química, y baja absorción de agua. Sobre uno de los lados se dispuso el electrodo de referencia SCE dentro de un capilar de Luggin que lo conecta con el interior de la celda y a su lado se introdujo el contraelectrodo de platino en un tubo de vidrio sellado y conectado eléctricamente. En el otro extremo se colocó una doble tapa que hace las veces de portamuestras ya que apresa la muestra entre ambas partes y deja expuesta una superficie de 1,13 cm² de una sola de las caras del material. La conexión eléctrica en este caso se establece mediante un cable de cobre en contacto con el dorso de la muestra, superficie no expuesta a la solución. Para asegurar que el contacto fuese bueno, se realizó un suave pulido sobre el sector de las muestras que haría contacto con el cable a fin de remover el óxido que pudiera interrumpir el libre paso de corriente. Antes de comenzar los ensayos se comprobó con un multímetro que la resistencia de la conexión fuera menor a 10 Ω . Finalmente, la celda se ensamblaba mediante cuatro varillas roscadas, presionando con tuercas mariposa y colocando anillos de goma (o-rings) en todas las juntas. Así, el equipo quedaba armado como se aprecia en la Figura 3.5.

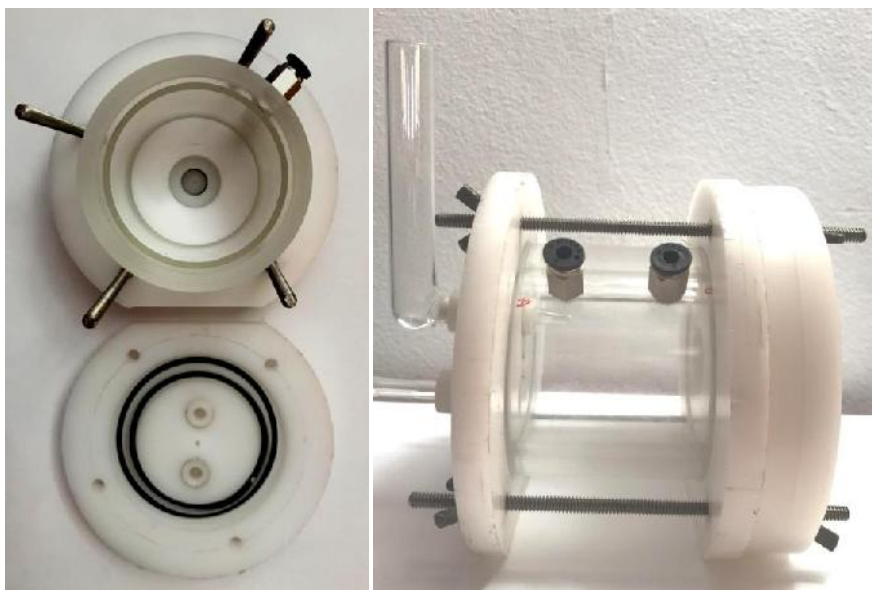


Figura 3.5 – Celda electroquímica termostatzada diseñada para ensayar muestras a una sola cara

3.6. Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó el efecto de la funcionalización de circonio anodizado con péptidos RGD sobre la biocompatibilidad del material mediante un ensayo *in vitro* de adhesión celular, tras el cual se examinaron las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM).

3.6.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 (ATCC CRL1427). Las células se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Gibco) suplementado con 100 mL.L⁻¹ de suero fetal bovino (Natocor), 1,5 g.L⁻¹ de bicarbonato de sodio, 100 UI.mL⁻¹ de penicilina y 100 µg.mL⁻¹ de estreptomycin (Gibco).

El ensayo se llevó a cabo sobre muestras control (Zr60) y muestras biofuncionalizadas (Zr60RGD) de 1 cm², previamente esterilizadas. Las células MG-63 se sembraron con una densidad de 5,4 x 10⁴ células.cm⁻² y se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada y con 5 % de CO₂. Luego de 48 h de cultivo, se detuvo el ensayo y se procedió a observar los resultados.

3.6.2. Técnica de microscopía electrónica de barrido

Para determinar la adhesión y la morfología celular sobre cada material, las células adheridas se fijaron con glutaraldehído 2 %, se deshidrataron en una serie de etanol de graduación creciente y se secaron con HMDS (hexametildisilazano). Los materiales fueron montados sobre un soporte y se metalizaron con oro en atmósfera de argón. De este modo, las muestras se observaron y se obtuvieron imágenes en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6460LV (Tokio, Japón).

A partir de las imágenes obtenidas se pudo analizar la extensión celular en cada tipo de muestra, estimando el factor de elongación (relación entre el eje mayor y el eje menor), el área de cada célula adherida y la morfología celular en términos de redondez. Estos parámetros se midieron utilizando el software Image J en un mínimo de 15 células sobre cada muestra.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de la superficie

4.1.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas

4.1.1.1. Espectroscopía Raman

Las técnicas espectroscópicas vibracionales son una potente herramienta para el estudio de la estructura química de circonas fosfatadas presentes en la superficie [143]. Mediante espectroscopía Raman es posible obtener información acerca de las estructuras cristalinas presentes en una profundidad de algunas decenas de nanómetros desde la superficie del material [144, 145], volviéndola una técnica ideal para el estudio de la cristalografía de películas anódicas demasiado delgadas para ser analizadas por difracción de Rayos-X [53, 137]. Para el caso del presente trabajo se estima que el espesor de la capa de óxido formada sobre el material se ubica alrededor de 150–170 nm [42, 53, 146].

La Figura 4.6 muestra los espectros Raman obtenidos para muestras de Zr60 y Zr60RGD antes y después del ensayo *in vitro* de inmersión en SBF. En cada caso se realizaron mediciones sobre tres puntos diferentes de la superficie, pero no se detectaron corrimientos significativos en la posición de las bandas ni en el ancho de las mismas, por lo que a continuación se presenta un espectro representativo de cada condición.

Como se puede observar en la Figura 4.6, ambos materiales presentan picos definidos a ~ 174 , ~ 334 , ~ 476 y ~ 638 cm^{-1} y algunas crestas de menor intensidad a ~ 221 , ~ 303 , ~ 380 , ~ 536 - 560 y ~ 616 cm^{-1} . Estas vibraciones son características del ZrO_2 pues se condicen con los valores e intensidades relativas reportados en bibliografía para espectroscopía Raman de circonas en polvo [147–149]. En estado puro, el ZrO_2 que compone a la película anódica de las muestras existe en tres formas polimórficas: monoclinica, tetragonal y cúbica. En la Tabla 4.1 se encuentran asignados los picos observados sobre las distintas muestras a las posiciones propias de cada fase cristalográfica.

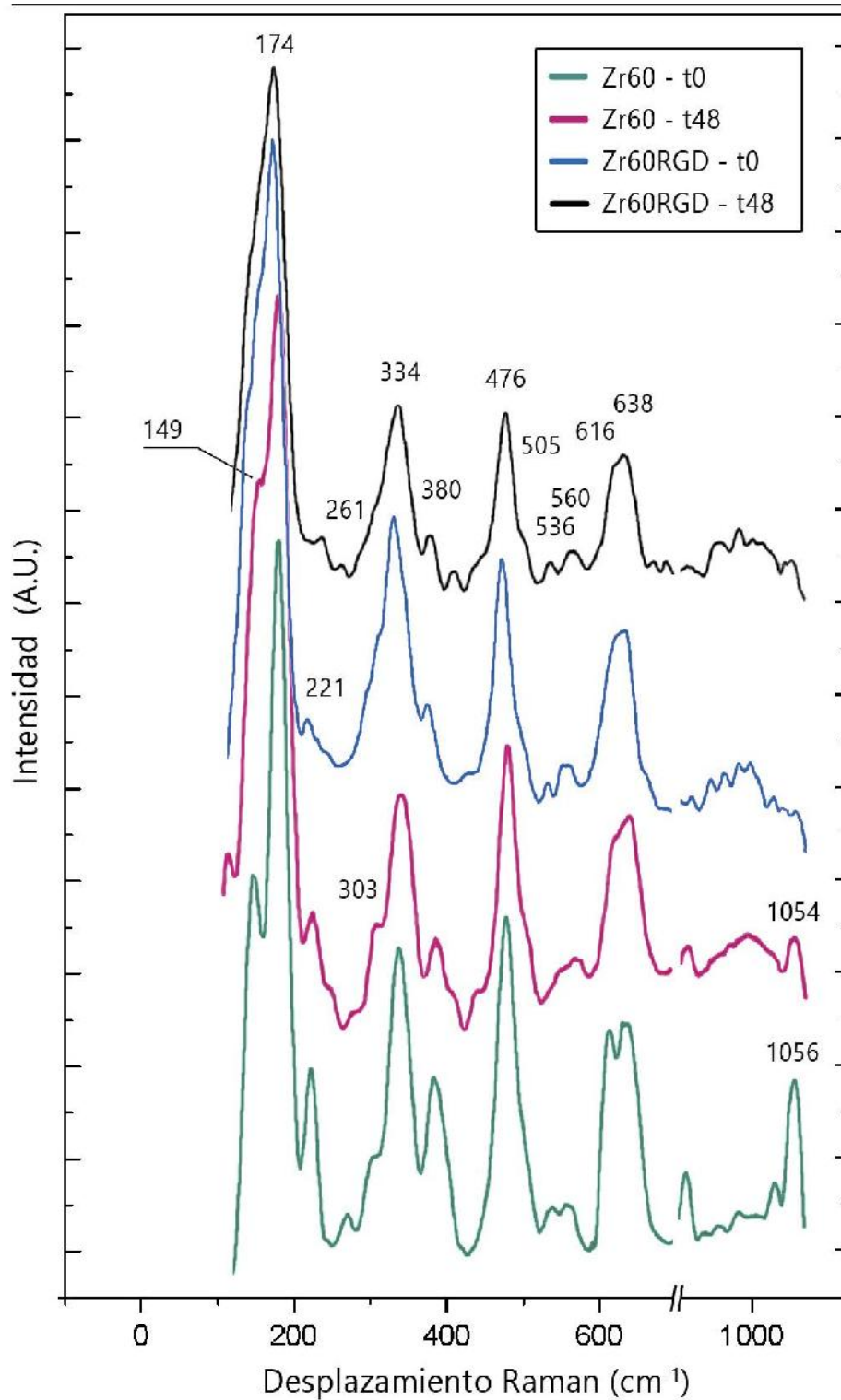


Figura 4.6 – Espectros Raman de Zr anodizado a 60 V (Zr60) y Zr anodizado biofuncionalizado (Zr60RGD), ambos antes (t0) y después (t48) del ensayo *in vitro* en SBF

Tabla 4.1 – Posición de los picos de espectros Raman experimentales correlacionados con datos de bibliografía [148, 150]

	Desplazamiento Raman – posición del pico o banda [cm^{-1}]						
	Zr60 t0	Zr60 t48	Zr60RGD t0	Zr60RGD t48	ZrO ₂ monoclínico	ZrO ₂ tetragonal	ZrO ₂ cúbico
1	148	149				148	150
2	178	176	176	174	178	179	
3	x	x	x	x	190	189	
4	221	221	220		222	223	
5	x	x	x	x			250
6	279			261		263	
7	303	304			307		
8	335	335	333	334	333	332	
9	x	x	x	x	347		360
10	381	382	379	380	382	380	
11	476	476	475	476	475	473	480
12				505	502		
13	537		535	536	538	536	
14	560	563	558	560	558	561	
15	613	616		618	616		625
16	637	638	636	634	637	640	

Las pequeñas discrepancias (menores a 4 cm^{-1}) que se observan para las muestras anodizadas respecto a los polvos de ZrO_2 ya han sido notadas en trabajos previos de iguales características que el presente estudio [151]. Esto se debe a características de la película anódica tales como su espesor, el tamaño de los cristales, la presencia de tensiones residuales en la película de óxido superficial, la presencia de impurezas que pueden alterar la estequiometría local y su densidad, y otros tipos de defectos. No se descarta tampoco la influencia de la textura del metal subyacente que resulta del proceso de laminado por el cual se obtuvo y que determina una orientación preferencial. Está

demostrado que todos estos parámetros inciden sobre las bandas Raman alterando su posición, intensidad y/o ancho en el espectro [152]. A pesar de ello, sería correcto decir que la estructura cristalina del óxido formado por anodización es predominantemente monoclinica ya que los picos detectados tienen en su mayoría un análogo en el espectro de polvo de ZrO_2 monoclinico. A su vez, algunas muestras presentan crestas en las posiciones distintivas del polimorfo tetragonal que son a ~ 148 y $\sim 263 \text{ cm}^{-1}$. Este último pico puede presentarse a frecuencias incluso tan altas como 280 cm^{-1} , como ocurre aquí en el caso del Zr60 a t_0 [152, 153]. Por otra parte, el resto de las posiciones de los picos propios de la fase tetragonal coinciden con aquellos de la fase monoclinica por lo que no es posible distinguir si están o no presentes. Lo mismo ocurre para el polimorfo cúbico. De todas maneras, el único polimorfo estable a bajas temperaturas y presión atmosférica es el monoclinico, por lo que la presencia de otras fases estaría asociada a una estabilización por tensiones residuales, pequeños tamaños de cristal o impurezas [150].

A su vez, en el caso de las muestras de Zr60 se destaca un pico cercano a los 1000 cm^{-1} que no es propio del espectro Raman del ZrO_2 sino que es atribuible a la presencia de P en la estructura del óxido [143]. La incorporación de fosfatos a los óxidos formados en condiciones potencioestáticas en solución de H_3PO_4 ha sido reportada previamente por otros investigadores [154] y es una de las razones por las cuales se optó por utilizarlo como electrolito en el proceso de anodizado, ya que los grupos funcionales de tipo $-\text{PO}_4\text{H}_2$ son considerados potentes nucleantes para compuestos ricos en Ca-P, tales como la apatita [155, 156].

El ensayo de espectroscopía Raman fue llevado a cabo sobre un rango más extenso de frecuencias que el ilustrado en la Figura 4.6 con el propósito de detectar la presencia de las moléculas que forman parte de la modificación superficial realizada sobre las muestras de Zr60RGD. Esto se haría evidente a través de los modos de vibración orgánica de las cadenas alifáticas C-C (que se evidencian como una banda ancha a $790\text{--}810 \text{ cm}^{-1}$), la vibración asimétrica de estiramiento Si-O-Si (propia del APTES) que ocurre cercana a $1000\text{--}1100 \text{ cm}^{-1}$ y la vibración de deformación del NH_2 atribuida a los grupos amida del péptido y denominada banda amida II [157–160]; sin embargo estos picos no fueron detectados. Esto puede deberse a que la cantidad de péptido que forma la película bioactiva es muy pequeña, en coherencia con los resultados obtenidos por XPS descritos en 4.1.1.2.

Luego de la inmersión en SBF, no se detectaron las señales correspondientes a hidroxiapatita (959 cm^{-1} para $\nu_1(\text{PO}_4)$ y $1046\text{--}1072\text{ cm}^{-1}$ para $\nu_3(\text{PO}_4)$) [161] ni a otros carbonatos y/o fosfatos de calcio que formasen compuestos de apatita [162] para ninguna de las condiciones estudiadas.

4.1.1.2. Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)

Se obtuvieron espectros XPS para la superficie control (Zr60), la superficie final luego de la biofuncionalización (Zr60RGD) y para un estado intermedio, previo a la deposición de los péptidos RGD, obtenido luego de la etapa de silanización (Zr60APTES). A continuación se presentan los espectros más relevantes junto con la interpretación de los resultados observados. La Tabla 4.2 reúne los resultados de todas las condiciones analizadas mediante XPS de alta resolución y brinda la composición atómica porcentual de cada superficie determinada a partir de su respectivo espectro.

Tabla 4.2 – Composición atómica porcentual de las superficies analizadas por XPS

Pico de fotoemisión	Energía de enlace [eV]	Porcentaje atómico [%]		
		Zr60	Zr60APTES	Zr60RGD
Zr 3d				
ZrO ₂	182,4	11,6	10,5	6,9
C 1s		35,1	26,0	38,1
C1	284,8	27,9	17,9	21,6
C2	285,9	7,2	8,2	9,8
C3	286,8	-	-	6,7
O 1s		44,6	49,4	42,4
O1	531,5	23,7	26,6	22,0
O2	530,4	11,7	14,3	11,0
O3	532,6	9,2	8,5	9,4
N 1s		1,3	3,4	3,4
N1	401,6	1,3	-	-
N2	400,2	-	1,8	2,1
N3	401,7	-	1,6	1,3
P 2p	133,4	6,8	8,0	6,5
Si 2p		0,6	2,6	2,6
Si1	102,3	0,6	1,8	1,7
Si2	103,0	-	0,8	0,9

Los valores de energías de enlace poseen una incerteza de $\pm 0,1$ eV.

Zr 3d Como era de esperarse, el pico de energía de enlace igual a 182,4 eV, característico del ZrO_2 [163, 164], está presente en las tres superficies analizadas. En la Figura 4.7 se puede apreciar como los espectros de todas las muestras presentan forma de doblete. Puede observarse que las posiciones de los picos coinciden para todas las diferentes condiciones, indicando que el entorno químico del metal no cambia, lo que se traduce en que el protocolo seguido para la biofuncionalización no altera la película anódica. Además, se puede ver cómo la intensidad de los picos cae luego de la biofuncionalización, es decir que se detectan otros elementos sobre la superficie, aunque no estén interactuando químicamente con el óxido superficial. Esto se ve reflejado en el porcentaje atómico decreciente de Zr 3d con la funcionalización (ver Tabla 4.2).

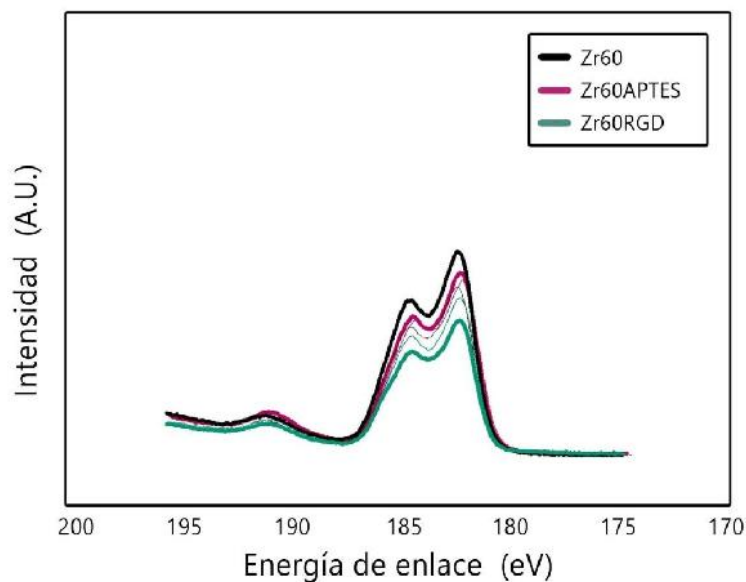


Figura 4.7 – Espectros de alta resolución del pico de Zr 3d obtenidos para las muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD

C 1s Acorde al espectro XPS del Zr60, la superficie anodizada muestra contaminación por carbono, dada por el pico C1 a 284,8 eV que corresponde a los enlaces C–C, C–O y C–H [165]. Por otra parte, las muestras de Zr60RGD presentan fotoemisiones a 285,9 eV y 286,8 eV, propias de los picos C1 y C2; que se atribuyen respectivamente a una mezcla de uniones C–N y C–O y al entorno químico $C-NH_3^+$ presente en la secuencia peptídica [166].

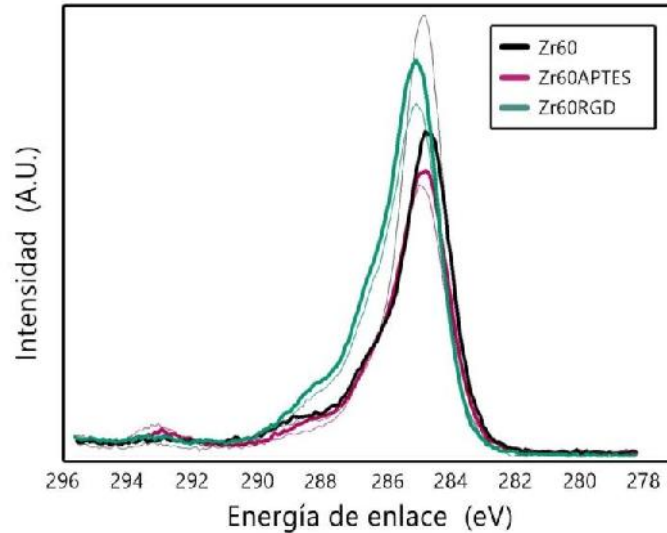


Figura 4.8 – Espectros de alta resolución del pico de C 1s obtenidos para las muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD

O 1s Al realizar el análisis del pico O 1s, se observaron sobre todas las muestras tres contribuciones (subpicos) de diferentes especies (ver Figura 4.9). Por un lado, el O^{2-} perteneciente al óxido de circonio emite a 530,4 eV [49, 167], mientras que los grupos OH que emergen de la superficie emiten a 531,5 eV [139, 165, 168]. El análisis XPS de alta resolución arrojó una tercera componente O3 de energía de enlace igual a 532,6 eV y que puede atribuirse al entorno químico de enlaces C–O–C y H–O–C [169].

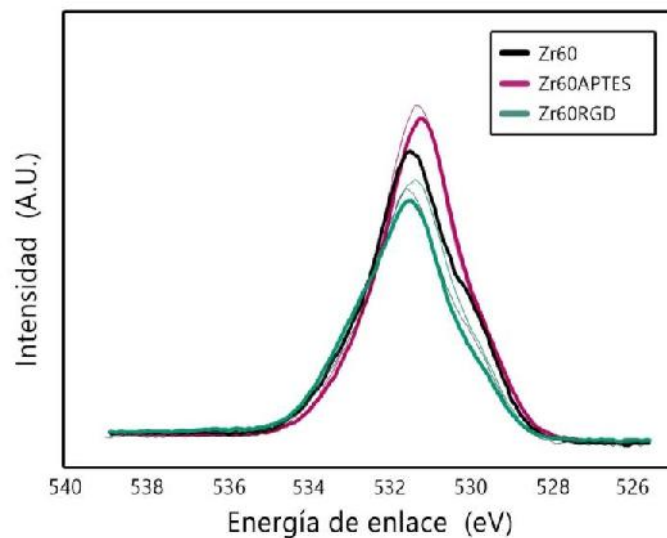


Figura 4.9 – Espectros de alta resolución del pico de O 1s obtenidos para las muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD

N 1s La aparición de un pico N1 de baja intensidad a 401,6 eV (Figura 4.10) denota la presencia de una pequeña cantidad de N en la superficie de las muestras control. Según datos de bibliografía se trataría de nitrógeno molecular [170–172]. Las muestras de Zr60APTES por su parte, muestran dos picos algo más intensos (Figura 4.10), correspondientes a los nitrógenos N2 (no-protonados) y N3 (protonados) del grupo amino terminal del APTES [173, 174] y cuyas energías de enlace son iguales a 400,2 eV y 401,7 eV, respectivamente. De acuerdo con estudios previos, estos resultados indican que los grupos amino de la superficie silanizada estarían parcialmente protonados [173, 174]. Por último, las muestras biofuncionalizadas presentan una relación N3/N2 menor que las muestras de Zr60APTES (ver Tabla 4.2), lo que se traduce en una mayor cantidad de nitrógenono-protonados. Esto quiere decir entonces que la inmovilización de péptidos RGD sobre la superficie silanizada fue exitosa, ya que el pico N2 está asociado a los nitrógenos peptídicos [174].

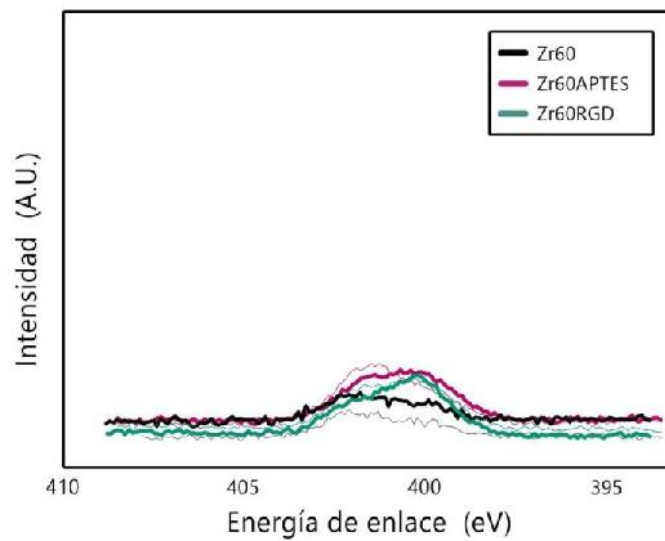


Figura 4.10 – Espectros de alta resolución del pico de N 1s obtenidos para las muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD

P 2p En todos los casos es posible distinguir un pico a 133,4 eV debido a la incorporación de grupos fosfato a la estructura de la película anódica [53, 164]. Es interesante señalar que los resultados obtenidos muestran una mayor relación C/Zr para las muestras de Zr60APTES y Zr60RGD respecto del control, pero no ocurre lo mismo con el P sino que éste mantiene constante su proporcionalidad (ver Tabla 4.2). Estos datos, aparentemente contradictorios, podrían indicar que el espesor de la capa orgánica resultante de la funcionalización no es uniforme. De este modo, existirían áreas no cubiertas donde los óxidos de circonio subyacentes quedarían expuestos y con ellos el P incorporado dentro de su estructura.

Dado que el P se incorpora únicamente en la estructura del óxido anódico, los espectros P 2p de las muestras podrían indicar una menor funcionalización en las regiones donde el óxido anódico presenta mayor espesor y por ende, probablemente, mayor dopaje con P. En consecuencia, el anclaje peptídico ocurriría preferencialmente sobre áreas que presentan un óxido más delgado y homogéneo.

Si bien en el presente estudio se observó que la película anódica sobre las muestras Zr60 presenta un aspecto relativamente irregular, se requieren futuros estudios para evaluar su espesor, como así también, la distribución de P dentro de su estructura.

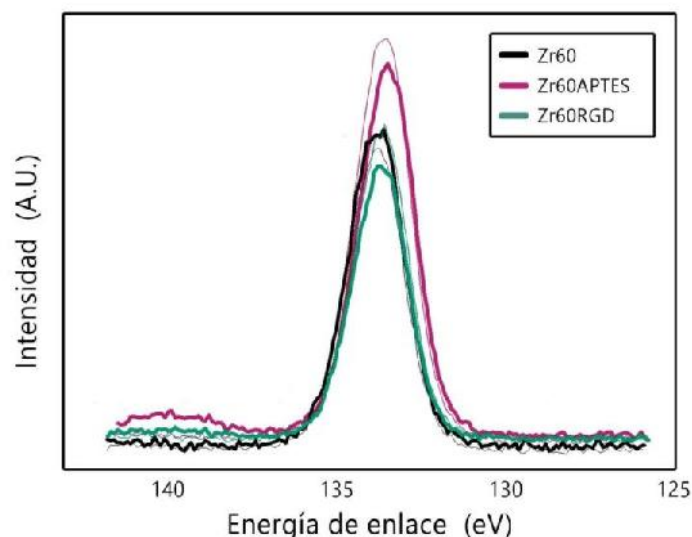


Figura 4.11 – Espectros de alta resolución del pico de P 2p obtenidos para las muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD

Si 2p El pico a 102,3 eV presente en los espectros de Zr60 corresponde a subóxidos SiC y SiO_x [139] provenientes de la contaminación con SiC y SiO₂. Luego, la intensidad total del pico Si 2p incrementa drásticamente para las muestras de Zr60APTES y Zr60RGD como consecuencia de la incorporación de organosilanos sobre su superficie. Puede observarse también un nuevo pico a 103,0 eV que corresponde a los enlaces Si(O₃(OH)) formados durante la silanización con APTES [175]

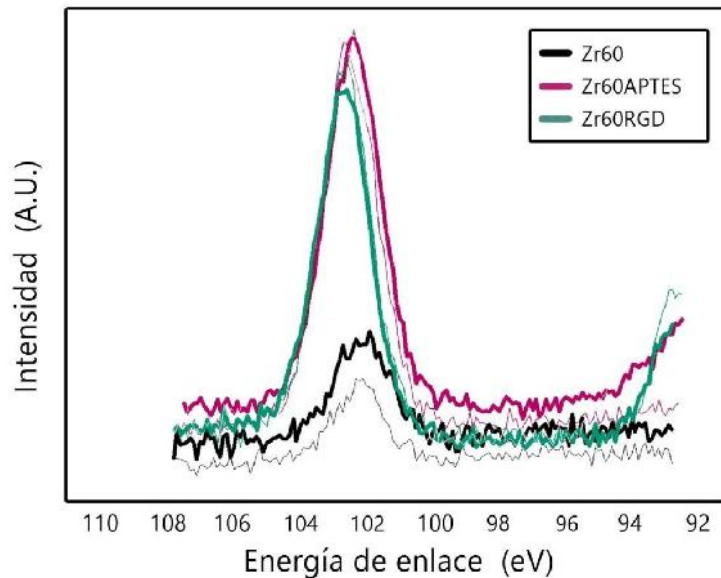


Figura 4.12 - Espectros de alta resolución del pico de Si 2p obtenidos para las muestras de Zr60, Zr60APTES y Zr60RGD

4.1.2. Inspección visual de la superficie al microscopio de barrido electrónico

Las imágenes de alta resolución y magnificación tomadas por SEM muestran en detalle las características superficiales de los materiales estudiados. En la Figura 4.13 se presentan las superficies resultantes luego del anodizado (Zr60) y al cabo de la biofuncionalización (Zr60RGD), previas al ensayo *in vitro* de inmersión en SBF, es decir, a t0.

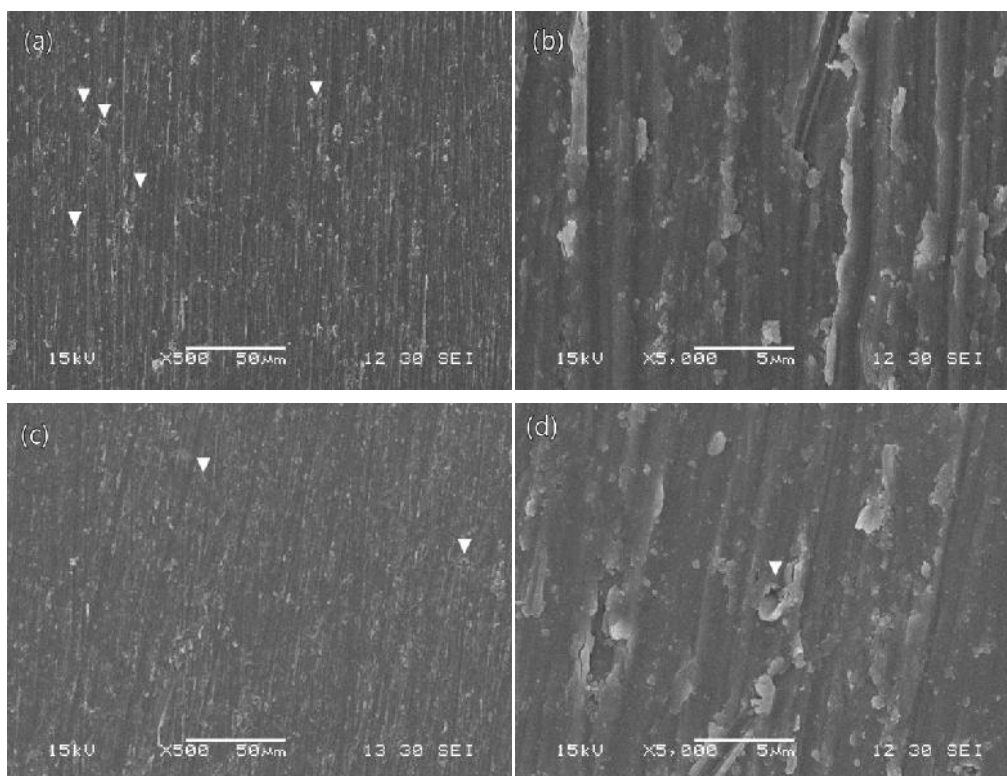


Figura 4.13 – Imágenes SEM de las superficies de (a) Zr60 t0 a 500x, (b) Zr60 t0 a 5000x, (c) Zr60RGD t0 a 500x y (d) Zr60RGD t0 a 5000x

▼ – señala la presencia de poros

La sucesiva deposición de silanos, aldehídos y péptidos RGD no parece alterar la estructura morfológica del óxido, ya que no se aprecian diferencias entre Figuras 3.13 (a) y (c), ni (b) y (d). De todos modos, no es posible distinguir la delgada película orgánica formada en la superficie de las muestras de Zr60RGD. Estos resultados son coherentes con estudios anteriores conducidos sobre titanio [176].

Las imágenes SEM de la superficie de Zr60 muestran una capa de óxido continua, con muy pocos poros dispersos de diámetro submicrónico (Figura 4.13). La aparición de estos poros podría deberse a la incorporación de aniones fosfato provenientes del electrolito, ya que los aniones afectan el transporte local de oxígeno hacia el interior de la película. Existen evidencias previas que la anodización de superficies metálicas empleando electrolitos que contengan iones fosfato induce la formación de películas porosas [145, 177].

La observación de películas anódicas al microscopio electrónico de barrido se caracteriza por la aparición de zonas más claras o brillantes correspondientes a las estructuras submicrónicas del óxido formado [57]. En el presente trabajo, es evidente que el óxido anódico reproduce la topografía de la superficie en la que crece, ya que a lo largo de toda

la muestra se dejan entrever finas líneas paralelas que corresponden a las rayas de pulido. Asimismo, la película anódica que se observa es compacta, presenta una morfología irregular y cubre completamente la muestra. En contraste, Gómez Sánchez *et al.* [151] encontraron un crecimiento no uniforme del óxido para muestras de Zr donde el sustrato fue anodizado sin otro tratamiento previo, es decir, tal como lo suministró el proveedor. Esto indica que el pulido mecánico como se realiza en este trabajo contribuyó directa y favorablemente a la formación de una película anódica continua. Trabajos previos en condiciones análogas obtuvieron resultados semejantes [22, 42].

Dada la posible presencia de fosfatos de calcio depositados sobre la superficie como un indicio de bioactividad, se analizaron muestras de Zr60 y Zr60RGD luego de los ensayos *in vitro* de inmersión en SBF (condición t48). Las imágenes SEM obtenidas se contrastan con el control (t0) en la Figura 4.14.

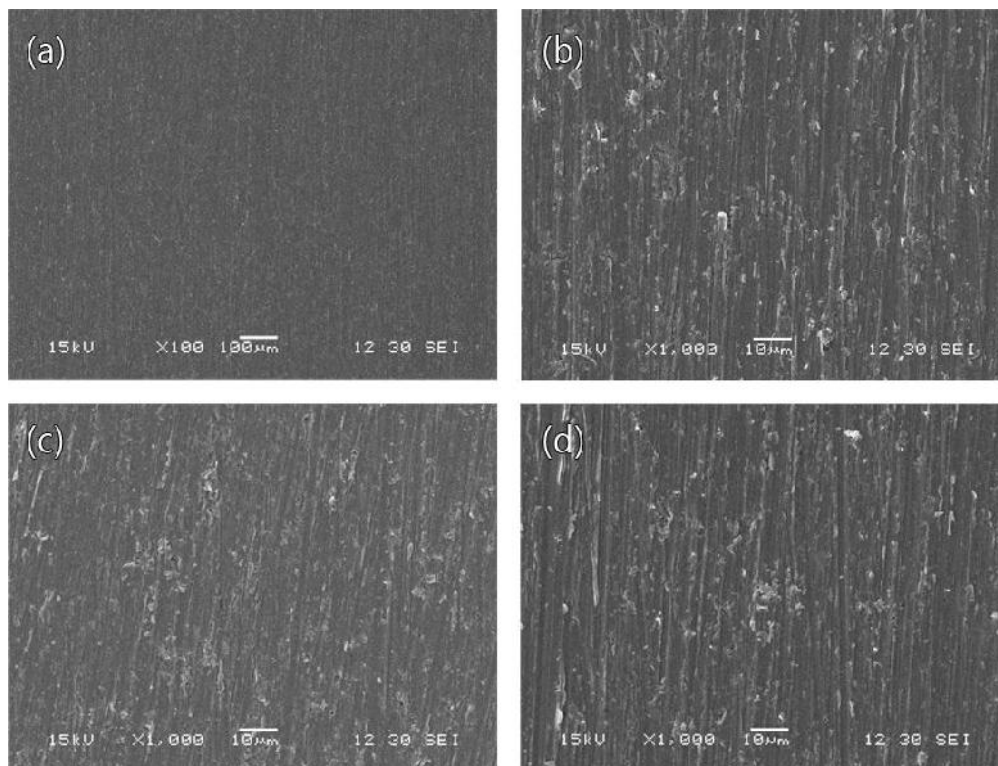


Figura 4.14 - Imágenes SEM de las superficies de (a) Zr60 t0 a 100x*, (b) Zr60 t48 a 1000x, (c) Zr60RGD t0 a 1000x y (d) Zr60RGD t48 a 1000x

*por error no se fotografió esta muestra a 1000x pero a los efectos de este análisis se decide colocar la imagen de 100x. En ningún caso se observan diferencias superficiales apreciables luego de las 48 h de inmersión en SBF. Estudios previos sobre Zr anodizado bajo condiciones similares a las del presente trabajo reportan la aparición de estructuras esferoidales cubriendo la superficie del material para tiempos de inmersión más largos (30 días). Estos precipitados fueron

identificados como compuestos ricos en Ca-P y presentaron espectros Raman compatibles con hidroxiapatita [151].

4.1.3. Análisis de la rugosidad superficial

Numerosos trabajos experimentales han demostrado que la respuesta ósea a la presencia de un implante está fuertemente influenciada por su topografía. Si bien el procesamiento del material influye fuertemente sobre la rugosidad y orientación de la superficie, los materiales obtenidos por los mismos procesos de acabado superficial presentan rugosidades considerablemente disímiles [110]. Por esta razón es importante realizar una caracterización topográfica de la superficie en materiales con aplicación en implantología.

La caracterización mediante perfilometría mecánica permite realizar un análisis de la superficie a partir de perfiles 2D. De la medición directa se obtiene un perfil compuesto y un perfil de ondulación, como se ejemplifica en la Figura 4.15. Este último da cuenta de la inclinación o alabeo que pudiera presentar el sustrato, por lo que debe excluirse del perfil compuesto para obtener el perfil de rugosidad superficial de la muestra. Los tramos inicial y final del perfil compuesto directamente se descartan aplicando un “cut-off”, que en el caso del presente trabajo fue de 0,8 mm como fuera indicado en 1.6.1.2.

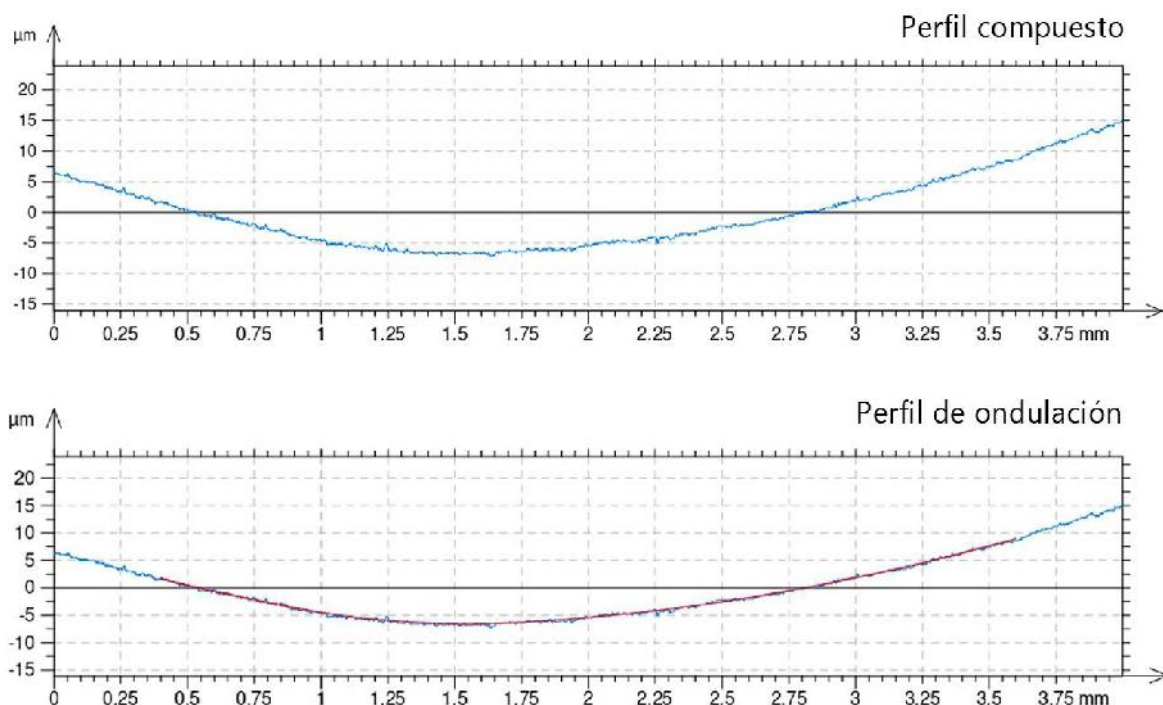


Figura 4.15 – Perfiles resultantes de la medición directa de la rugosidad de una muestra de Zr60 a t0 en dirección perpendicular a las líneas de pulido

Se obtuvieron los perfiles de rugosidad, antes de la inmersión, para muestras de Zr60 (Figura 4.16) y Zr60RGD (Figura 4.17) tanto en dirección paralela a las líneas de pulido como perpendicular a éstas. Los parámetros de rugosidad superficial determinados a partir de dichos perfiles se presentan en la Tabla 4.3.

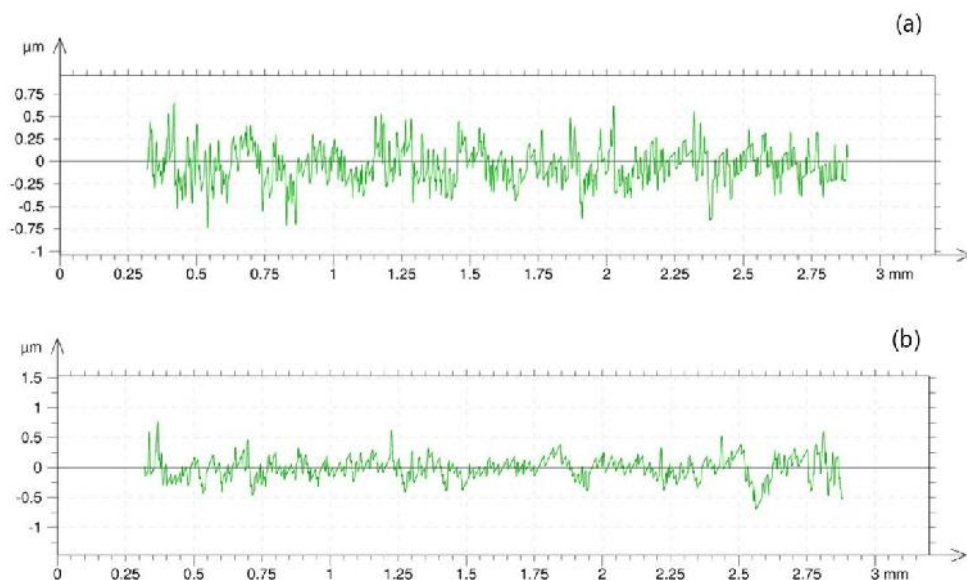


Figura 4.16 – Perfiles de rugosidad de muestras de Zr60 evaluados en la dirección (a) perpendicular a las líneas de pulido (b) paralelo a las líneas de pulido

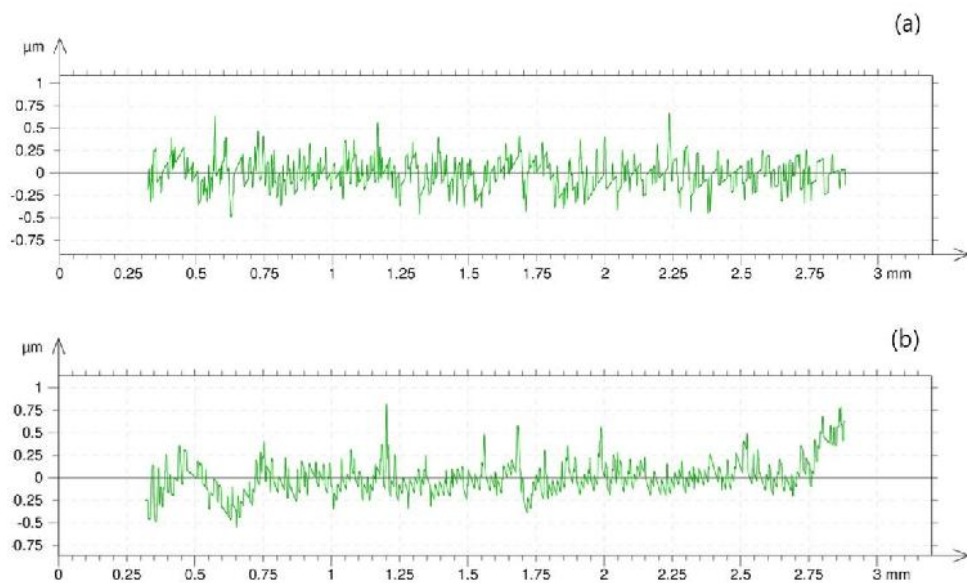


Figura 4.17 – Perfiles de rugosidad de muestras de Zr60RGD evaluados en la dirección (a) perpendicular a las líneas de pulido (b) paralelo a las líneas de pulido

Tabla 4.3 – Parámetros de rugosidad superficial para Zr60 y Zr60RGD a t0

	Valores [μm]			
	DIRECCIÓN //		DIRECCIÓN \perp	
	Zr60	Zr60RGD	Zr60	Zr60RGD
Ra	0,125 \pm 0,005	0,16 \pm 0,08	0,152 \pm 0,008	0,15 \pm 0,04
Rq	0,167 \pm 0,008	0,20 \pm 0,09	0,201 \pm 0,005	0,19 \pm 0,04
Rz	1,03 \pm 0,04	1,0 \pm 0,3	1,37 \pm 0,17	1,09 \pm 0,08

De acuerdo a los valores que se muestran en la Tabla 4.3, los valores medidos coinciden con lo esperado para este tipo de superficies ya que, según bibliografía, las superficies pulidas mecánicamente exhiben valores de Ra entre 0,1-0,4 μm [178] y los biomateriales recubiertos por una película de óxido anódico son, en general, lisos (Ra < 0,5 μm) [110]. Estudios previos sobre la rugosidad de superficies biofuncionalizadas con péptidos RGD de cadena corta, utilizando sustratos indistintos a los del presente trabajo, reportan resultados similares a los aquí descritos [85, 91].

Luego, del análisis comparativo de los parámetros pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Evaluando los valores de Rq, ya que es más sensible a grandes desviaciones de la línea media que su análogo Ra [109], se observa que luego del proceso de biofuncionalización las muestras resultan ligeramente más rugosas en la dirección de las líneas de pulido respecto del control.
- Los valores de Rz registrados indican que con la deposición de RGD se pierde la anisotropía de las muestras anodizadas.
- En casi todos los casos la dispersión de los valores registrados sobre las muestras biofuncionalizadas es mayor que su análoga anodizada.

Esta técnica nada dice acerca de si el cambio que se observa es debido a la presencia de los péptidos RGD, pero permite confirmar la existencia de una película sobre la superficie. Los resultados de XPS presentados en el apartado 4.1.1.2 indican que el anclaje de esta cobertura orgánica no es homogéneo, lo cual posiblemente sea la razón por la cual las

muestras de Zr60RGD presentan mayor dispersión en los parámetros de rugosidad calculados.

Aparentemente la deposición de péptidos RGD acorta la distancia de pico a valle en la dirección perpendicular a las líneas de pulido de las muestras anodizadas, obteniéndose una superficie de rugosidad pareja en ambas direcciones.

No obstante, el cambio observado en la rugosidad de las muestras, producto de la biofuncionalización, se considera demasiado pequeño para ejercer *per se* un efecto sobre la capacidad de oseointegración del material [179, 180]. Además, estudios previos sobre materiales con diferentes topografías pero iguales características generales, demostraron que la mayor reacción osteogénica ocurría en aquellos cuya rugosidad superficial (Ra) estuviera comprendida entre 1–2 μm [110, 181], valores considerablemente mayores que los registrados en el presente trabajo. Sin embargo, otros autores también consideran una buena práctica el uso de superficies lisas para el estudio de ciertas propiedades superficiales [110].

4.1.4. Interpretación del ángulo de contacto estático medido

En la Tabla 4.4 se resumen los resultados de la medición del ángulo de contacto estático por medio de la técnica de gota sésil para un líquido altamente dispersivo, como es el diyodometano. Los valores reportados son la media aritmética del total de valores registrados sobre cada muestra, dados para un intervalo de confianza del 88,89 % de acuerdo con la desigualdad de Chevyshev para distribuciones no normales [182].

Tabla 4.4 - Resultados de la medición de ángulo de contacto estático con diyodometano sobre Zr60 y Zr60RGD

Ángulo de contacto estático [deg]		
	Zr60	Zr60RGD
θ	35,7 \pm 4,0	24,2 \pm 3,2

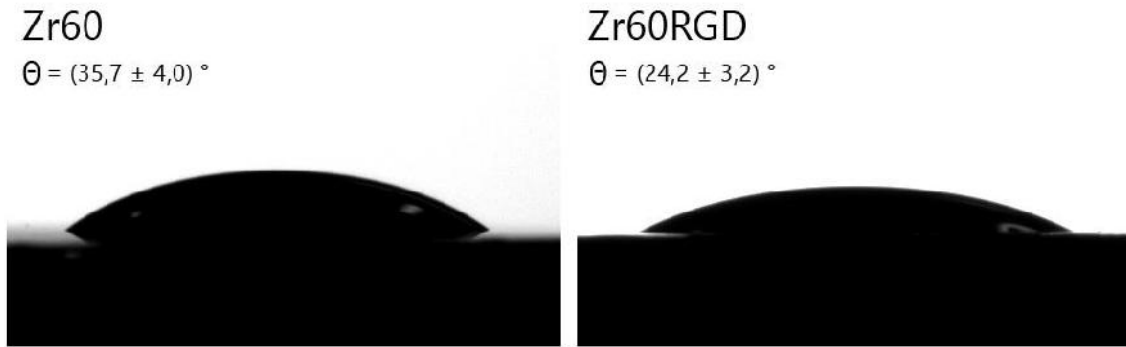


Figura 4.18 – Perfil de gotas de diyodometano sobre la superficie de las muestras

Tal como se puede apreciar en la Figura 4.18, los resultados denotan una leve disminución en el ángulo de contacto formado entre el líquido y la superficie luego del tratamiento de biofuncionalización. En coherencia con el análisis químico y topográfico de la superficie, y análogo a las conclusiones de trabajos similares [183], este cambio de mojabilidad era esperado.

La medida del ángulo de contacto da cuenta del equilibrio entre la superficie sólida y el líquido, y está modelado por la ecuación de Young [101]:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (4.1)$$

donde γ_{SV} , γ_{SL} y γ_{LV} son las energías superficiales sólido-vapor, sólido-líquido y líquido-vapor, respectivamente.

La ecuación 4.1 no puede resolverse para calcular la energía libre superficial (SFE, por sus siglas en inglés) porque presenta dos incógnitas: se desconocen las variables γ_{SV} y γ_{SL} . Existen numerosos métodos indirectos para determinar la SFE de un material sólido. Los más ampliamente utilizados son los métodos de Owens-Wendt y de Oss-Chaudhury-Good [102, 103, 184, 185] que plantean el cálculo de la SFE a partir de sus componentes polar y dispersiva. Estos requieren conocer medidas de ángulo de contacto para dos o tres solventes diferentes, respectivamente.. Los resultados aquí presentados provienen de mediciones preliminares realizadas, en principio, para comenzar a formular ideas acerca de la hidrofiliidad de la superficie. Por razones de fuerza mayor (cese de actividades por la pandemia COVID-19) no fue posible realizar los ensayos con un solvente polar. Por este motivo, a continuación se presenta una alternativa de análisis basado en una teoría que parte algunas suposiciones generales en su desarrollo.

Para el caso de un líquido puro, su vapor, y un sólido que sea rígido, liso, homogéneo e insoluble, sin que ocurra absorción o adsorción; está comprobado termodinámicamente que existe una relación entre las variables que permite estimar γ_{SV} y γ_{SL} a partir de un único valor del ángulo de contacto [186]. Esta relación se conoce como *ecuación de estado para tensiones superficiales*. Partiendo de la regla de Berthelot [187] y la relación Young-Dupré [188] Neumann et al. [186, 189–191] formularon la siguiente expresión:

$$\cos \theta = -1 + 2 \sqrt{\frac{\gamma_{SV}}{\gamma_{LV}}} e^{-\beta(\gamma_{LV} - \gamma_{SV})^2} \quad (4.2)$$

donde β es una constante calculada empíricamente como $0,000115 \text{ (m}^2 \cdot \text{mJ}^{-1})^2$ [186]. Este valor no parece cambiar sistemáticamente con la superficie por lo que el procedimiento puede ser aplicado a cualquier superficie sólida [184, 190].

Conociendo el valor de $\gamma_{LV} = 50,8 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ para el diiodometano en aire [185], se calculó estimativamente la energía libre superficial γ_{SV} resolviendo numéricamente la Ecuación 4.2 [192] (ver detalle en Anexo II). Los resultados se presentan en la Tabla 4.5. Con estos valores sería posible resolver la ecuación de Young (4.1) y obtener, si se deseara conocer, el valor de γ_{SL} . También es interesante destacar que a partir de una única medición de ángulo de contacto sobre cierta superficie, la ecuación de estado (4.2) es una herramienta que permitiría predecir los valores de ángulo de contacto entre dicha superficie y cualquier otro líquido cuya tensión superficial γ_{LV} sea conocida. Trabajos previos evidencian una buena correlación (discrepancias de aproximadamente $\pm 2^\circ$) entre estas predicciones y valores obtenidos experimentalmente [190].

Tabla 4.5 – Resultados de la estimación de la energía libre superficial de Zr60 y Zr60RGD utilizando la ecuación de estado

	Energía libre superficial [$\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$]	
	Zr60	Zr60RGD
γ_{SV}	$42,3 \pm 1,6$	$46,6 \pm 1,0$

Los resultados indican un aumento de la energía libre superficial para el material biofuncionalizado. Esta propiedad se considera fundamental para el análisis de la respuesta del medio biológico a la presencia de un implante ya que controla, durante las

interacciones iniciales, qué proteínas se van a adsorber sobre la superficie del mismo. Estudios han demostrado que la orientación, conformación y bioactividad de las proteínas adsorbidas juegan un papel clave en el comportamiento celular sobre la superficie del biomaterial [193, 194].

Esto no es así en cuanto se refiere al carácter hidrofílico/hidrofóbico de la superficie. En este sentido, existe gran controversia respecto a cómo la mojabilidad de la superficie influye sobre la adhesión celular ya que mientras algunos trabajos reportan mejoras en la biocompatibilidad para superficies más hidrofílicas [195, 196], otros indican todo lo contrario [197, 198]. Indudablemente, la mojabilidad por sí sola no juega un rol dominante en determinar el comportamiento celular y, si bien la respuesta del organismo se verá influenciada por la interacción del agua con la superficie, la reacción de proteínas y células dependerá también de otros factores que incluyen la topografía y el entorno químico que detectan sobre la superficie del biomaterial [193].

4.2. Evaluación del comportamiento electroquímico del material

4.2.1. Resistencia a la polarización (Rp)

La Figura 4.19 muestra los resultados de los ensayos de resistencia a la polarización (Rp) medidos en SBF a 37 °C. Se realizó un ajuste lineal de los datos en el entorno del potencial de corrosión a circuito abierto (OCP).

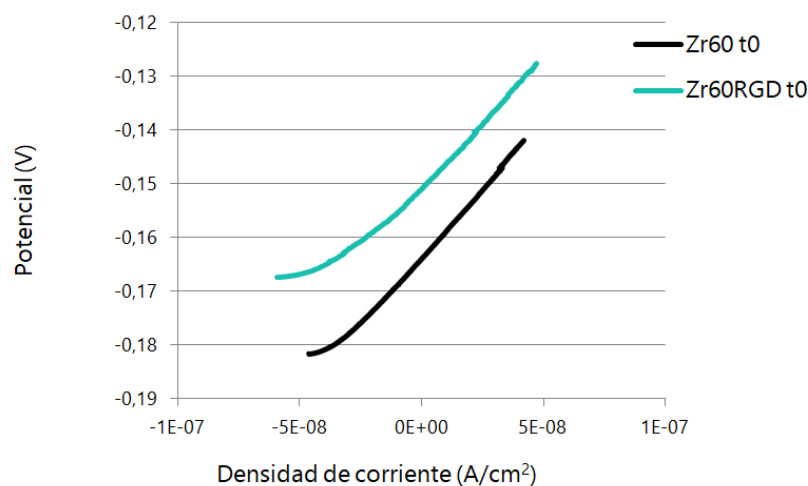


Figura 4.19 – Curvas Rp de las muestras de Zr60 y Zr60RGD ensayadas

El valor de Rp obtenido fue prácticamente el mismo para ambos materiales, igual a $(4,0 \pm 0,1) 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$, lo cual es positivo ya que significa que la deposición de la película orgánica

no provocó un detrimento de las propiedades de resistencia a la corrosión del circonio anodizado.

4.2.2. Espectroscopía de impedancia electroquímica

En la Figura 4.20 se presentan las representaciones de Bode obtenidas de los ensayos de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) para las muestras biofuncionalizadas (Zr60RGD) y su comparación con el material control (Zr60). A su vez, estos ensayos fueron realizados bajo dos condiciones: inmediatamente después de la inmersión en SBF (t_0) y luego de 48 h de inmersión en SBF (t_{48}) a 37 °C. Todas las curvas verificaron las relaciones de Kramers-Kronig con una bondad de ajuste de al menos $5 \cdot 10^{-6}$. De los resultados allí mostrados puede inferirse que la funcionalización no produce detrimento alguno sobre la película anódica formada en la superficie ya que, para la condición t_0 , el valor del módulo de la impedancia total del Zr60RGD se superpone con el del Zr60 en prácticamente todo el rango de frecuencias. Aún más, luego de 48 h de inmersión en SBF, el valor del $|Z|$ extrapolado a frecuencia cero (cuando $\log(f)=1$) medido sobre las muestras biofuncionalizadas se vio ligeramente incrementado, aludiendo a la formación de un film más resistivo.

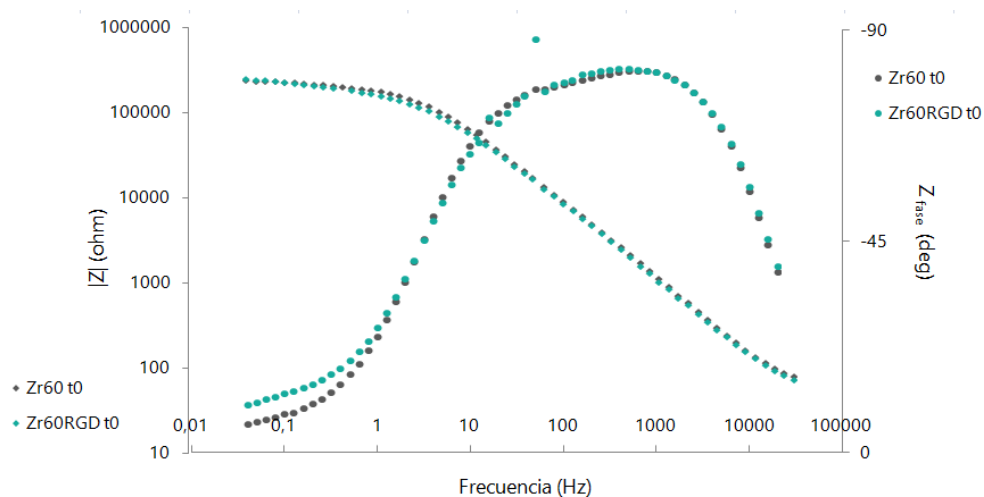


Figura 4.20(a) – Diagramas de Bode de Zr60 y Zr60RGD a tiempo cero

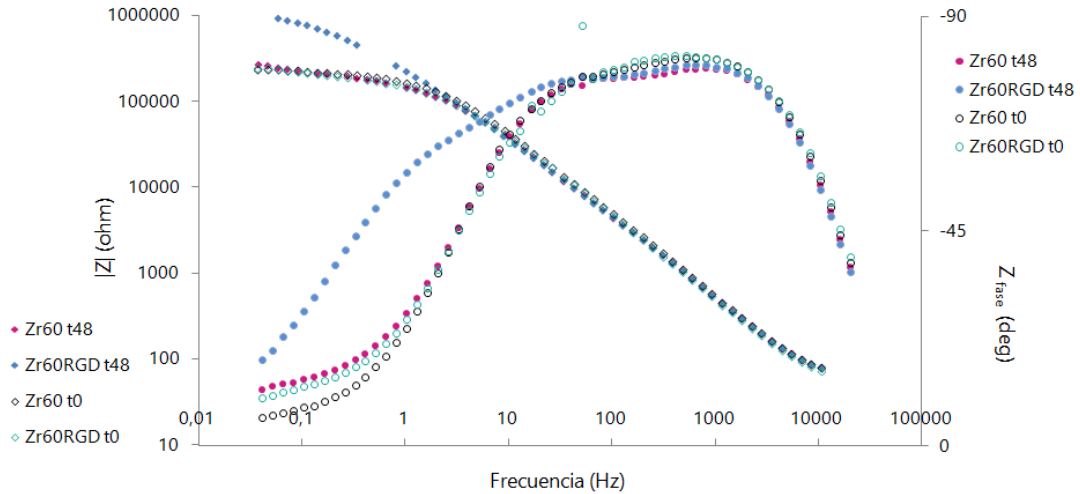


Figura 4.20(b) – Diagramas de Bode de Zr60 y Zr60RGD luego de 48 hs de inmersión en SBF (t48) comparados con la condición inicial (t0)

Se observa que para todas las muestras estudiadas la pendiente de la curva que relaciona el módulo de impedancia con la frecuencia toma valores distintos de 1, indicando que se trata de un capacitor no ideal [199, 200]. La inflexión que se ve en los valores de $|Z|$ representados en función del $\log(f)$ indica la presencia de dos constantes de tiempo (una para cada tramo), sugiriendo que el óxido se comporta como si fuese una estructura bicapa. Este fenómeno es característico de las películas pasivantes y ha sido observado tanto en óxidos nativos de metales como Ti, Ta y Al [201–204], como también para óxidos anódicos de Zr formados bajo la aplicación de potenciales menores a 60 V [154, 164]. El comportamiento a bajas frecuencias se representa como una delgada y compacta capa interna donde se da la conducción eléctrica a través de vacancias de oxígeno o circonio intersticial; mientras que los valores de $|Z|$ y ángulo de fase registrados a frecuencias altas se asocian a una capa dieléctrica externa más gruesa, parcialmente porosa y con una mayor densidad de defectos, en la que se presume que hay electrolito inmiscuido [205–207]. Esto puede ser adecuadamente modelado por un circuito eléctrico equivalente como el que se ilustra en la Figura 4.21.

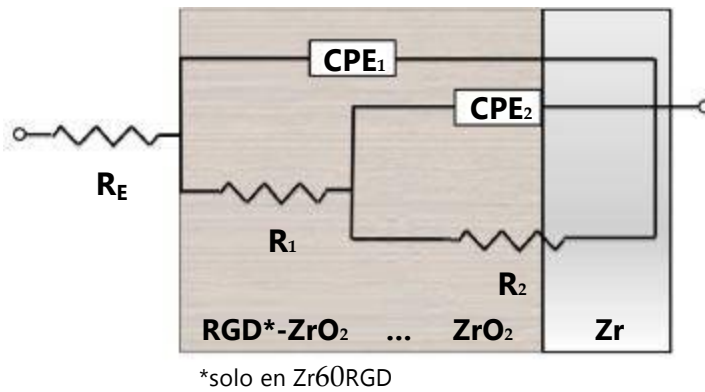


Figura 4.21 – Circuito equivalente al sistema estudiado

Este modelo emplea elementos de fase constantes (CPE, por sus siglas en inglés), en lugar de capacitores a fin de lograr una representación más fiel de los resultados experimentales [137]. La resistencia R_1 está en serie con la resistencia de la solución (R_e) y representa la resistencia del electrolito dentro de los poros de la capa externa (solo óxido anódico en Zr60 mientras que para Zr60RGD incluye la película orgánica también). El elemento de fase constante CPE_1 se corresponde con la capacitancia total de la película superficial, mientras que CPE_2 está relacionado con la capacitancia de la capa interna de óxido anódico compacto, delimitada entre la base de los poros y el sustrato metálico. R_2 representa la resistencia relacionada con esta misma capa interna que está en contacto con el metal.

Para lograr un mejor entendimiento de las características eléctricas del Zr60RGD y compararlas con el control, se calculó la capacidad efectiva (C_{EF}) según la metodología y ecuaciones presentadas en el apartado 1.6.3.2. A partir de los parámetros obtenidos del modelado de las curvas para el intervalo de altas frecuencias se determinó la capacitancia de la película de óxido anódico o el conjunto óxido y película orgánica, según correspondiese. En ambos casos, y tanto a t_0 como a t_{48} , el valor de C_{EF} resultante fue de $(1,30 \pm 0,17) \cdot 10^{-8} \text{ F.cm}^{-2}$, en concordancia con lo esperado para una película semiconductor [208]. No es extraño que todas las muestras presenten valores análogos, dado que la respuesta en la región de altas frecuencias es muy similar para todas las condiciones analizadas. Esto lleva nuevamente a la conclusión de que el tratamiento de biofuncionalización no altera la protección a la corrosión que le fue impartida al material por el óxido anódico formado en su superficie.

4.2.3. Curvas de polarización potenciodinámicas

La Figura 4.22 muestra las curvas de polarización para Zr60 y Zr60RGD a t0. En concordancia con los resultados de EIS se observa que la película pasiva formada por la anodización a 60 V no se ve alterada por el proceso de biofuncionalización ya que las muestras de Zr60RGD permanecen pasivas a lo largo de todo el rango de potencial medido. No ocurre histéresis, ni picado del óxido.

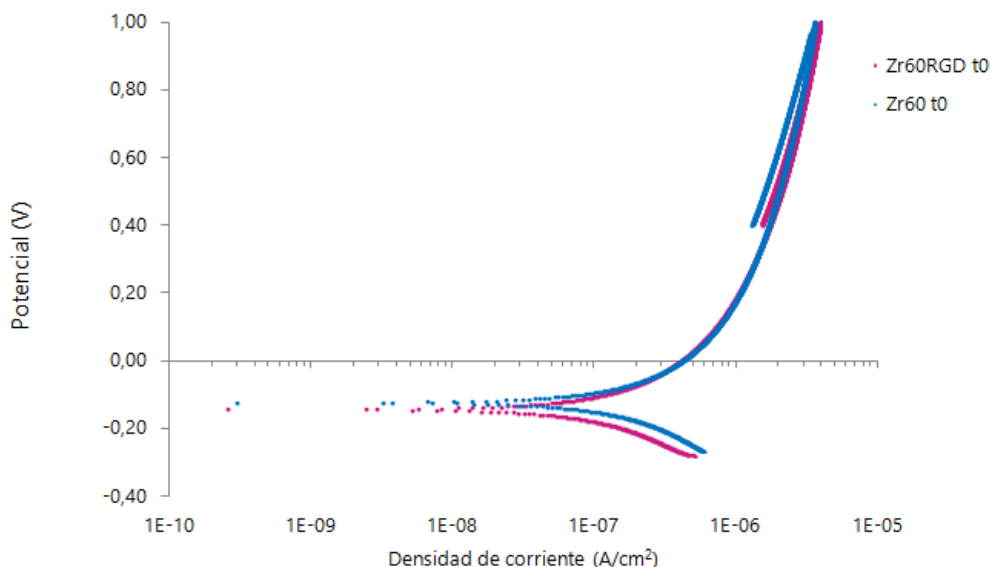


Figura 4.22 – Curvas de polarización potenciodinámicas

Los resultados de los ensayos a 48 h de inmersión en SBF arrojaron valores dispares, por lo que se requeriría realizar un mayor número de repeticiones para poder extraer conclusiones sobre la observación o no de una tendencia. Por razones de fuerza mayor, no fue posible repetir los experimentos en el marco del presente trabajo.

4.3. Evaluación de la biocompatibilidad

4.3.1. Evolución del material tras la inmersión en SBF

Las muestras que permanecieron en solución de fluido corporal simulado durante 48 h (t48) fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía Raman para analizar la posible presencia de compuestos de apatita depositados sobre la superficie, indicativos de bioactividad [98, 99]. Sin embargo, no fue posible detectar compuestos que se relacionen con hidroxiapatita por ninguna de las dos técnicas luego de solo 48 h de inmersión.

La simulación *in vitro* de las condiciones biológicas (pH, concentraciones iónicas, temperatura) por medio de ensayos de inmersión en SBF y posterior análisis de la superficie en busca de deposición de carbonatos y fosfatos de calcio, es una técnica ampliamente utilizada para predecir la bioactividad de materiales con aplicación en el campo biomédico vinculado al sistema óseo. Sin embargo, según la norma ISO/FDIS 23317:2014(E) y conforme se ha evidenciado en trabajos previos, esto no excluye la posibilidad de que ciertos materiales formen una unión directa con el tejido óseo aunque no haya sido posible detectar la formación de compuestos de apatita en los ensayos *in vitro* [95]. Incluso se han detectado no solo falsos negativos, sino también falsos positivos a la hora de correlacionar la deposición de apatita *in vitro* con la proliferación y diferenciación celular *in vivo* [96].

4.3.2. Ensayos *in vitro* de viabilidad celular

Está ampliamente comprobado que el anclaje de las células al entorno en el que se encuentran determina su morfología y metabolismo celular, siendo así un factor clave para mantener la integridad tisular [209]. En el presente trabajo, la superficie del material fue modificada con péptidos que contienen la secuencia RGD (argenina-glicina-aspartato) con el propósito de generar un entorno similar a la matriz extracelular del tejido óseo, de manera de promover eficientemente la adhesión celular [88]. Numerosos estudios manifiestan que esto se consigue siempre y cuando exista una cierta distancia entre la secuencia bioactiva y la superficie del material que asegure la correcta accesibilidad de las células y sus receptores de integrinas a las moléculas de anclaje, en este caso péptidos RGD [77, 78]. Por lo tanto, para inmovilizar estas moléculas sobre la superficie del Zr anodizado se utilizaron silanos (APTES) y glutaraldehído como agentes acoplantes. Esta estrategia ha sido aplicada con éxito en numerosas investigaciones sobre la funcionalización de superficies metálicas, reportándose una óptima adhesión de osteoblastos sobre las mismas [78, 85, 165].

El efecto de funcionalizar de esta forma la superficie de Zr anodizado sobre la biocompatibilidad del mismo, fue analizado en función de la adhesión y morfología de células MG-63 por microscopía electrónica de barrido (SEM) luego de ensayos *in vitro* de corta duración. Acorde a Czekanska et al., esta línea celular, derivada de un osteosarcoma humano, es una alternativa válida para evaluar el anclaje celular inicial sobre diversos materiales [210].

Los resultados del análisis cualitativo de las imágenes SEM presentadas en la Figura 4.23, mostraron adhesión de la línea MG-63 sobre ambas superficies, tanto la del control (Zr60) como la superficie biofuncionalizada (Zr60RGD). No obstante, se observaron claras diferencias en cuanto al grado de cobertura de la superficie y a la morfología celular exhibida por las células sobre cada muestra. Luego de 48 h de cultivo, sobre la superficie control solo se observaron células dispersas con pocos puntos de contacto entre ellas (Figura 4.23 a-c), indicando una adhesión celular deficiente para el Zr60. En cambio, la superficie modificada con péptidos RGD se encontraba completamente cubierta por células formando una monocapa confluyente. La mayor parte de las células ancladas al Zr60RGD mostraron buena extensión celular y formaron una red de proyecciones citoplasmáticas que se extendía hacia el sustrato metálico y las células vecinas (Figura 4.23 d-f). Estas protrusiones de membrana se conocen bajo el nombre de filopodios y se extienden desde el extremo directriz de células en migración, mediando dicho fenómeno y formando adhesiones locales con el entorno. En las células sembradas sobre la superficie del Zr60 este tipo de proyecciones citoplasmáticas, si presentes, eran apreciablemente más cortas (Figura 4.23 c).

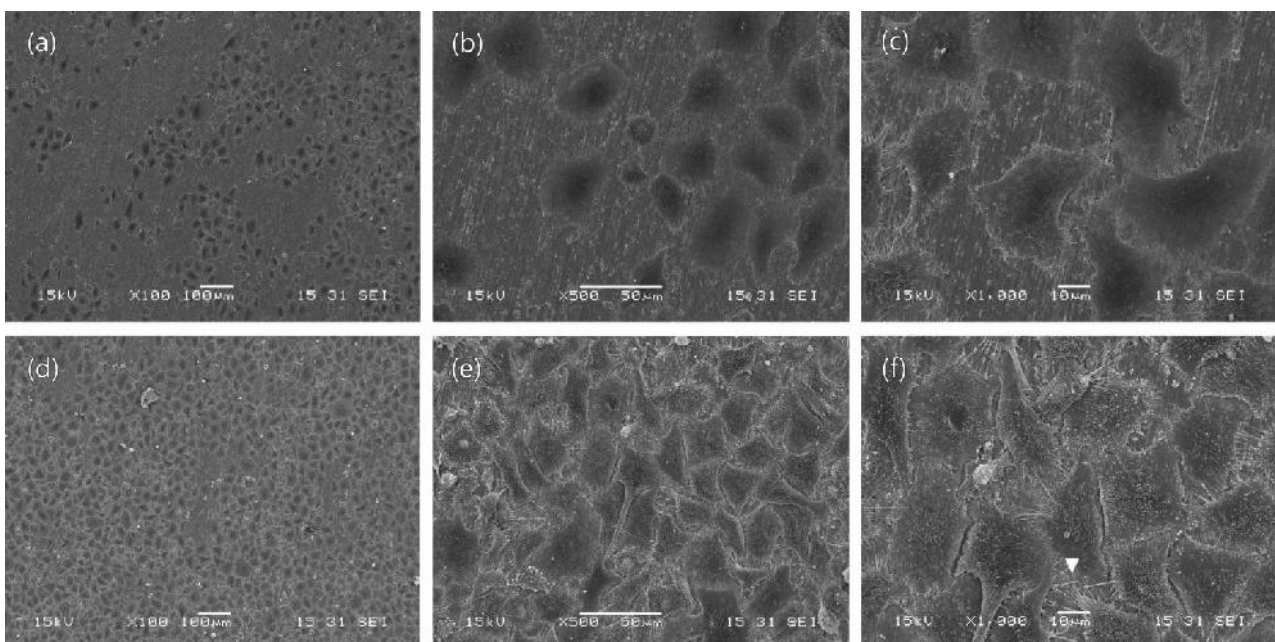


Figura 4.23 – Morfología de las células MG-63 luego de 48 hs de cultivo sobre muestras de (a-c) Zr60 y (d-f) Zr60RGD bajo objetivos de 100x, 500x y 1000x

▼ – señala la presencia de filopodios

A partir del análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por SEM, se calcularon los parámetros morfométricos de elongación, área y redondez presentados gráficamente en la Figura 4.24. El estudio estadístico de los resultados obtenidos para los parámetros factor de elongación y redondez se realizó mediante la prueba t de Student, mientras que para el análisis del área celular se empleó un test no paramétrico por no cumplir con el supuesto de normalidad. En primer lugar, los resultados muestran que la biofuncionalización induce un notorio incremento en el tamaño de las células, dado por un mayor valor medio para el área de las células MG-63 fijadas sobre las muestras de Zr60RGD que para las fijadas sobre Zr60. De comparar la longitud de extensión sobre cada superficie se concluye que la película orgánica de péptidos RGD promueve la elongación de las células adheridas, ya que éstas se ven considerablemente más alargadas sobre el Zr60RGD que sobre el Zr60. Naturalmente, este incremento en la extensión longitudinal se vio acompañado por una caída en la redondez de la morfología de las células observadas sobre el Zr60RGD.

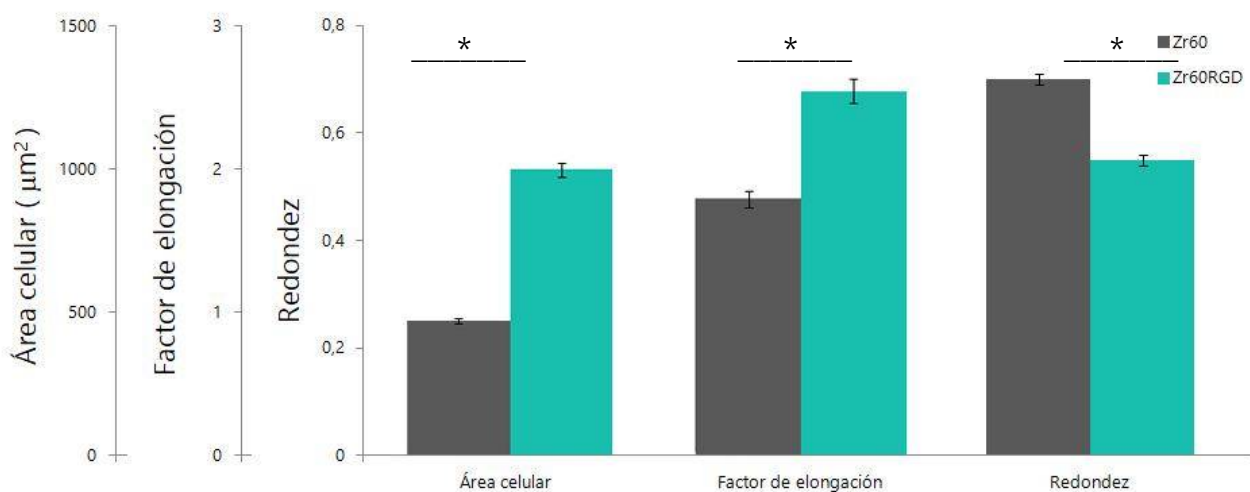


Figura 4.24 – Resultados del análisis morfométrico para las células sembradas sobre Zr anodizado y Zr anodizado biofuncionalizado

* – indica diferencia significativa

Combinados, estos resultados revelan que para 48 h de cultivo la adhesión celular fue más eficiente sobre superficies recubiertas por péptidos RGD sobre el óxido anódico, que sobre las superficies meramente anodizadas. Evidentemente, la presencia de esta película orgánica sobre las muestras de Zr60RGD indujo una mayor adhesión y confluencia de las células de la línea MG-63, incluso a pesar de que, acorde a la caracterización por XPS descrita en 4.1.1.2, la superficie no estuviera uniformemente cubierta de péptidos RGD. Esta observación podría atribuirse a la capacidad de la película de óxido subyacente de

estimular, en menor medida pero aún así, la adhesión celular, como también el proceso de oseointegración *in vivo*, tal como describen trabajos previos [54, 57, 211].

Queda claro que la biofuncionalización con péptidos RGD ejerce entonces un efecto favorecedor de la adhesión celular sobre la superficie de Zr anodizado, convirtiéndola en una estrategia óptima para mejorar la interacción célula-sustrato. Resultados análogos fueron reportados por Ryu et al. para células de tipo osteoblástico sobre Ti anodizado y funcionalizado con péptidos RGD, tanto químicamente luego de un proceso de silanización así como también mediante adsorción física [65]. Los autores no solo observaron mejor adhesión celular sobre las superficies biofuncionalizadas en comparación con la condición control (Ti anodizado), sino que además señalaron un efecto significativamente mayor para las muestras que habían sido funcionalizadas mediante anclaje químico respecto a aquellas modificadas por fisisorción. Sin embargo, las condiciones experimentales del proceso de anodizado y biofuncionalización por técnicas químicas son ampliamente diferentes a las del presente trabajo, descritas en 3.2, por lo que no se puede establecer una comparación directa de los resultados.

5. Análisis económico

5.1. Introducción al análisis de factibilidad económica

El presente apartado pretende analizar, a partir de una evaluación simple de los costos de producción y de la demanda del mercado, qué tan viable resultaría la fabricación de implantes permanentes de Zr puro junto con la implementación del tratamiento de anodizado y biofuncionalización propuestos (Zr60RGD), para su comercialización en el ámbito clínico.

La factibilidad de que el uso de este material bioactivo se instaure como una alternativa a los implantes cementados convencionales está dada, desde el punto de vista económico, por la relación costo/calidad que presente frente a sus competidores directos en el mercado. Como punto de partida se calculó un precio de venta estimativo y se lo comparó con el costo final correspondiente a dispositivos semejantes fabricados de la aleación Ti6Al4V, con y sin modificaciones a su superficie. La conducción de este análisis se basó sobre el vástago femoral que compone a las prótesis para reemplazo total de cadera.

5.2. Definición del mercado objetivo

La principal causa de falla de los implantes permanentes es el aflojamiento protésico. Este puede deberse a una infección (aflojamiento séptico) o bien estar asociado al material y la tecnología de diseño del implante (aflojamiento aséptico). El aflojamiento aséptico es consecuencia del desgaste de las superficies en la parte articulada del implante o de la desintegración del cemento adhesivo de las prótesis no-biactivas ya sea en la interfaz cemento-hueso o implante-cemento. Largos períodos de sollicitación mecánica asociada con la locomoción ocasionan el desprendimiento de partículas por una u otra de estas causas. Dichas partículas de desgaste o desintegración inducen una respuesta biológica negativa caracterizada por una reacción inflamatoria en el hueso inmediatamente adyacente que culmina en la pérdida ósea y el desprendimiento del implante. Esto lleva a que el paciente deba someterse nuevamente a una cirugía denominada cirugía de revisión [212].

Se considera que cuanto más joven sea el paciente, mayor será el riesgo de revisión debido a sus niveles mayores de actividad en comparación con los pacientes de edad avanzada. Además, la mayor esperanza de vida de la población ejerce directamente un aumento en la probabilidad de cualquier paciente implantado de necesitar someterse a una cirugía de revisión. De este modo, la introducción de tecnologías de implantes de avanzada se abren camino ante esta necesidad de mejorar la longevidad del implante en pacientes jóvenes. Naturalmente los costos asociados son más altos, por lo que su costo-efectividad para la población de pacientes de edad avanzada es cuestionable [213].

En función de esta información, el presente proyecto económico se enfoca en satisfacer las necesidades específicas de un mercado en rápido crecimiento, del cual se estima que podría abarcarse un 20%. Pensando en la industria nacional proyectada de aquí a 2030, se calcula una demanda de 125000 prótesis de cadera al año², que a los fines de este análisis representa el requerimiento de una producción anual de 25000 vástagos femorales.

5.3. Ingeniería de la producción

A los fines prácticos, siendo que se trata de un material muy similar al titanio en sus propiedades, se asume que los métodos de procesamiento para ambos materiales son

² Valores calculados a partir de datos provenientes del Hospital Alemán [216] y del Hospital Italiano [217] de la Ciudad de Buenos Aires (ARGENTINA) y ponderados contra estudios realizados en los Estados Unidos [218] llevados a valores equivalentes acorde a las proyecciones poblacionales del INDEC para Argentina.

fundamentalmente los mismos. De esta forma, se excluyen del análisis las etapas del proceso de fabricación que conducen a la obtención de la pieza de base. Para el caso de los implantes Ti6Al4V, el proceso en sí finaliza con la obtención del vástago femoral en metal macizo como el de la Figura 5.1.



Figura 5.1 – Modelo del componente a fabricar

En el caso del Zr60RGD, inmediatamente luego del maquinado o pulido industrial que otorga al vástago metálico su acabado superficial, la pieza sería sometida a los tratamientos de anodizado y biofuncionalización. Este proceso se aplica únicamente sobre la porción descendente que es lo que une la prótesis al fémur y se desea que tenga una biocompatibilidad mayor. Las dimensiones del vástago para prótesis de cadera no son estándares, pero la porción del mismo que se modifica superficialmente puede ser representada por un cono truncado de superficie equivalente y dimensiones iguales a $\varnothing_{\text{MENOR}} = 10 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{MAYOR}} = 24 \text{ mm}$, $h = 140 \text{ mm}$. Los pasos del proceso de modificación superficial, haciendo mención a los respectivos equipos e insumos utilizados, se detallan a continuación:

- (1) Limpieza en baño ultrasónico de alcohol isopropílico para la remoción de impurezas o productos de abrasión generados durante el procesamiento.
- (2) Anodizado a 60 V (aplicado por una fuente de corriente continua) en H_3PO_4 de concentración 1 mol.L^{-1} durante 1 h.
- (3) Enjuague con acetona e inspección visual a ojo desnudo.
- (4) Inmersión en alcohol isopropílico durante 24 h. Secado por capilaridad con papel absorbente.

- (5) Inmersión durante 19 h en solución 0,05% v/v de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) en agua destilada.
- (6) Tres lavados con agua destilada.
- (7) Inmersión durante 4 h en solución 1% v/v de glutaraldehído preparada con 0,1 mol.L⁻¹ buffer fosfato.
- (8) Tres lavados con buffer fosfato.
- (9) Inmersión durante 19 h en una solución conteniendo péptidos RGD disueltos en buffer fosfato a una concentración de 1mg.mL⁻¹.
- (10) Tres lavados con buffer seguidos por tres lavados más con agua destilada.
- (11) Esterilización ultravioleta (UV).
- (12) Embalaje, etiquetado y conservación a 0-4 °C al resguardo de la luz.

Este proceso podría montarse sobre una línea de producción anexa a una planta industrial existente. Si se trata de una planta que está operativa 7 días a la semana, se debería producir a razón de 68 piezas por día, desestimando el período de puesta en marcha. Se calcula que en un turno de 8 horas, un operario podría trabajar sobre 18 piezas, pero dados los tiempos del proceso (períodos de inmersión de hasta 24 h) se necesitaría contar con 8 operarios fijos a cargo de un supervisor de planta responsable de controlar el proceso.

5.4. Análisis de costos

Hasta donde llega el conocimiento de los autores del presente trabajo, no existen en el mercado implantes a base de circonio metálico puro [214]. Con fines prácticos, se asumió que los métodos de procesamiento para la obtención de piezas de Zr son fundamentalmente los mismos que para el Ti6Al4V, por ende, la diferencia en el costo de fabricación de la pieza de base reside esencialmente en el precio de la materia prima. En vistas de que la mayoría de los valores presupuestados se encuentran en dólares (USD) y que la moneda Argentina no es estable, los resultados se reportan en USD.

Corresponde entonces, calcular el costo de producción del Zr60RGD con base en el proceso de modificación superficial. Para ello se recurrió a un análisis económico estimativo donde se contemplaron la inversión inicial para la compra de equipos (baño de ultrasonido industrial, seis fuentes para realizar el anodizado, cámara de refrigeración y esterilizador UV) y la puesta en marcha del proceso de producción (estimada como un porcentaje del costo total de los equipos instalados). No se tuvo en cuenta gastos de terreno ni de

instalación edilicia y de servicios, dado que, como ya se expresó, se pensó el proceso de manera tal de poder incorporarlo como una línea más de producción dentro de una planta ya existente. Los costos de materia prima, insumos, envases, mano de obra, supervisión, servicios y administración se calcularon a partir de datos reales mientras que el resto de los costos se obtuvieron aplicando valores porcentuales estimativos de acuerdo a las indicaciones de la Cátedra de Ingeniería Económica de la Facultad de Ingeniería de la UNMdP [142]. La depreciación anual se calculó a diez años utilizando el método de línea recta.

A partir de los valores obtenidos se calculó el “gasto adicional” por unidad, es decir, cuánto más cuesta la producción de implantes de Zr60RGD por encima del costo de fabricación del implante cementado de Ti6Al4V. El monto asciende a un valor de 719,90 USD. El detalle del cálculo se muestra a en el Anexo III.

5.5. Determinación del precio de venta

Actualmente, los implantes de Ti6Al4V se comercializan a un valor medio de 760 USD³. Estimando un margen de ganancias del 30%, esto querría decir que el costo de producción asociado a la fabricación del vástago femoral ronda los 585 USD. Si dicho monto se ajusta para Zr puro y se suman los costos de producción ligados al tratamiento superficial de anodizado y biofuncionalización (incluyen gastos de instalación de la línea productiva) se puede calcular el precio de venta aplicando nuevamente un margen de ganancias del 30%. El precio de venta sugerido equivaldría entonces a 1695 USD.

5.6. Conclusiones sobre la rentabilidad

Teniendo en cuenta que el producto propuesto significaría un incremento sustancial en la longevidad del implante, reduciendo ampliamente las incurrencias en cirugías de revisión que representan un riesgo en sí mismas e involucran la pérdida de tejido óseo en la remoción, además de que representan un costo adicional importante [215]; se concluye que el uso de Zr60RGD para implantes de cadera es factible desde el punto de vista económico. Si bien es cierto que el costo es más elevado, está justificado por el aumento en la calidad que éste trae aparejado, en especial apuntado al mercado objetivo de pacientes jóvenes. Más aún, el precio resulta competitivo respecto al de otras prótesis no

³ Fabricante: MBA Surgical Empowerment, España.

cementadas disponibles comercialmente (Ti6Al4V recubierto con HAp por la técnica de “plasma spray”, valor 1550 USD³).

6. Consideraciones finales y conclusión

Las consideraciones más destacables de los resultados previos se resumen a continuación.

Fue posible obtener películas delgadas funcionalizadas con péptidos RGD sobre circonio anodizado. El óxido anódico que se forma por anodizado reproduce la topografía de la superficie en la que crece. La película anódica que se observa es compacta, presenta una morfología irregular y cubre completamente la muestra.

Por medio de espectroscopia Raman se observa que la estructura cristalina del óxido formado por anodización es predominantemente de la forma alotrópica monoclinica donde se pueden detectar en su composición compuestos de fósforo, provenientes del electrolito. Por medio de esta técnica no fue posible corroborar la presencia de biomoléculas luego de realizada la funcionalización.

Mediante XPS de alta resolución se corrobora la presencia del óxido superficial detectado por Raman, y se puede comprobar la presencia de la película orgánica resultante de la funcionalización. Acorde al espectro XPS del Zr60RGD, se identifican enlaces C–N, C–O, C–O–C y H–O–C, junto con el entorno químico C–NH₃⁺, propios de la secuencia peptídica. Por último, las muestras biofuncionalizadas presentan una relación N3/N2 menor que las muestras de Zr60APTES lo que se traduce en una mayor cantidad de nitrógenos no-protonados. De acuerdo con estudios previos, esto indica que los grupos amino de la superficie silanizada estarían parcialmente protonados [173, 174]. Esto sugiere que la inmovilización de péptidos RGD sobre la superficie silanizada fue posible, pues la señal de N2 está asociada a los nitrógenos peptídicos. Por su parte, la señal de P se mantiene constante luego del anclaje peptídico, lo que podría indicar una menor eficiencia de la funcionalización en las regiones donde el óxido anódico desarrolló mayor espesor. En consecuencia, el anclaje peptídico ocurriría preferencialmente sobre áreas que presentan una película de óxido más delgada.

La rugosidad superficial aumenta levemente luego de la funcionalización. Si bien no hay una rugosidad óptima para los implantes, Anselme y Bigerelle [146] evaluaron la respuesta

de células madres mesenquimales humanas frente a cambios en la rugosidad y reportaron que existe un amplio intervalo de rugosidad que es adecuado para la adhesión celular luego de dos días de cultivo. Según sus resultados, los valores óptimos dependerán del tamaño relativo entre el tipo de célula estudiada y la rugosidad. Con una rugosidad por encima o por debajo de su propio tamaño se adherirán esencialmente a las características nano- y submicrónicas de la superficie, mientras que cuando las características de las superficies sean de un tamaño aproximado al propio de las células la adhesión se verá marcadamente reducida. En nuestro caso, los valores de rugosidad se encuentran por debajo del tamaño de las células de interés.

Los resultados de ángulo contacto indican un aumento de la energía libre superficial para el material biofuncionalizado respecto del control. Este aumento se considera favorable ya que esta propiedad es importante para propiciar las interacciones iniciales entre el material a implantar y los fluidos circundantes, en lo que a la adsorción de proteínas respecta.

De los resultados electroquímicos puede observarse que el proceso de funcionalización no produce detrimento alguno sobre la película anódica formada en la superficie, la cual mantiene sus propiedades favorables frente a la corrosión en fluidos fisiológicos simulados.

Los resultados *in vitro* realizados con las células de la línea MG-63 mostraron adhesión sobre la superficie control (Zr60) y la biofuncionalizada (Zr60RGD). No obstante, se observaron claras diferencias en cuanto al grado de cobertura de la superficie y a la morfología celular sobre cada muestra luego de 48 h de cultivo. Mientras que en las muestras control solo se observaron células dispersas con pocos puntos de contacto entre ellas, la superficie modificada con péptidos RGD se encontraba completamente cubierta por células formando una monocapa confluyente. Asimismo, la morfología que presentaban las células sobre las muestras funcionalizadas es indicativa de un proceso de adhesión más favorable. Combinados, estos resultados muestran que para 48 h de cultivo, la adhesión celular fue más eficiente sobre superficies recubiertas por péptidos RGD sobre el óxido anódico, que sobre las superficies sin funcionalizar.

Por último, un análisis económico básico indica que la inserción de estos materiales en el mercado sería factible.

Con base en estos resultados, puede concluirse que la modificación de las superficies de circonio anodizadas con péptidos de cadena RGD es practicable y sus efectos son prometedores para continuar su estudio como posibles implantes no cementados oseointegrables.

7. Trabajo futuro

En vistas de los resultados obtenidos y valiéndose del aprendizaje adquirido durante el desarrollo de esta investigación, a futuro se propone continuar trabajando con el estudio del sistema Zr/RGD de la siguiente manera:

- Estudiar la evolución del sistema a mayores tiempos de inmersión en medio fisiológico simulado (7, 14 y/o 30 días) repitiendo los ensayos de electroquímica para las muestras de Zr60RGD luego de dichos períodos.
- Realizar un mapeo de la superficie del Zr60 para determinar la distribución de P dentro de la película anódica y así poder verificar la hipótesis de que la misma no es homogénea y esto influye en el proceso de anclaje del péptido a la superficie.
- Evaluar el cambio en la energía libre superficial (SFE) luego de la biofuncionalización mediante alguno de los métodos que permiten determinar las componentes polar y dispersiva de la SFE. Para ello, se requerirá tomar medidas del ángulo de contacto con dos o más solventes diferentes, como pueden ser agua y diyodometano.
- Realizar la misma caracterización superficial que en el presente trabajo se hizo para t0 y t48 pero para una nueva condición “t_{ESTERIL}” que refleje el estado del material previo a la implantación para analizar la posible ocurrencia de efectos adversos provocados por el proceso de esterilización.
- Biofuncionalizar muestras de Zr sin anodizar para poder analizar cómo es el efecto que la película anódica ejerce sobre el proceso de funcionalización y/o sobre las propiedades del producto final en términos de biocompatibilidad.
- Caracterizar la respuesta biológica *in vitro* de células de linaje osteoblástico (preosteoblastos u osteoblastos) sobre superficies de circonio anodizado, con y sin recubrimiento peptídico, mediante ensayos de adhesión y proliferación a diferentes tiempos.

REFERENCIAS

- [1] Q. Wang *et al.*, “Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: a review”, *Nanomaterials*, vol. 10, no. 6, pp. 1–27, 2020, doi: 10.3390/nano10061244.
- [2] M. İzmir and B. Ercan, “Anodization of titanium alloys for orthopedic applications”, *Front. Chem. Sci. Eng.*, vol. 13, no. 1, pp. 28–45, 2019, doi: 10.1007/s11705-018-1759-y.
- [3] R. Agarwal and A. J. García, “Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 94, pp. 53–62, 2015, doi: 10.1016/j.addr.2015.03.013.
- [4] T. Sjöström, A. S. Brydone, R. D. Meek, M. J. Dalby, B. Su, and L. E. Mcnamara, “Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices”, *Nanomedicine*, vol. 8, no. 1, pp. 89–104, 2013, doi: 10.2217/nnm.12.177.
- [5] S. Kurtz, K. Ong, E. Lau, F. Mowat, and M. Halpern, “Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the united states from 2005 to 2030”, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 89, no. 4, pp. 780–785, 2007, doi: 10.2106/JBJS.F.00222.
- [6] H. F. S. AL YAFEI, “Tribo-mechanical, biocompatibility, and corrosion properties investigation of zirconium and sst304 by application of hydroxyapatite/reduced graphene oxide/palladium-platinum nanocomposite coatings”, Qatar University, 2020.
- [7] C. P. Bergmann and A. Stumpf, “Biomaterials”, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013, pp. 9–13.
- [8] D. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.
- [9] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials”, *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [10] D. F. Williams, “The language of biomaterials-based technologies”, *Regen. Eng. Transl. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 53–60, 2019, doi: 10.1007/s40883-018-0088-5.
- [11] J. Bianchi and S. A. Maturana, “Sistematización de modelo experimental in vivo para evaluación de biomateriales como reemplazo óseo”, UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, 2016.
- [12] I. Gotman, “Characteristics of metals used in implants”, *J. Endourol.*, vol. 11, no. 6, pp. 383–389, 1997.
- [13] N. A. Salvatierra, C. R. Oldani, L. Reyna, and R. A. M. Taborda, “¿Qué es la

biocompatibilidad?”, *Rev. Argentina Bioingeniería*, 2009.

- [14] F. H. Jones, “Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials”, *Surf. Sci. Rep.*, vol. 42, no. 3–5, pp. 75–205, 2001, doi: 10.1016/S0167-5729(00)00011-X.
- [15] B. Basu, *Biomaterials for Musculoskeletal Regeneration*. 2017.
- [16] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, 1971, doi: 10.1002/jbm.820050611.
- [17] E. Marin, F. Boschetto, and G. Pezzotti, “Biomaterials and biocompatibility: an historical overview”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 108, no. 8, pp. 1617–1633, 2020, doi: 10.1002/jbm.a.36930.
- [18] J. Whitlow, A. Paul, and A. Polini, “Bioactive materials: definitions and application in tissue engineering and regeneration therapy”, *Adv. Struct. Mater.*, vol. 53, pp. 1–17, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-44249-5_1.
- [19] L. L. Hench and I. Thompson, “Twenty-first century challenges for biomaterials”, *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. SUPPL. 4, 2010, doi: 10.1098/rsif.2010.0151.focus.
- [20] A. Hudecki, G. Kiryczyński, and M. J. Łos, “Biomaterials, definition, overview”, in *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, Elsevier, 2018, pp. 85–98.
- [21] L. L. Hench, “Biomaterials”, *Science (80-.)*, vol. 208, no. 4446, pp. 826–831, May 1980, doi: 10.1126/science.6246576.
- [22] R. Radu and A. B. Stoian, “Various morphologies and surface properties of anodized zr surfaces”, *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.*, vol. 81, no. 2, pp. 95–104, 2019.
- [23] R. M. Pilliar, “Metallic biomaterials”, in *Biomedical Materials*, 2009, pp. 41–81.
- [24] D. A. Jones, *Principles and prevention of corrosion*, Second Edi. New Jersey: Simon & Schuster, 1996.
- [25] T. Hanawa, “In vivo metallic biomaterials and surface modification”, *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 267, no. 2, pp. 260–266, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0921-5093(99)00101-X.
- [26] M. B. Guglielmotti, D. G. Olmedo, and R. L. Cabrini, “Research on implants and osseointegration”, *Periodontology 2000*, vol. 79, no. 1. Blackwell Munksgaard, pp. 178–189, Feb. 01, 2019, doi: 10.1111/prd.12254.
- [27] D. G. Olmedo, D. R. Tasat, P. Evelson, R. Rebagliatti, M. B. Guglielmotti, and R. L. Cabrini, “In vivo comparative biokinetics and biocompatibility of titanium and zirconium microparticles”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 98 A, no. 4, pp. 604–613, 2011, doi: 10.1002/jbm.a.33145.
- [28] P. Silva-Bermudez and S. E. Rodil, “An overview of protein adsorption on metal

- oxide coatings for biomedical implants”, *Surf. Coatings Technol.*, vol. 233, pp. 147–158, 2013, doi: 10.1016/j.surfcoat.2013.04.028.
- [29] D. R. Barjaktarević *et al.*, “ANODIZATION of ti-based materials for biomedical applications : a review university of belgrade , faculty of technology and metallurgy , karnegijeva 4 11120 belgrade , serbia university of belgrade , institute of nuclear sciences ” vinča ”, surface modifi”, 2016.
- [30] A. Civantos, E. Martínez-Campos, V. Ramos, C. Elvira, A. Gallardo, and A. Abarrategi, “Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants”, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, vol. 3, no. 7. American Chemical Society, pp. 1245–1261, Jul. 10, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00604.
- [31] C. Yao and T. J. Webster, “Anodization: a promising nano-modification technique of titanium implants for orthopedic applications”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 9–10, pp. 2682–2692, 2006, doi: 10.1166/jnn.2006.447.
- [32] J. L. Paredes, “El uso de la anodización en materiales”, *Rev. Casa del Tiempo*, vol. III, no. 28, pp. 59–65, 2010, [Online]. Available: http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/28_iv_feb_2010/casa_del_tiempo_eIV_num28_59_65.pdf.
- [33] R. M. Pilliar, “Cementless implant fixation-toward improved reliability”, *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 36, no. 1, pp. 113–119, 2005, doi: 10.1016/j.ocl.2004.08.001.
- [34] T. W. Bauer and J. Schils, “The pathology of total joint arthroplasty”, *Skeletal Radiol.*, vol. 28, no. 9, pp. 483–497, 1999, doi: 10.1007/s002560050552.
- [35] H. Yamada *et al.*, “Cementless total hip replacement: past, present, and future”, *J. Orthop. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 228–241, 2009, doi: 10.1007/s00776-008-1317-4.
- [36] R. H. Emerson, W. C. Head, C. B. Emerson, W. Rosenfeldt, and L. L. Higgins, “A comparison of cemented and cementless titanium femoral components used for primary total hip arthroplasty: a radiographic and survivorship study”, *J. Arthroplasty*, vol. 17, no. 5, pp. 584–591, Aug. 2002, doi: 10.1054/arth.2002.32696.
- [37] J. R. Moreland and M. A. Moreno, “Cementless femoral revision arthroplasty of the hip: minimum 5 years followup”, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 393, pp. 194–201, 2001, Accessed: Dec. 09, 2020. [Online]. Available: https://journals.lww.com/corr/Abstract/2001/12000/Cementless_Femoral_Revision_Arthroplasty_of_the.22.aspx.
- [38] M. Niinomi, M. Nakai, and J. Hieda, “Development of new metallic alloys for biomedical applications”, *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 11, pp. 3888–3903, 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.037.
- [39] P. Thomsen, C. Larsson, L. E. Ericson, L. Sennerby, J. Lausmaa, and B. Kasemo, “Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold,

- zirconium and titanium”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 8, no. 11, pp. 653–665, 1997, doi: 10.1023/A:1018579605426.
- [40] B. Malczewska-toth and D. Ph, “Titanium , zirconium , and hafnium”, vol. 1, pp. 427–474, 2012.
- [41] N. Stojilovic, E. T. Bender, and R. D. Ramsier, “Surface chemistry of zirconium”, *Prog. Surf. Sci.*, vol. 78, no. 3–4, pp. 101–184, 2005, doi: 10.1016/j.progsurf.2005.07.001.
- [42] R. M. Manuel, S. Co-director, D. Gomez, and S. Andrea, “Estudio del anodizado a potenciales altos como tratamiento para implantes de circonio estudio in vitro”, 2014.
- [43] K. M. Sherepo and I. A. Red’ko, “Use of zirconium-based and zirconium-coated implants in traumatology and orthopedics”, *Biomed. Eng. (NY)*, vol. 38, no. 2, pp. 77–79, 2004, doi: 10.1023/B:BIEN.0000035726.31175.f8.
- [44] Y. Yan and Y. Han, “Structure and bioactivity of micro-arc oxidized zirconia films”, *Surf. Coatings Technol.*, vol. 201, no. 9-11 SPEC. ISS., pp. 5692–5695, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.surfcoat.2006.07.058.
- [45] C. B. Johansson, A. Wennerberg, and T. Albrektsson, “Quantitative comparison of screw-shaped commercially pure titanium and zirconium implants in rabbit tibia”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 5, no. 6–7, pp. 340–344, Jun. 1994, doi: 10.1007/BF00058959.
- [46] V. Sollazzo *et al.*, “Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo”, *Dent. Mater.*, vol. 24, no. 3, pp. 357–361, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.dental.2007.06.003.
- [47] I. V. Branzoi, M. Iordoc, and M. Codescu, “Electrochemical studies on the stability and corrosion resistance of new zirconium-based alloys for biomedical applications”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 167–173, Mar. 2008, doi: 10.1002/sia.2750.
- [48] A. Yamamoto, R. Honma, and M. Sumita, “Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 331–340, Feb. 1998.
- [49] Y. Tsutsumi, D. Nishimura, H. Doi, N. Nomura, and T. Hanawa, “Difference in surface reactions between titanium and zirconium in hanks’ solution to elucidate mechanism of calcium phosphate formation on titanium using xps and cathodic polarization”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 5, pp. 1702–1708, 2009, doi: 10.1016/j.msec.2009.01.016.
- [50] R. L. Cabrini, M. B. Guglielmotti, and J. C. Almagro, “HISTOMORPHOMETRY of initial bone healing around zirconium implants in rats”, *Implant Dent.*, vol. 2, pp. 264–267, 1993.

- [51] T. Albrektsson and C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration”, *Eur. Spine J.*, vol. 10, no. 2, pp. S96–S101, 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [52] Y. T. Sul *et al.*, “Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition”, *Biomaterials*, vol. 23, no. 2, pp. 491–501, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00131-4.
- [53] A. G. Sanchez, W. Schreiner, G. Duffó, and S. Ceré, “Surface characterization of anodized zirconium for biomedical applications”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 15, pp. 6397–6405, May 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2011.02.005.
- [54] M. R. Katunar *et al.*, “Can anodised zirconium implants stimulate bone formation? preliminary study in rat model”, *Prog. Biomater.*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.1007/s40204-014-0024-9.
- [55] A. Gomez Sanchez, J. Ballarre, J. C. Orellano, G. Duffó, and S. Ceré, “Surface modification of zirconium by anodisation as material for permanent implants: in vitro and in vivo study”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 161–169, 2013, doi: 10.1007/s10856-012-4770-8.
- [56] R. M. Hoerth *et al.*, “A comparative study of zirconium and titanium implants in rat: osseointegration and bone material quality”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 2, pp. 411–422, 2014, doi: 10.1007/s10856-013-5074-3.
- [57] M. R. Katunar *et al.*, “In vitro and in vivo characterization of anodised zirconium as a potential material for biomedical applications”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 957–968, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.139.
- [58] M. Innocenti, R. Civinini, C. Carulli, F. Matassi, and M. Villano, “The 5-year results of an oxidized zirconium femoral component for tka”, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 468, no. 5, pp. 1258–1263, 2010, doi: 10.1007/s11999-009-1109-y.
- [59] A. Civantos, E. Martínez-Campos, V. Ramos, C. Elvira, A. Gallardo, and A. Abarrategi, “Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 7, pp. 1245–1261, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00604.
- [60] E. Navarro *et al.*, “Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi”, *Ecotoxicology*, vol. 17, no. 5. Springer, pp. 372–386, Jul. 07, 2008, doi: 10.1007/s10646-008-0214-0.
- [61] K. S. Katti, “Biomaterials in total joint replacement”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 39, no. 3, pp. 133–142, 2004, doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.12.002.
- [62] H. Ozawa, K. Hoshi, and N. Amizuka, “Current concepts of bone biomineralization”, *J. Oral Biosci.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–14, 2008, doi: 10.1016/s1349-0079(08)80014-x.

- [63] P. S. Vanzillotta, M. S. Sader, I. N. Bastos, and G. De Almeida Soares, "Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments", *Dent. Mater.*, vol. 22, no. 3, pp. 275–282, 2006, doi: 10.1016/j.dental.2005.03.012.
- [64] M. Epple and E. Baeuerlein, *Handbook of Biomineralization: Medical and Clinical Aspects*, vol. Vol.3. 2007.
- [65] J.-J. Ryu, K. Park, H.-S. Kim, C.-M. Jeong, and J.-B. Huh, "Effects of anodized titanium with arg-gly-asp (rgd) peptide immobilized via chemical grafting or physical adsorption on bone cell adhesion and differentiation", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 28, no. 4, pp. 963–972, 2013, doi: 10.11607/jomi.2421.
- [66] R. K. Schenk and D. Buser, "Osseointegration: a reality", *Periodontol. 2000*, vol. 17, no. 1, pp. 22–35, 1998, doi: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00120.x.
- [67] R. J. Furlong and J. F. Osborn, "Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings", *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B*, vol. 73, no. 5, pp. 741–745, Sep. 1991, doi: 10.1302/0301-620x.73b5.1654336.
- [68] J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, and K. De Groot, "Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment", *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 583–592, Feb. 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00559-3.
- [69] L. Ágata de Sena, M. Calixto de Andrade, A. Malta Rossi, and G. de Almeida Soares, "Hydroxyapatite deposition by electrophoresis on titanium sheets with different surface finishing", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, no. 1, pp. 1–7, Apr. 2002, doi: 10.1002/jbm.10003.
- [70] T. A. Petrie, C. D. Reyes, K. L. Burns, and A. J. García, "Simple application of fibronectin-mimetic coating enhances osseointegration of titanium implants", *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 8 B, pp. 2602–2612, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00476.x.
- [71] M. Hoyos-Nogués, F. Velasco, M. P. Ginebra, J. M. Manero, F. J. Gil, and C. Mas-Moruno, "Regenerating bone via multifunctional coatings: the blending of cell integration and bacterial inhibition properties on the surface of biomaterials", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 26, pp. 21618–21630, Jul. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b03127.
- [72] C. Mas-Moruno, B. Garrido, D. Rodriguez, E. Ruperez, and F. J. Gil, "Biofunctionalization strategies on tantalum-based materials for osseointegrative applications", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 2, pp. 1–12, Feb. 2015, doi: 10.1007/s10856-015-5445-z.
- [73] B. Elmengaard, J. E. Bechtold, and K. Søballe, "In vivo study of the effect of rgd treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants", *Biomaterials*, vol. 26, no. 17, pp. 3521–3526, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.039.

- [74] X. Chen, P. Sevilla, and C. Aparicio, "Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides", *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 107, pp. 189–197, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.005.
- [75] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Albericio, J. M. Manero, and F. J. Gil, "Novel peptide-based platform for the dual presentation of biologically active peptide motifs on biomaterials", in *ACS Applied Materials and Interfaces*, May 2014, vol. 6, no. 9, pp. 6525–6536, doi: 10.1021/am5001213.
- [76] X. Strakosas, B. Wei, D. C. Martin, and R. M. Owens, "Cite this", *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, p. 4952, 2016, doi: 10.1039/c6tb00852f.
- [77] C. Mas-Moruno *et al.*, "Behavior of primary human osteoblasts on trimmed and sandblasted ti6al4v surfaces functionalized with integrin avb3-selective cyclic rgd peptides", *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 87–97, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34303.
- [78] A. Baranowski *et al.*, "Surface functionalization of orthopedic titanium implants with bone sialoprotein", *PLoS One*, vol. 11, no. 4, Apr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153978.
- [79] T. D. Sargeant, M. S. Rao, C. Y. Koh, and S. I. Stupp, "Covalent functionalization of niti surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers", *Biomaterials*, vol. 29, no. 8, pp. 1085–1098, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.002.
- [80] I. Brigaud *et al.*, "Synergistic effects of bmp-2, bmp-6 or bmp-7 with human plasma fibronectin onto hydroxyapatite coatings: a comparative study", *Acta Biomater.*, vol. 55, pp. 481–492, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.013.
- [81] N. Majoul, S. Aouida, and B. Bessaïs, "Progress of porous silicon aptes-functionalization by ftir investigations", *Appl. Surf. Sci.*, vol. 331, pp. 388–391, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.01.107.
- [82] M. Heller, V. V. Kumar, A. Pabst, J. Brieger, B. Al-Nawas, and P. W. Kämmerer, "Osseous response on linear and cyclic rgd-peptides immobilized on titanium surfaces *in vitro* and *in vivo*", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 106, no. 2, pp. 419–427, Feb. 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36255.
- [83] Z. Huang, Z. Wang, C. Li, N. Zhou, F. Liu, and J. Lan, "The osteoinduction of rgd and mg ion functionalized bioactive zirconia coating", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 30, no. 8, pp. 1–10, Aug. 2019, doi: 10.1007/s10856-019-6298-7.
- [84] D. Pasqui, A. Rossi, F. Di Cintio, and R. Barbucci, "Functionalized titanium oxide surfaces with phosphated carboxymethyl cellulose: characterization and bonelike cell behavior", *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 12, pp. 3965–3972, Dec. 2007, doi: 10.1021/bm701033u.
- [85] M. Dettin *et al.*, "Covalent surface modification of titanium oxide with different adhesive peptides: surface characterization and osteoblast-like cell adhesion", *J.*

- Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 90, no. 1, pp. 35–45, 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32064.
- [86] E. Ruoslahti, “Rgd and other recognition sequences for integrins”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 697–715, 1996, doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697.
- [87] P. G. Robey, “Noncollagenous bone matrix proteins”, in *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*, vol. 1, Elsevier Inc., 2008, pp. 335–349.
- [88] A. Przekora, “Materials science & engineering c the summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone sca ff olds for tissue engineering applications”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 97, no. January, pp. 1036–1051, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.01.061.
- [89] C. I. Vergara, B. M. Martínez, and L. R. Caraballo, “Las moléculas de adhesión y la respuesta inmune”, *Biomédica*, vol. 14, no. 3, p. 172, 1994, doi: 10.7705/biomedica.v14i3.2101.
- [90] T. Hanawa, “A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium”, *J. Periodontal Implant Sci.*, vol. 41, no. 6, p. 263, Dec. 2011, doi: 10.5051/jpis.2011.41.6.263.
- [91] X. Chen, P. Sevilla, and C. Aparicio, “Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 107, pp. 189–197, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.005.
- [92] T. A. Petrie, C. D. Reyes, K. L. Burns, and A. J. García, “Simple application of fibronectin-mimetic coating enhances osseointegration of titanium implants”, *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 8b, pp. 2602–2612, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00476.x.
- [93] ISO 23317, “Implants for surgery – in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials implants”, *Iso/Fdis 23317:2007(E)*, vol. 2009, 2009.
- [94] H. Pan, X. Zhao, B. W. Darvell, and W. W. Lu, “Apatite-formation ability - predictor of “bioactivity?””, *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 11, pp. 4181–4188, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.013.
- [95] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is sbf in predicting in vivo bone bioactivity?””, *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [96] M. Bohner and J. Lemaitre, “Can bioactivity be tested in vitro with sbf solution?””, *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.008.
- [97] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic a-w3”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 721–734, 1990, doi: 10.1002/jbm.820240607.

- [98] M. Di Foggia, C. Prati, M. G. Gandolfi, and P. Taddei, “Spectroscopic and morphological data assessing the apatite forming ability of calcium hydroxide-releasing materials for pulp capping”, *Data Br.*, vol. 23, p. 103719, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.dib.2019.103719.
- [99] P. Ptáček and P. Ptáček, “Identification, characterization and properties of apatites”, in *Apatites and their Synthetic Analogues - Synthesis, Structure, Properties and Applications*, InTech, 2016.
- [100] J. T. Burgués, “Report : medida del ángulo de contacto”, pp. 1-62, 2013.
- [101] T. Young, “III. an essay on the cohesion of fluids”, *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 95, pp. 65-87, Dec. 1805, doi: 10.1098/rstl.1805.0005.
- [102] D. K. Owens and R. C. Wendt, “Estimation of the surface free energy of polymers”, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 13, no. 8, pp. 1741-1747, Aug. 1969, doi: 10.1002/app.1969.070130815.
- [103] C. J. Van Oss, *Interfacial forces in aqueous media*. CRC press, 2006.
- [104] B. Jańczuk and A. Zdziennicka, “Importance of surface layers in solid surface free energy determination”, *Surf. Innov.*, vol. 2, no. 3, pp. 173-183, 2014, doi: 10.1680/si.13.00024.
- [105] G. Sánchez-Balderas and E. Pérez, “On the usefulness of the equation of state approach for contact angles on rough surfaces”, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 126, no. 1, pp. 1-5, 2020, doi: 10.1007/s00339-019-3177-5.
- [106] D. Li and A. W. Neumann, “Equation of state for interfacial tensions of solid-liquid systems”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 39, no. C, pp. 299-345, Apr. 1992, doi: 10.1016/0001-8686(92)80064-5.
- [107] T. Hobson, “Guía del usuario surtronic 25”, vol. 44, no. 0.
- [108] GRUPO TECNOLOGÍA MECÁNICA, “Rugosidad superficial”, pp. 1-16.
- [109] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. A. Maksoud, I. M. Elewa, and H. H. Soliman, “Roughness parameters”, *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 123, no. 1, pp. 133-145, 2002, doi: 10.1016/S0924-0136(02)00060-2.
- [110] A. Wennerberg and T. Albrektsson, “Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review”, *Clinical Oral Implants Research*, vol. 20, no. SUPPL. 4. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 172-184, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
- [111] R. G. Flemming, C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman, and P. F. Nealey, “Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior”, vol. 20, no. 1999, 2015.
- [112] A. Almaguer-flores, P. Silva-bermudez, R. Galicia, and S. E. Rodil, “Bacterial

- adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 88–99, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.07.031.
- [113] S. Bauer, P. Schmuki, K. Von Der Mark, and J. Park, “Progress in materials science engineering biocompatible implant surfaces part i: materials and surfaces”, *Prog. Mater. Sci.*, vol. 58, no. 3, pp. 261–326, 2013, doi: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.001.
- [114] Y. Shibata and Y. Tanimoto, “A review of improved fixation methods for dental implants. part i: surface optimization for rapid osseointegration”, *J. Prosthodont. Res.*, pp. 1–5, 2014, doi: 10.1016/j.jprior.2014.11.007.
- [115] D. M. Dohan Ehrenfest, P. G. Coelho, B. S. Kang, Y. T. Sul, and T. Albrektsson, “Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography”, *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 198–206, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.003.
- [116] B. Rojas De Gáscue, “OPERANDO el microscopio electrónico como herramienta para el estudio de los polímeros y otros materiales. i. el microscopio electrónico de barrido (meb)”. Accessed: Dec. 11, 2020. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/267832818>.
- [117] M. Ipohorski and P. b Bozzano, “Microscopía electrónica de barrido (sem): en la caracterización de materiales”, *Cienc. Invest.*, vol. 63, no. 3, pp. 43–53, 2013, doi: 10.1093/nq/s10-IV.96.358-a.
- [118] J. Renau-piqueras and M. Faura, “Principios básicos del microscopio electrónico de barrido”, pp. 73–92, 1965.
- [119] R. P. Pueyo, “Procesado y optimización de espectros raman mediante técnicas de lógica difusa: aplicación a la identificación de materiales pictóricos”, *Univ. Politècnica Catalunya*, pp. 10–34, 2005.
- [120] Renishaw, “Espectroscopía raman” . .
- [121] I. Notingher *et al.*, “Application of ftir and raman spectroscopy to characterisation of bioactive materials and living cells”, *Spectroscopy*, vol. 17, no. 2–3, pp. 275–288, 2003, doi: 10.1155/2003/893584.
- [122] F. J. Aparicio Rebollo, “XPS: espectroscopia de fotoemisión de rayos x | alter technology”. <https://wpo-altertechnology.com/es/xps-espectroscopia-de-fotoemision-de-rayos-x/> (accessed Dec. 11, 2020).
- [123] S. R. Mello Castanho, “Cerámica y vidrio espectroscopia fotoelectrónica de rayos-x”, 1997.
- [124] E. De Giglio, L. Sabbatini, S. Colucci, and G. Zambonin, “Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on rgd-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 11, no. 10, pp. 1073–1083, Jan. 2000, doi: 10.1163/156856200743580.

- [125] P. H. Chua, K. G. Neoh, E. T. Kang, and W. Wang, “Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and rgd for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion”, *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1412–1421, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.019.
- [126] Gamry, “Application note - getting started with electrochemical corrosion measurement”.
- [127] Gamry, “The basics of electrochemical impedance spectroscopy”.
- [128] G. Instruments, “A snapshot of electrochemical impedance spectroscopy”, 2008.
- [129] G. W. Walter, “A review of impedance plot methods used for corrosion performance analysis of painted metals”, vol. 26, no. 9, pp. 681–703, 1986.
- [130] Gamry Instruments, “Physical electrochemistry & equivalent circuit elements”.
- [131] B. Hirschorn, M. E. Orazem, B. Tribollet, V. Vivier, I. Frateur, and M. Musiani, “Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters”, *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 21, pp. 6218–6227, 2010, doi: 10.1016/j.electacta.2009.10.065.
- [132] C. H. Hsu and F. Mansfeld, “Technical note : concerning the conversion of the constant phase element parameter y_0 into a capacitance”, vol. 57, no. 9, pp. 747–748, 2001.
- [133] M. E. Orazem, N. Pébère, and B. Tribollet, “Enhanced graphical representation of electrochemical impedance data”, *J. Electrochem. Soc.*, vol. 153, no. 4, pp. B129–B136, 2006, doi: 10.1149/1.2168377.
- [134] J. Jorcin, M. E. Orazem, P. Nadine, and B. Tribollet, “CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy”, vol. 51, pp. 1473–1479, 2006, doi: 10.1016/j.electacta.2005.02.128.
- [135] M. R. Katunar *et al.*, “In vitro and in vivo characterization of anodised zirconium as a potential material for biomedical applications”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 957–968, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.139.
- [136] J. A. Bardwell and M. C. H. McKubre, “Ac impedance spectroscopy of the anodic film on zirconium in neutral solution”, *Electrochim. Acta*, vol. 36, no. 3–4, pp. 647–653, 1991, doi: 10.1016/0013-4686(91)85153-X.
- [137] A. Gomez Sanchez, M. Katunar, W. Schreiner, G. Duffó, S. Ceré, and D. J. Schiffrin, “Structure and dielectric properties of electrochemically grown zro2 films”, *Acta Chim. Slov.*, vol. 61, pp. 316–327, 2014.
- [138] K. V.-J. of T. E. Society and undefined 1963, “A general thermodynamic theory of the potential of passive electrodes and its influence on passive corrosion”, *Electrochem. Soc.*

- [139] V. Paredes, E. Salvagni, E. Rodríguez-Castellon, F. J. Gil, and J. M. Manero, “Study on the use of 3-aminopropyltriethoxysilane and 3-chloropropyltriethoxysilane to surface biochemical modification of a novel low elastic modulus ti-nb-hf alloy”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 103, no. 3, pp. 495–502, Apr. 2015, doi: 10.1002/jbm.b.33226.
- [140] J. W. Dixon and F. J. Massey, *Introduction to statistical analysis*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1957.
- [141] Astm, “Standard practice for calculation of corrosion rates and related information”, *Astm G 102*, vol. 89, no. Reapproved, pp. 1–7, 1999, doi: 10.1520/G0102-89R10.
- [142] “Zplot for windows”. Electrochemistry, Impedance Software Operating Manual, Part 1, Scribner Ass. Inc., Southern Pines, NC, 1998.
- [143] G. A. H. Mekhemer, “Characterization of phosphated zirconia by xrd, raman and ir spectroscopy”, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 141, no. 2, pp. 227–235, 1998, doi: 10.1016/S0927-7757(98)00344-6.
- [144] C. Wulfman, M. Sadoun, and M. L. De La Chapelle, “Interest of raman spectroscopy for the study of dental material: the zirconia material example”, *IRBM*, vol. 31, pp. 257–262, 2010.
- [145] M. S. Lazarte, S. Cere, and M. R. Katunar, “Estudio in vitro de la aleación zr - 2.5% nb modificada por anodizado como potencial material para implantes permanentes”, Universidad Nacional de Mar del Plata, 2019.
- [146] N. Khalil, A. Bowen, and J. S. L. Leach, “The anodic oxidation of valve metals—ii. the influence of the anodizing conditions on the transport processes during the anodic oxidation of zirconium”, *Electrochim. Acta*, vol. 33, no. 12, pp. 1721–1727, 1988, Accessed: Nov. 19, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013468688850060>.
- [147] L. Kumari, G. H. Du, W. Z. Li, R. S. Vennila, S. K. Saxena, and D. Z. Wang, “Synthesis, microstructure and optical characterization of zirconium oxide nanostructures”, *Ceram. Int.*, vol. 35, no. 6, pp. 2401–2408, 2009, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.02.007.
- [148] C. M. Phillippi and K. S. Mazdiyasi, “Infrared and raman spectra of zirconia polymorphs”, *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 54, no. 5, pp. 254–258, 1971, doi: 10.1111/j.1151-2916.1965.tb14697.x.
- [149] E. Anastassakis, B. Papanicolaou, and I. M. Asher, “Lattice dynamics and light scattering in hafnia and zirconia”, *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 36, no. 7–8, pp. 667–676, 1975, Accessed: Nov. 18, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022369775900852>.
- [150] J. E. Maslar, W. S. Hurst, W. J. Bowers, and J. H. Hendricks, “In situ raman spectroscopic investigation of zirconium-niobium alloy corrosion under

- hydrothermal conditions”, *J. Nucl. Mater.*, vol. 298, no. 3, pp. 239–247, 2001, doi: 10.1016/S0022-3115(01)00657-2.
- [151] A. G. Sanchez, J. Ballarre, G. Duffó, and S. Ceré, “Comportamiento in vitro e in vivo de circonio anodizado”, 2011, pp. 2–6.
- [152] P. Barberis, T. Merle-Méjean, and P. Quintard, “On raman spectroscopy of zirconium oxide films”, *J. Nucl. Mater.*, vol. 246, no. 2–3, pp. 232–243, 1997, doi: 10.1016/S0022-3115(97)00038-X.
- [153] P. Barbéris, G. Corolleur-Thomas, R. Guinebretière, T. Merle-Mejean, A. Mirgorodsky, and P. Quintard, “Raman spectra of tetragonal zirconia: powder to zircaloy oxide frequency shift”, *J. Nucl. Mater.*, vol. 288, no. 2–3, pp. 241–247, 2001, Accessed: Nov. 20, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022311500007273>.
- [154] E. M. Patriito and V. A. Macagno, “Influence of the forming electrolyte on the optical properties of anodic zirconium oxide films. part 1. ellipsometric investigation”, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 371, no. 1–2, pp. 59–71, 1994, doi: 10.1016/0022-0728(93)03226-F.
- [155] A. L. Oliveira, J. F. Mano, and R. L. Reis, “Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry”, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 7, no. 4–5, pp. 309–318, 2003, doi: 10.1016/j.cossms.2003.10.009.
- [156] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, “Novel bioactive materials with different mechanical properties”, *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–2175, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00044-9.
- [157] M. Hoyos-Nogués, E. Falgueras-Batlle, M. P. Ginebra, J. M. Manero, J. Gil, and C. Mas-Moruno, “A dual molecular biointerface combining rgd and krsr sequences improves osteoblastic functions by synergizing integrin and cell-membrane proteoglycan binding”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 6, pp. 1–13, 2019, doi: 10.3390/ijms20061429.
- [158] R. Tuma, “Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies”, *J. Raman Spectrosc.*, vol. 36, no. 4, pp. 307–319, 2005, doi: 10.1002/jrs.1323.
- [159] M. Di Foggia, P. Taddei, A. Torreggiani, M. Dettin, and A. Tinti, “Interactions between oligopeptides and oxidised titanium surfaces detected by vibrational spectroscopy”, *J. Raman Spectrosc.*, vol. 42, no. 3, pp. 276–285, 2011, doi: 10.1002/jrs.2732.
- [160] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts*. 2001.
- [161] C. C. Silva *et al.*, “Hydroxyapatite screen-printed thick films: optical and electrical properties”, *Mater. Chem. Phys.*, vol. 92, no. 1, pp. 260–268, 2005, doi:

10.1016/j.matchemphys.2005.01.028.

- [162] A. Antonakos, E. Liarokapis, and T. Leventouri, “Micro-raman and ftir studies of synthetic and natural apatites”, *Biomaterials*, vol. 28, no. 19, pp. 3043–3054, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.028.
- [163] G. Gottardi, N. Laidani, V. Micheli, R. Bartali, and M. Anderle, “Effects of oxygen concentration in the ar/o₂ plasma on the bulk structure and surface properties of rf reactively sputtered zirconia thin films”, *Surf. Coatings Technol.*, vol. 202, no. 11, pp. 2332–2337, 2008, doi: 10.1016/j.surfcoat.2007.08.052.
- [164] A. Gomez Sanchez, M. Katunar, W. Schreiner, G. Duffó, S. Ceré, and D. J. Schiffrin, “Structure and dielectric properties of electrochemically grown zro₂ films”, *Acta Chim. Slov.*, vol. 61, no. 2, pp. 316–327, 2014.
- [165] D. Li, X. Lu, H. Lin, F. Ren, and Y. Leng, “Chitosan/bovine serum albumin co-micropatterns on functionalized titanium surfaces and their effects on osteoblasts”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 2, pp. 489–502, 2013, doi: 10.1007/s10856-012-4810-4.
- [166] J. S. Stevens, A. C. De Luca, M. Pelendritis, G. Terenghi, S. Downes, and S. L. M. Schroeder, “Quantitative analysis of complex amino acids and rgd peptides by x-ray photoelectron spectroscopy (xps)”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 45, no. 8, pp. 1238–1246, 2013, doi: 10.1002/sia.5261.
- [167] M. Sowa *et al.*, “Characterisation of anodic oxide films on zirconium formed in sulphuric acid: xps and corrosion resistance investigations”, *J. Solid State Electrochem.*, vol. 21, no. 1, pp. 203–210, 2017, doi: 10.1007/s10008-016-3369-2.
- [168] H. Wiame, M. A. Centeno, S. Picard, P. Bastians, and P. Grange, “Thermal oxidation under oxygen of zirconium nitride studied by xps, drifts, tg-ms”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 18, no. 9, pp. 1293–1299, 1998, doi: 10.1016/s0955-2219(98)00056-9.
- [169] G. P. López, D. G. Castner, and B. D. Ratner, “XPS o 1s binding energies for polymers containing hydroxyl, ether, ketone and ester groups”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 17, no. 5, pp. 267–272, 1991, doi: 10.1002/sia.740170508.
- [170] I. Milošv, H. -H Strehblow, B. Navinšek, and M. Metikoš-Huković, “Electrochemical and thermal oxidation of tin coatings studied by xps”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 23, no. 7–8, pp. 529–539, 1995, doi: 10.1002/sia.740230713.
- [171] N. C. Saha and H. G. Tompkins, “Titanium nitride oxidation chemistry: an x-ray photoelectron spectroscopy study”, *J. Appl. Phys.*, vol. 72, no. 7, pp. 3072–3079, 1992, doi: 10.1063/1.351465.
- [172] F. Esaka *et al.*, “Comparison of surface oxidation of titanium nitride and chromium nitride films studied by x-ray absorption and photoelectron spectroscopy”, *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 15, no. 5, pp. 2521–2528, Sep. 1997, doi: 10.1116/1.580764.

- [173] M. Dettin *et al.*, “Assessment of novel chemical strategies for covalent attachment of adhesive peptides to rough titanium surfaces: xps analysis and biological evaluation”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 91, no. 2, pp. 463–479, 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32222.
- [174] G. Iucci, C. Battocchio, M. Dettin, F. Ghezzi, and G. Polzonetti, “An xps study on the covalent immobilization of adhesion peptides on a glass surface”, *Solid State Sci.*, vol. 12, pp. 1861–1865, 2010, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2010.01.021.
- [175] M. C. Porté-Durrieu *et al.*, “Development of rgd peptides grafted onto silica surfaces: xps characterization and human endothelial cell interactions”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 368–375, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19990905)46:3<368::AID-JBM9>3.0.CO;2-8.
- [176] W. C. Chen, Y. Lo, and H. Sen Chen, “Effects of ti surface treatments with silane and arginylglycylaspartic acid peptide on bone cell progenitors”, *Odontology*, vol. 103, no. 3, pp. 322–332, 2015, doi: 10.1007/s10266-014-0169-y.
- [177] B. Cox, “Factors affecting the growth of porous anodic oxide films on zirconium”, *J. Electrochem. Soc.*, vol. 117, no. 5, p. 654, 1970, doi: 10.1149/1.2407598.
- [178] Mitutoyo, “Rugosidad superficial”. .
- [179] J. P. Lucchini, J. L. Aurelle, M. Therin, K. Donath, and W. Becker, “A pilot study comparing screw-shaped implants: surface analysis and histologic evaluation of bone healing”, *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 7, no. 4, pp. 397–404, 1996, doi: 10.1034/j.1600-0501.1996.070414.x.
- [180] F. Grizon, E. Aguado, G. Hure, M. Baslé, D. C.-J. of dentistry, and undefined 2002, “Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep”, *Elsevier*, Accessed: Nov. 21, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571202000180>.
- [181] M. B. Rosa, T. Albrektsson, C. E. Francischone, H. O. Schwartz Filho, and A. Wennerberg, “The influence of surface treatment on the implant roughness pattern”, *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 20, no. 5, pp. 550–555, Oct. 2012, doi: 10.1590/S1678-77572012000500010.
- [182] R. J. Henry, “Improper statistics characterizing the normal range”, *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 34, no. 4, pp. 326–327, 1960, doi: 10.1093/ajcp/34.4.326.
- [183] P. W. Kämmerer, M. Helle, J. Brieger, M. O. Klein, B. Al-Nawas, and M. Gabriel, “Immobilisation of linear and cyclic rgd-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation”, *Eur. Cells Mater.*, vol. 21, pp. 364–372, 2011, doi: 10.22203/eCM.v021a27.
- [184] A. Zdziennicka, K. Szymczyk, J. Krawczyk, and B. Jańczuk, “Some remarks on the solid surface tension determination from contact angle measurements”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 405, pp. 88–101, 2017, doi: 10.1016/j.apsusc.2017.01.068.

- [185] A. Rudawska and E. Jacniacka, “Analysis for determining surface free energy uncertainty by the owen-wendt method”, *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 29, no. 4, pp. 451–457, 2009, doi: 10.1016/j.ijadhadh.2008.09.008.
- [186] J. K. Spelt, D. Li, and A. W. Neumann, “The equation of state approach to interfacial tensions”, *Mod. Approaches to Wettability*, pp. 101–142, 1992, doi: 10.1007/978-1-4899-1176-6_5.
- [187] D. Berthelot, “Sur le mélange des gaz”, *Compt. Rendus*, vol. 126, pp. 1703–1706, 1898.
- [188] A. Dupré, *Théorie mécanique de la chaleur*. Paris: Gauthier-Villars, 1869.
- [189] D. Li and A. W. Neumann, “A reformulation of the equation of state for interfacial tensions”, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 138, no. 1, pp. 304–307, 1990, Accessed: Nov. 25, 2020. [Online]. Available: <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=19384482>.
- [190] D. Y. Kwok and A. W. Neumann, *Contact angle measurement and contact angle interpretation*, vol. 81, no. 3, 1999.
- [191] D. Y. Kwok and A. W. Neumann, “Contact angle interpretation in terms of solid surface tension”, *Colloids Surf. A*, vol. 161, pp. 31–48, 2000.
- [192] E. Swokowski, *Calculus with analytic geometry*. Taylor & Francis, 1979.
- [193] M. M. Gentleman and E. Gentleman, “The role of surface free energy in osteoblast-biomaterial interactions”, *Int. Mater. Rev.*, vol. 59, no. 8, pp. 417–429, 2014, doi: 10.1179/1743280414Y.0000000038.
- [194] L. Ponsonnet *et al.*, “Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 23, no. 4, pp. 551–560, 2003, doi: 10.1016/S0928-4931(03)00033-X.
- [195] Y. Arima and H. Iwata, “Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers”, *Biomaterials*, vol. 28, no. 20, pp. 3074–3082, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.013.
- [196] W. C. Chen, Y. S. Chen, K. C. Chang, C. H. Chen, and D. J. Lin, “An in vitro assessment and comparative effectiveness of silanized-glutaraldehyde functionalized titanium surfaces with phosphatidylcholine and type i collagen grafts”, *Dent. Mater.*, vol. 36, no. 2, pp. 320–328, 2020, doi: 10.1016/j.dental.2019.12.002.
- [197] R. J. Klebe, K. L. Bentley, and R. C. Schoen, “Adhesive substrates for fibronectin”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 109, no. 3, pp. 481–488, 1981, doi: 10.1002/jcp.1041090314.
- [198] T. Groth and G. Altankov, “Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability”, *Biomaterials*, vol. 17, no. 12, pp. 1227–1234, Jun. 1996, doi: 10.1016/0142-

9612(96)84943-X.

- [199] J. R. Macdonald, *Emphasizing solid materials and systems. Impedance Spectroscopy*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons Inc., 1987.
- [200] M. E. Orazem and B. Tribollet, “Electrochemical impedance”, New Jersey, 2008.
- [201] D. J. Blackwood, “Influence of the space-charge region on electrochemical impedance measurements on passive oxide films on titanium”, *Electrochim. Acta*, vol. 46, no. 4, pp. 563–569, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0013-4686(00)00636-8.
- [202] M. J. Esplandiu, E. M. Patrino, and V. A. Macagno, “Characterization of hafnium anodic oxide films: an ac impedance investigation”, *Electrochim. Acta*, vol. 40, no. 7, pp. 809–815, May 1995, doi: 10.1016/0013-4686(95)00003-W.
- [203] O. Kerrec, D. Devilliers, and H. Groult, “Dielectric properties of anodic oxide films on tantalum”, *Electrochim. Acta*, vol. 40, no. 6, pp. 719–724, 1995, Accessed: Nov. 28, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013468694003304>.
- [204] W. A. Badawy, S. S. Elegamy, and K. M. Ismail, “Comparative study of tantalum and titanium passive films by electrochemical impedance spectroscopy”, *Br. Corros. J.*, vol. 28, no. 2, pp. 133–136, 1993, doi: 10.1179/bcj.1993.28.2.133.
- [205] J. Ai, Y. Chen, M. Urquidi-Macdonald, and D. D. Macdonald, “Electrochemical impedance spectroscopic study of passive zirconium”, *J. Electrochem. Soc.*, vol. 154, no. 1, 2007, doi: 10.1149/1.2374946.
- [206] J. Ai, Y. Chen, M. Urquidi-Macdonald, and D. D. Macdonald, “Electrochemical impedance spectroscopic study of passive zirconium”, *J. Nucl. Mater.*, vol. 379, no. 1–3, pp. 162–168, 2008, Accessed: Nov. 29, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022311508003395>.
- [207] J. Sikora, E. Sikora, and D. D. Macdonald, “The electronic structure of the passive film on tungsten”, *Electrochim. Acta*, vol. 45, no. 12, pp. 1875–1883, 2000, Accessed: Nov. 29, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468699004077>.
- [208] L. Feng, W. Tang, X. Xu, Q. Cui, and X. Guo, “Ultralow-voltage solution-processed organic transistors with small gate dielectric capacitance”, *IEEE Electron Device Lett.*, vol. 34, no. 1, pp. 129–131, 2013, doi: 10.1109/LED.2012.2227236.
- [209] E. Ruoslahti and M. D. Pierschbacher, “New perspectives in cell adhesion : rgd and integrins”, *Science (80-.)*, vol. 238, no. 4826, pp. 491–497, 1987.
- [210] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, R. G. Richards, and J. S. Hayes, “In search of an osteoblast cell model for in vitro research”, *Eur. Cells Mater.*, vol. 24, pp. 1–17, 2012, doi: 10.22203/eCM.v024a01.
- [211] M. F. Tano de la Hoz, M. R. Katunar, A. González, A. Gomez Sanchez, A. O. Díaz, and

- S. Ceré, “Effect of anodized zirconium implants on early osseointegration process in adult rats: a histological and histomorphometric study”, *Prog. Biomater.*, vol. 8, no. 4, pp. 249–260, 2019, doi: 10.1007/s40204-019-00124-0.
- [212] B. Yang, M. Uchida, H. M. Kim, X. Zhang, and T. Kokubo, “Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment”, *Biomaterials*, vol. 25, no. 6, pp. 1003–1010, 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00626-4.
- [213] K. J. Bozic, S. Morshed, M. D. Silverstein, H. E. Rubash, and J. G. Kahn, “Use of cost-effectiveness analysis to evaluate new technologies in orthopaedics: the case of alternative bearing surfaces in total hip arthroplasty”, *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 88, no. 4, pp. 706–714, Apr. 2006, doi: 10.2106/JBJS.E.00614.
- [214] C. Y. Hu and T.-R. Yoon, “Recent updates for biomaterials used in total hip arthroplasty”, *Biomater. Res.*, vol. 22, no. 1, p. 33, Dec. 2018, doi: 10.1186/s40824-018-0144-8.
- [215] C. Rabago *et al.*, “Eficacia y costo-utilidad de primer reemplazo total de cadera y rodilla en pacientes con osteoartritis”, *Rev. Argent. Reumatol.*, vol. 28, no. 4, pp. 9–17, 2017, [Online]. Available: http://revistasar.org.ar/revistas/2017/n4/4_articulo_original.pdf.
- [216] E. Agnes *et al.*, “Monografía del curso de auditoría 2013 reemplazo total de cadera. análisis de la relación costo/beneficio entre el uso de prótesis importadas y prótesis nacionales”, *Monogr. del curso Audit.*, p. 12, 2013, [Online]. Available: [http://www.auditoriamedicahoy.com.ar/biblioteca/Reemplazo total de cadera. Costos y beneficios 2013.pdf](http://www.auditoriamedicahoy.com.ar/biblioteca/Reemplazo%20total%20de%20cadera.%20Costos%20y%20beneficios%202013.pdf).
- [217] A. Trossero *et al.*, “Programa de prevención secundaria en pacientes con fractura de cadera”, *Rev Hosp Ital B Aires*, vol. 31, no. 4, pp. 131–136, 2011.
- [218] S. M. Kurtz, E. Lau, K. Ong, K. Zhao, M. Kelly, and K. J. Bozic, “Future young patient demand for primary and revision joint replacement: national projections from 2010 to 2030”, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 467, no. 10, pp. 2606–2612, 2009, doi: 10.1007/s11999-009-0834-6.

Planos de diseño para Celda Electroquímica Termostatizada

La construcción de una celda electroquímica que permitiese realizar ensayos sobre únicamente una cara de la muestra requirió trabajos de vidriería y de tornería. Para ello se confeccionaron los planos de diseño que se presentan en las páginas siguientes. Los componentes de la celda se resumen a continuación:

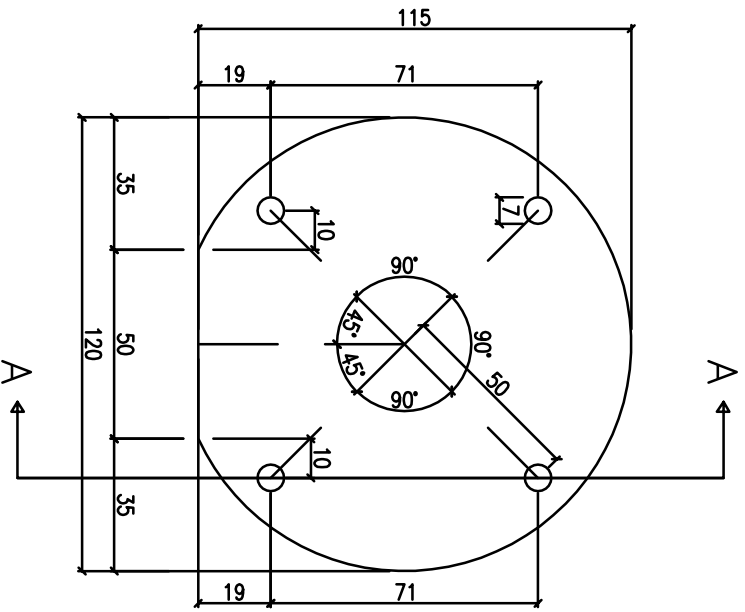
- Portamuestras:
 - Tapa Grilón n°1 (plano en hoja n°1)
 - Tapa Grilón n°4 (plano en hoja n°4)
 - O-ring Ø 64 mm (1 unidad)
 - Arandela plana Ø 20-12 mm (1 unidad)

- Estructura de la celda:
 - Tapa Grilón n°2 (plano en hoja n°2)
 - Tapa Grilón n°3 (plano en hoja n°3)
 - Cilindro de vidrio (plano en hoja n°5)
 - Cilindro de acrílico (plano en hoja n°6)
 - Conectores de manguera (2 unidades)
 - O-rings Ø 58 mm (2 unidades), Ø 64 mm (1 unidad) y Ø 72 mm (2 unidades)
 - Varillas roscadas de 140 mm de largo (4 unidades)
 - Tuercas mariposa (8 unidades)

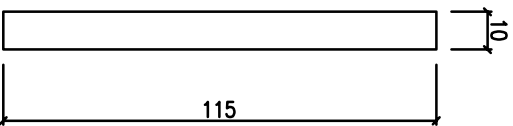
En la hoja n°7 se presenta el plano de la celda ensamblada.

- Electroodos:
 - Espiral de platino con conexión soldada y encapsulada en vidrio
 - Electrodo de referencia Calomel comercial
 - Luggin de vidrio (diseño estándar)
 - Tapones a rosca de Grilón perforados (diseño estándar)

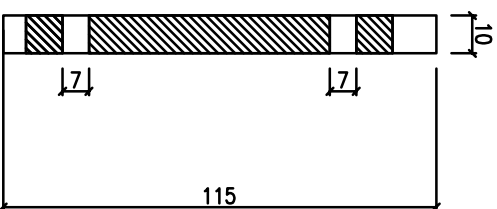
TAPA GRILLON N°1
1 UNIDADES



Vista Frontal



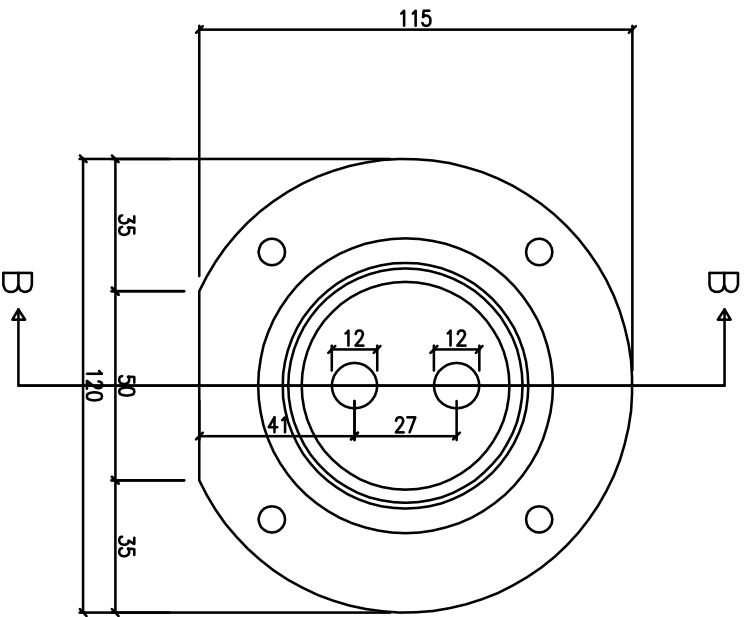
Vista Lateral



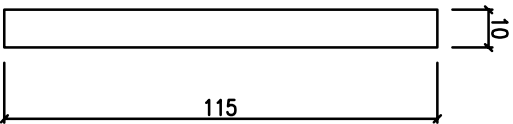
Corte A-A

Rev. Nro.		Fecha:		Motivo:		Dibujó:		Revisó:		Título Plano:		Descripción:		Cód. Trab.:		Tolerancia Gral.:	
---		---		---		---		---		TFG - Ingeniería en Materiales		Tapa Grillon N°1		00		L ≤ 2 m: ± 2mm L > 2 m: ± 5mm	
02/12/2020		03/10/2020		00-01-01-TFG-00		00		01		01		01		1:2			

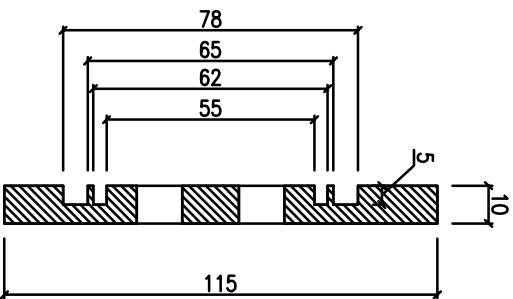
TAPA GRILLON N°2
1 UNIDAD



Vista Frontal



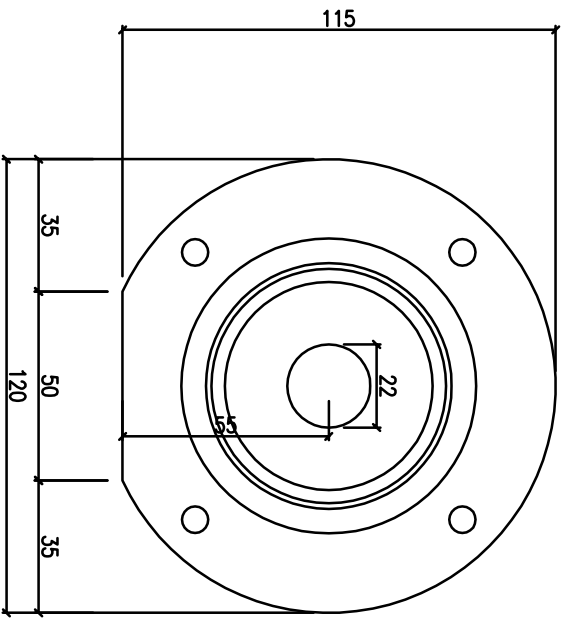
Vista Frontal



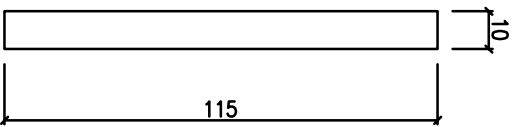
Corte B-B

Rev. Nro.		Fecha:		Motivo:		Dibujó:		Revisó:																																																													
---		---		---		---		---																																																													
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Título Plano:</td> <td colspan="2">TFG - Ingeniería en Materiales</td> <td colspan="2">Descripción:</td> <td colspan="2">Tapa Grillon N°2</td> <td colspan="2">Tolerancia Gral.:</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Dibujó:</td> <td colspan="2">V.M.</td> <td colspan="2">Revisó:</td> <td colspan="2">S.C.</td> <td colspan="2">L ≤ 2 m: ± 2mm</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Fecha Dibujo:</td> <td colspan="2">02/12/2020</td> <td colspan="2">Fecha Revisión:</td> <td colspan="2">03/10/2020</td> <td colspan="2">L > 2 m: ± 5mm</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Revisión:</td> <td colspan="2">00</td> <td colspan="2">Código Plano:</td> <td colspan="2">00-01-02-TFG-00</td> <td colspan="2">Escala:</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Cód. Trab.:</td> <td colspan="2">00</td> <td colspan="2">Cód. N°:</td> <td colspan="2">01</td> <td colspan="2">Hoja N°:</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Escala:</td> <td colspan="2">1:2</td> <td colspan="2">Hoja N°:</td> <td colspan="2">02</td> <td colspan="2">Escala:</td> </tr> </table>										Título Plano:		TFG - Ingeniería en Materiales		Descripción:		Tapa Grillon N°2		Tolerancia Gral.:		Dibujó:		V.M.		Revisó:		S.C.		L ≤ 2 m: ± 2mm		Fecha Dibujo:		02/12/2020		Fecha Revisión:		03/10/2020		L > 2 m: ± 5mm		Revisión:		00		Código Plano:		00-01-02-TFG-00		Escala:		Cód. Trab.:		00		Cód. N°:		01		Hoja N°:		Escala:		1:2		Hoja N°:		02		Escala:	
Título Plano:		TFG - Ingeniería en Materiales		Descripción:		Tapa Grillon N°2		Tolerancia Gral.:																																																													
Dibujó:		V.M.		Revisó:		S.C.		L ≤ 2 m: ± 2mm																																																													
Fecha Dibujo:		02/12/2020		Fecha Revisión:		03/10/2020		L > 2 m: ± 5mm																																																													
Revisión:		00		Código Plano:		00-01-02-TFG-00		Escala:																																																													
Cód. Trab.:		00		Cód. N°:		01		Hoja N°:																																																													
Escala:		1:2		Hoja N°:		02		Escala:																																																													

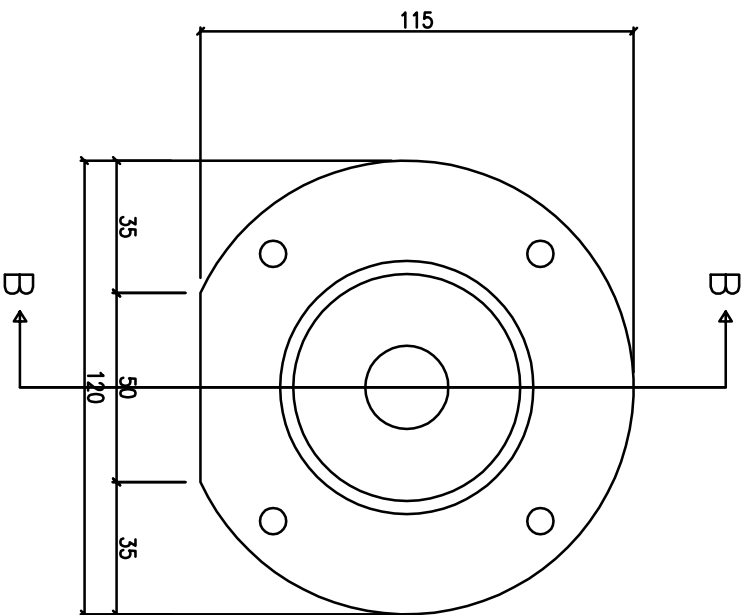
TAPA GRILLON N°3
1 UNIDAD



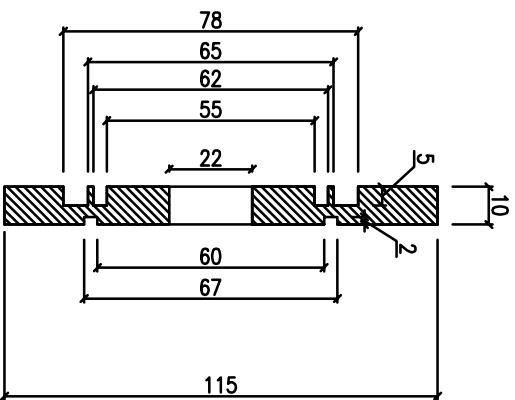
Vista Frontal



Vista Frontal



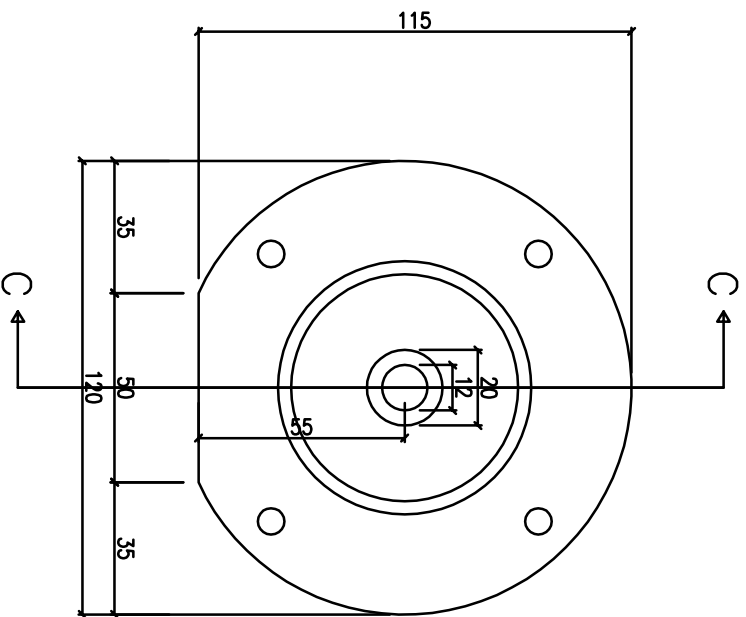
Vista Posterior



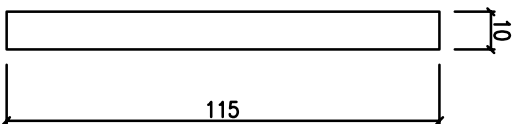
Corte B-B

Rev. Nro.		Fecha:		Motivo:		Dibujó:		Revisó:		Título Plano:		Descripción:		Cód. Trab.:		Tolerancia Gral.:	
---		---		---		---		---		TFG - Ingeniería en Materiales		Tapa Grillon N°3		00		L ≤ 2 m: ± 2mm L > 2 m: ± 5mm	
V.M.		S.C.		02/12/2020		03/10/2020		00		00-01-03-TFG-00		01		03		Escala: 1:2	

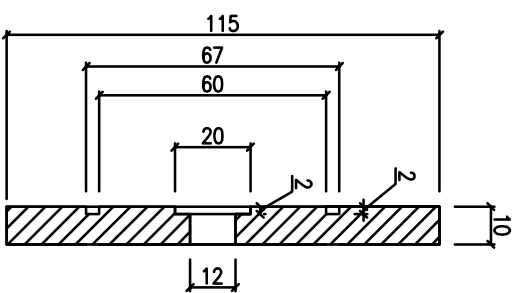
TAPA GRILLON N°4
1 UNIDAD



Vista Frontal



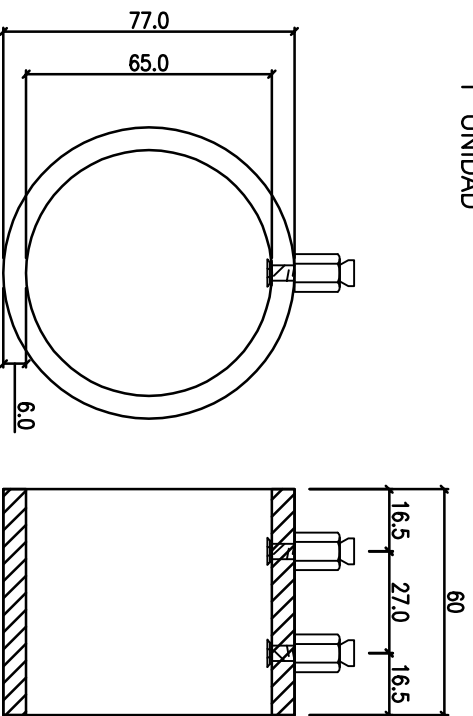
Vista Frontal



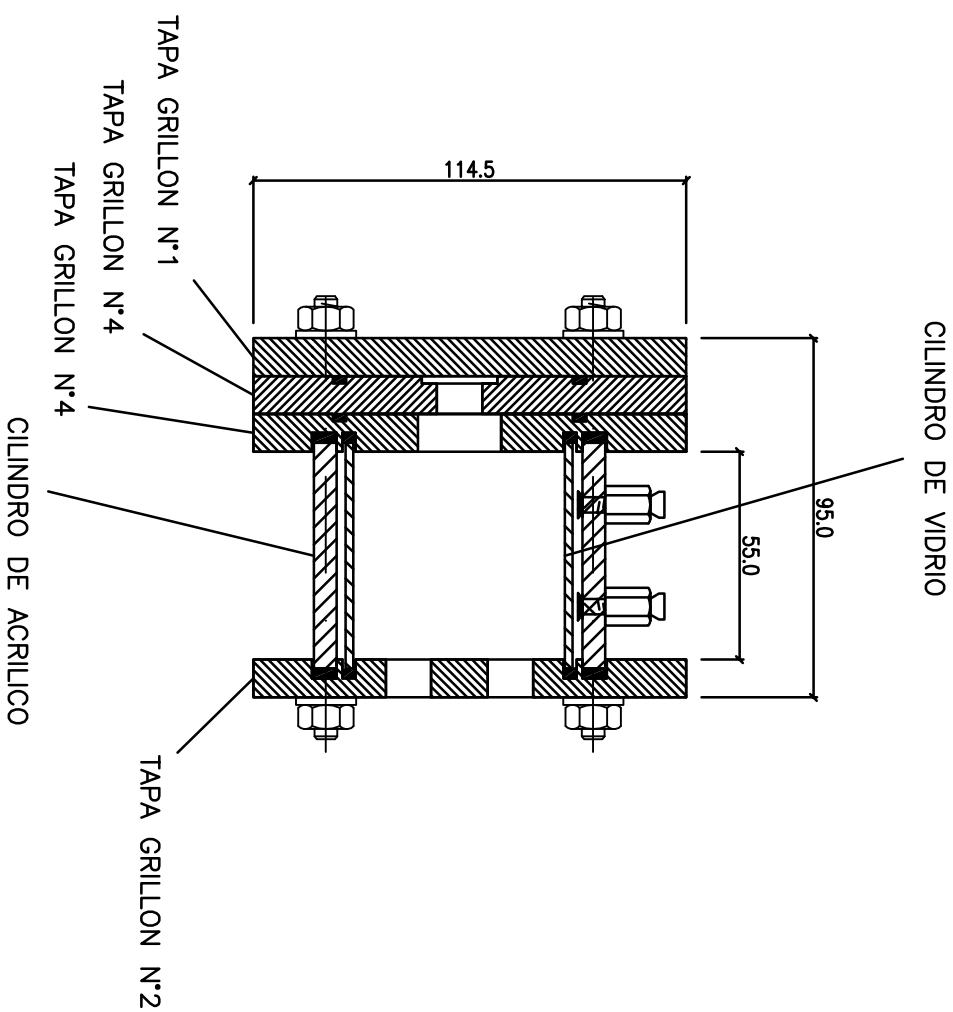
Corte C-C

		Título Plano:		TFG – Ingeniería en Materiales		Descripción:		Tapa Grillon N°4		Tolerancia Gral.:	
		Dibujió:		V.M.		Revisió:		S.C.		L ≤ 2 m: ± 2mm	
		Fecha:		02/12/2020		Fecha Dibujo:		03/10/2020		L > 2 m: ± 5mm	
		Motivo:				Fecha Revisión:				Cód. Trab.:	
		Dibujó:				Revisión:		00		00	
		Revisó:				Código Plano:		00-01-04-TFG-00		Plano N°:	
						Revisión:				01	
						Código Plano:				Hoja N°:	
						Revisión:				04	
						Revisión:				Escala:	
						Revisión:				1:2	

CILINDRO DE ACRILICO
1 UNIDAD



		Título Plano:		Descripción:		Cód. Trab.:		Tolerancia Gral.:	
		TFG – Ingeniería en Materiales		Cilindro de Acrilico		00		L ≤ 2 m: ± 2mm L > 2 m: ± 5mm	
		Dibujó: V.M.		Revisión: S.C.		Revisión: 00		Plano N°: 01	
		Fecha: 02/12/2020		Fecha Dibujo: 03/10/2020		Código Plano: 00-01-06-TFG-00		Hoja N°: 06	
		Motivo: ---		Revisó: ---		Cód. Trab.: 00		Escala: 1:2	
Rev. Nro. ---		Fecha: ---		Motivo: ---		Dibujó: ---		Revisó: ---	



Rev. Nro.		Fecha:		Motivo:		Dibujó:		Revisó:		Título Plano:		Descripción:		Cód. Trab.:		Tolerancia Gral.:	
---		---		---		---		---		TFG - Ingeniería en Materiales		Conjunto armado		00		L ≤ 2 m: ± 2mm L > 2 m: ± 5mm	
01		07		1:2		02/12/2020		03/10/2020		00		00-01-07-TFG-00		00		01	

Anexo II

Cálculo numérico de la SFE por el método de Neumann

Solvente utilizado: DIYODOMETANO

Gamma LV = 50,8

Cálculos numéricos:

Ángulos de contacto medidos experimentalmente:

CÁLCULO SFE

iterar

42,376 control

46,618 RGD

ECUACIÓN 4.2 $\beta = 0,000115$

0,811763134 = 0,8117546

ECUACIÓN 4.2 beta= 0,000115

0,912079061 = 0,91205598

COTA INFERIOR (ángulo mayor)

Gamma LV = 50,8

iterar

40,694 control

45,532 RGD

ECUACIÓN 4.2 $\beta = 0,000115$

0,769016258 = 0,76901824

ECUACIÓN 4.2 $\beta = 0,000115$

0,887417931 = 0,8874187

COTA SUPERIOR (ángulo menor)

Gamma LV = 50,8

iterar

43,963 control

47,605 RGD

ECUACIÓN 4.2 $\beta = 0,000115$

0,850549404 = 0,85055032

ECUACIÓN 4.2 $\beta = 0,000115$

0,933817695 = 0,9338122

Zr60	Zr60RGD
35,7325 ± 4,00304018	24,2064516 ± 3,24380058

Resultado del cálculo de SFE por la ecuación de estado (4.2):

ENERGIA SUPERFICIAL (SFE)	COTAS SUPERIOR E INFERIOR	
Zr60	Zr60	Zr60
42,3285 ± 1,6345	39,7355402	31,7294598
ZrRGD	Zr60RGD	Zr60RGD
46,5685 ± 1,0365	27,4502522	20,962651

Anexo III

Detalle de presupuestos y de la estimación de costos para el análisis de factibilidad económica
--

El costo de producción anual se estima a partir de los gastos fijos (generales a cuestiones operativas de la planta y propios del proceso de producción) y los costos variables de acuerdo al volumen de fabricación anual, que en este caso es de 25000 piezas al año.

I. Inversión inicial

A. Compra de equipos:

Baño ultrasónico (4 L)	99,20 USD
Fuente de corriente continua (6 unidades)	3.432,72 USD
Cámara de refrigeración (2m x 1m x 2m)	2.300,00 USD
Esterilizador UV	200,80 USD

II. Gastos de Fabricación

B. Costos variables:

Materias primas	16.898.581,42 USD
Procesamiento del material*	14.615.384,60 USD
▶ 70% DEL PRECIO DE VENTA DE IMPLANTES DE Ti6Al4V	
Embalaje (PE c/burbujas opaco)	92.500,00 USD
Mano de obra (incluidas cargas sociales)	61.253,02 USD
Supervisión (incluidas cargas sociales)	9953,62 USD
Servicios (consumo eléctrico de equipos)	29.319,76 USD
Mantenimiento	387,60 USD
▶ 9% DE LA INVERSIÓN FIJA (PROCESO COMPLEJO)	
Suministros para la operación	9.074,52 USD
▶ 20% DE LA MANO DE OBRA DIRECTA (s/ CARGAS SOCIALES)	
Gastos de laboratorio	12.250,60 USD
▶ 20% DE LA MANO DE OBRA DIRECTA (c/ CARGAS SOCIALES)	

C. Costos fijos:

Depreciación (a 10 años)	323,00 USD
Impuestos locales	43,00 USD
Seguros	32,00 USD

III. Gastos Generales

A. Costos fijos:

Administración y dirección	4.831,41 USD
Ventas y distribución	878.709,48 USD

TOTAL ANUAL **32.612.571,60 USD/año**

COSTO DE PRODUCCIÓN UNITARIO **1304,50 USD/pieza**