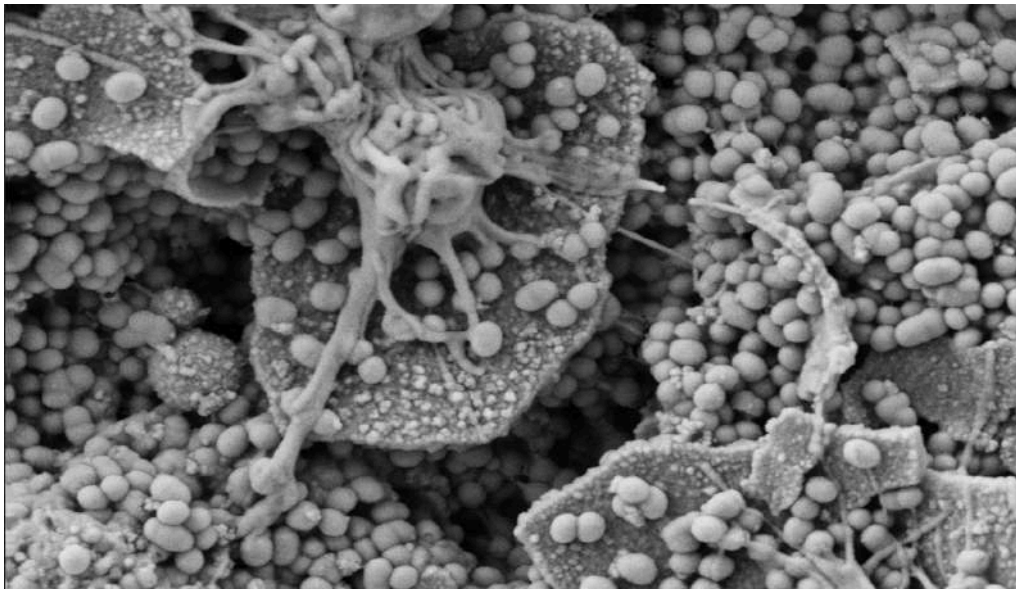




I N T E R M A



Generación de interfase bioactiva y antibacterial en implantes de Ti6Al4V mediante partículas mesoporosas y gentamicina



Florencia Carolina Uicich

DNI: 38.063.621 - Legajo: 12958
florencauicich@gmail.com

Proyecto final de grado – Ingeniería en Materiales

Directora: Dra. Josefina Ballarre

Co-Directora: Dra. Julieta Merlo

Mar del Plata - 1° de marzo del 2024

INTEMA – Conicet – División Electroquímica aplicada
UNMDP – Facultad de Ingeniería - Departamento de Ingeniería en
Materiales



RINFI es desarrollado por 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



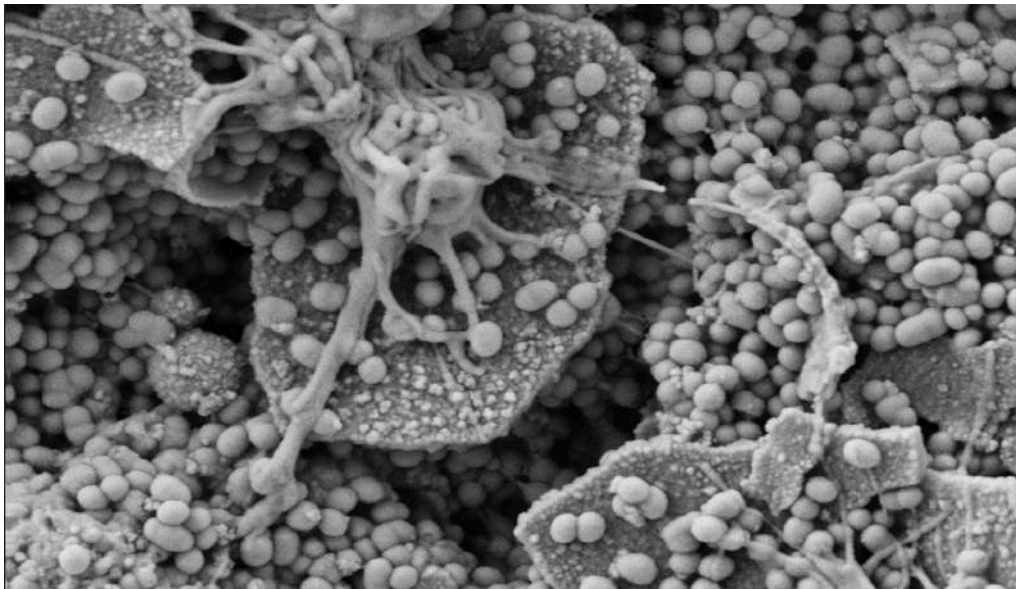
Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



I N T E M A



Generación de interfase bioactiva y antibacterial en implantes de Ti6Al4V mediante partículas mesoporosas y gentamicina



Florencia Carolina Uicich

DNI: 38.063.621 - Legajo: 12958
florencauicich@gmail.com

Proyecto final de grado – Ingeniería en Materiales

Directora: Dra. Josefina Ballarre

Co-Directora: Dra. Julieta Merlo

Mar del Plata - 1° de marzo del 2024

INTEMA – Conicet – División Electroquímica aplicada
UNMDP – Facultad de Ingeniería - Departamento de Ingeniería en
Materiales

Tabla de contenido

1 Resumen	4
2 Introducción	6
2.1 Biomateriales	6
2.1.1 Biomateriales metálicos	7
2.1.2 Biopolímeros	8
2.1.3 Vidrios bioactivos	10
2.2 Deposición electroforética	14
2.2.1 Procesamiento de imágenes	15
2.3 Métodos de caracterización	17
2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	17
2.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	17
2.3.3 Ángulo de contacto	17
2.3.4 Ensayo de adhesión por cinta	18
2.3.5 Rugosidad	18
2.3.6 Ensayos electroquímicos	20
2.3.6.1 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	21
2.3.6.2 Curvas de polarización potenciodinámicas	22
2.3.7 Hemólisis y adhesión plaquetaria	23
2.3.8 Actividad antibacterial	25
3 Objetivos	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos	26
3.2.1 Diseño	26
3.2.2 Evaluación	26
3.2.3 Comparación	27
4 Materiales y métodos	28
4.1 Materiales	28
4.2 Síntesis de partículas MBG y carga	28
4.2.1 Síntesis de partículas MBG	28
4.2.2 Carga de partículas MBG	30
4.3 Preparación de soluciones de quitosano y gelatina	30
4.4 Sistemas estudiados	31
4.5 Preparación y optimización del recubrimiento mediante EPD	31
4.5.1 Procesamiento digital de imágenes	32
4.6 Caracterización superficial	33
4.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	33
4.6.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	34
4.6.3 Ángulo de contacto	34
4.6.4 Ensayo de adhesión por cinta	34
4.6.5 Rugosidad	35
4.7 Ensayos in vitro (inmersión en SBF)	35
4.8 Ensayos electroquímicos	37

4.8.1 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	38
4.8.2 Curvas de polarización potenciodinámicas	38
4.9 Ensayos de hemocompatibilidad	39
4.9.1 Ensayo de hemólisis	39
4.9.2 Ensayo de adhesión plaquetaria	42
4.10 Ensayo de actividad antibacterial	42
5 Resultados y discusión	44
5.1 Determinación de variables para la técnica de EPD	44
5.1.1 Procesamiento digital de imágenes	44
5.2 Caracterización superficial	46
5.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	46
5.2.2 Ángulo de contacto	47
5.2.3 Ensayo de adhesión por cinta	49
5.2.4 Rugosidad	50
5.3 Ensayos in vitro (inmersión en SBF)	51
5.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	51
5.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	53
5.4 Ensayos electroquímicos	56
5.4.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	57
5.4.2 Curvas de polarización potenciodinámicas	58
5.5 Ensayos de hemocompatibilidad	60
5.5.1 Ensayo de hemólisis	60
5.5.2 Ensayo de adhesión plaquetaria	61
5.6 Ensayo de actividad antibacterial	64
5.7 Discusión general	65
6 Análisis económico	68
7 Conclusiones	73
8 Trabajo a futuro	74
9 Referencias	75

1 Resumen

Este trabajo se centra en la mejora de implantes permanentes fabricados con aleaciones de titanio, con un enfoque especial en la ampliamente utilizada aleación Ti-6Al-4V en aplicaciones biomédicas. La selección de esta aleación se basa en su utilidad para implantes intracorpóreos, como los de cadera, rodilla y codo, donde se requiere fijación ósea, bajo peso y resistencia a diversas solicitaciones.

Dado el incremento en la expectativa de vida y la prevalencia de problemas articulares, se reconoce la necesidad de implantes resistentes y biocompatibles. Aunque las aleaciones de titanio son livianas y resistentes, su capacidad de integración ósea natural es limitada y su resistencia antibacterial es nula. Por lo tanto, se propone la modificación superficial como una estrategia clave para mejorar estas propiedades.

En este estudio, la técnica de deposición electroforética (EPD) se elige como método para aplicar recubrimientos en la superficie de la aleación de titanio. Se utiliza quitosano, un biopolímero biodegradable y biocompatible, junto con gelatina tipo B y partículas mesoporosas de vidrio bioactivo (MBG) cargadas con gentamicina (Ge). Esta combinación tiene como objetivo mejorar la oseointegración y conferir propiedades antibacterianas al implante, abordando así la problemática de las infecciones postoperatorias, una de las principales causas de falla de implantes.

Los objetivos generales del estudio abarcan el análisis detallado de las características superficiales de los recubrimientos, la optimización de las condiciones de EPD y la comparación entre los diferentes recubrimientos. Se busca evaluar mejoras específicas en la bioactividad, propiedades antibacterianas y hemocompatibilidad.

La metodología se basa en la premisa de que las características superficiales de los biomateriales desempeñan un papel crucial en la respuesta biológica. Se propone un sistema de aleación de titanio recubierto con quitosano, gelatina tipo B y MBG-Ge, y se lleva a cabo una caracterización exhaustiva que incluye observación por microscopía óptica, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR), Tape test, procesamiento digital de imágenes para la cuantificación del área cubierta por el recubrimiento, ángulo de contacto, rugosidad, resistencia a la corrosión, bioactividad, hemólisis y reactividad con plaquetas.

En conclusión, este trabajo se posiciona en la vanguardia del diseño y desarrollo de implantes biomédicos mejorados, buscando abordar no solo la longevidad de la población, sino también proporcionar soluciones duraderas y efectivas para mejorar la calidad de vida. La elección estratégica de la aleación, la aplicación de la técnica EPD y la combinación específica de quitosano, gelatina y MBG-Ge resaltan como elementos clave en esta iniciativa innovadora.

2 Introducción

2.1 Biomateriales

Los biomateriales, piezas fundamentales en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, han transformado la manera en que se abordan terapias y diagnósticos médicos. Se los define como sustancias meticulosamente diseñadas para adoptar formas específicas. Ya sea de manera individual o como parte de sistemas más complejos, su propósito principal es dirigir, mediante interacciones con los componentes de sistemas biológicos, el curso de procedimientos terapéuticos o diagnósticos[1]. En esencia, son materiales, ya sean sintéticos o naturales modificados, que interactúan con sistemas biológicos, evaluando, tratando, reparando o sustituyendo órganos o funciones corporales específicas.

Estos biomateriales se dividen en dos categorías principales: los reabsorbibles, que se desintegran en el entorno tisular después de la implantación, y los no reabsorbibles, que permanecen sin cambios [2]. Además, su clasificación puede basarse en la respuesta que generan en el tejido circundante. Si provocan la muerte del tejido, se consideran tóxicos; si generan la formación de tejido fibroso que encapsula el implante, son casi inertes. Asimismo, si hay una unión entre el tejido y el implante por la formación de tejido nuevo, se denominan bioactivos, y si el tejido formado reemplaza al implante, son biodegradables.

La biofuncionalidad es una característica importante de los biomateriales, ya que deben poseer propiedades que les permitan cumplir su función específica, ya sea como implantes o dispositivos médicos. Pueden compensar la pérdida de función en tejidos dañados, reemplazar directamente funciones de tejidos enfermos o dañados, o utilizarse con fines diagnósticos, es decir, definir el rol que debe cumplir es fundamental para la selección de un biomaterial. En base a esto, es importante tener en cuenta las propiedades mecánicas como la resistencia, el módulo elástico, la resistencia al desgaste, entre otras, para que el biomaterial cumpla su función de la mejor forma posible. En conjunto, todas estas características van a definir cuál es el mejor biomaterial, los cuales pueden ser metales, polímeros, cerámicos o materiales compuestos [2].

Independientemente del tipo de material seleccionado, es fundamental que el mismo sea biocompatible. Esto quiere decir, de manera resumida, que el biomaterial posea la habilidad de actuar o desempeñarse generando una respuesta adecuada en

el receptor frente a una situación específica. Existen diversas variables del material que pueden condicionar la respuesta del hospedador como, por ejemplo: características del bulk del material, cristalinidad, constantes elásticas, características de la superficie (hidrofilicidad, energía superficial), entre otros [3].

La oseointegración se destaca como una característica clave en la evaluación de biomateriales, especialmente en el contexto de prótesis e implantes. Este fenómeno se refiere a la unión entre el implante y el hueso circundante, un factor determinante para la estabilidad a largo plazo de las prótesis. La superficie del implante desempeña un papel esencial en este proceso, donde la química, rugosidad y topografía son factores críticos. La interacción precisa entre la superficie y el entorno biológico emerge como un factor decisivo en el éxito o fracaso de la prótesis, siendo fundamental en el primer paso de la regeneración ósea. Sin embargo, diversos desafíos pueden afectar la oseointegración y llevar al fallo del implante. La falla del material y del diseño, el desprendimiento de partículas debido a la corrosión de implantes metálicos, la posibilidad de infecciones y problemas en la fijación del implante son algunas de las causas más comunes. Para mitigar estos riesgos, se han desarrollado estrategias como la aplicación de recubrimientos protectores y bioactivos. Estos recubrimientos no solo fortalecen la integridad del material, sino que también favorecen una interacción más armoniosa entre el implante y el tejido circundante, contribuyendo así a mejorar la eficacia y la durabilidad de los biomateriales en aplicaciones clínicas [2].

Finalmente, es importante remarcar que el éxito de un biomaterial no depende sólo de las propiedades y biocompatibilidad del implante, sino también de la condición clínica del paciente y de la competencia del médico que realiza la operación y hace el seguimiento posterior.

2.1.1 Biomateriales metálicos

Los biomateriales metálicos continúan desempeñando un papel crucial en la creación de implantes quirúrgicos, siendo seleccionados por sus destacadas características de soporte de carga y su resistencia a la fatiga, lo que asegura un rendimiento satisfactorio a lo largo del tiempo cuando es necesario. A pesar de las limitaciones en las composiciones químicas aceptables debido a requisitos estrictos de biocompatibilidad, principalmente relacionados con la corrosión y la resistencia al desgaste del material, los biomateriales metálicos logran propiedades adecuadas mediante un procesamiento cuidadoso y la implementación de diseños de implantes adecuados. La elección de biomateriales metálicos se fundamenta en su excepcional

capacidad para proporcionar estabilidad estructural y resistencia a condiciones rigurosas, especialmente en áreas donde se experimenta una carga mecánica sustancial. La versatilidad de estos materiales, junto con la familiaridad y accesibilidad de las técnicas de fabricación establecidas, como la fundición y el mecanizado, ha contribuido a su prominente adopción en la fabricación de implantes ortopédicos y odontológicos [4].

Diversos metales y aleaciones se utilizan en la fabricación de prótesis, siendo los más comunes el titanio, acero inoxidable y aleaciones de cobalto-cromo. Una de las principales problemáticas que enfrentan los biomateriales metálicos radica en las diferencias en los módulos elásticos de los metales y el del tejido óseo. Estas discrepancias en la rigidez pueden dar lugar al fenómeno de stress shielding. Esta carga desigual puede conducir a la pérdida de la carga normal que los huesos experimentan naturalmente, debilitando gradualmente la densidad ósea y comprometiendo la integridad estructural y la estabilidad de los implantes.

En comparación con el acero inoxidable y las aleaciones de cobalto, las aleaciones de titanio han demostrado ser superiores en términos de biocompatibilidad debido a su excelente resistencia a la corrosión [5]. También poseen un módulo elástico menor, aproximadamente de 120 GPa, aunque sigue siendo mayor que el del hueso trabecular (cerca de 30 GPa) y una menor densidad que las otras dos familias de implantes metálicos utilizados. El titanio y sus aleaciones tienen excelentes propiedades anticorrosivas, mecánicas y buena biocompatibilidad, pero no son naturalmente antibacterianas ni pueden generar una interfaz implante/hueso estable en un período corto de tiempo [6].

La aleación Ti6Al4V, con una composición de titanio, aluminio y vanadio, ha sido particularmente destacada. Esta aleación forma una estructura bifásica ($\alpha + \beta$) que ofrece una resistencia superior en comparación con el titanio comercialmente puro, manteniendo al mismo tiempo una excelente resistencia a la corrosión, por la formación rápida de una capa pasiva de óxido de titanio (TiO_2) [7].

2.1.2 Biopolímeros

El quitosano, un polímero natural derivado de la quitina, constituye una parte esencial en la ingeniería de biomateriales, especialmente en aplicaciones biomédicas. La quitina, un homopolímero lineal de N-acetil-glucosamina, se somete a un proceso de desacetilación alcalina para dar lugar al quitosano. Este último es un copolímero

poli catiónico de N-acetil-glucosamina y N-glucosamina, y se define como tal cuando el grado de desacetilación supera el 50% (ver Figura 1).

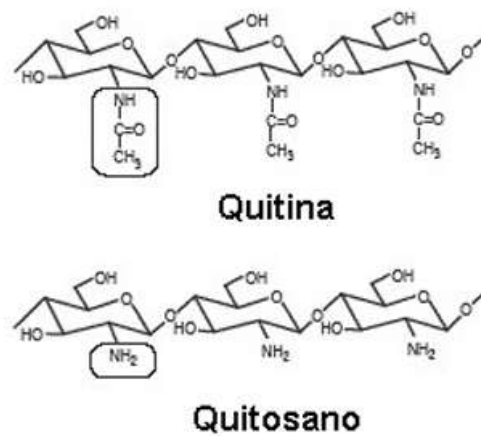


Figura 1. Estructura química de la quitina y el quitosano.

La estructura del quitosano presenta características únicas que lo distinguen. A diferencia de la quitina, el quitosano carece de grupos de ácido urónico. Su composición básica, derivada de la quitina, le confiere propiedades excepcionales. Es un componente primordial en las paredes celulares de hongos y en el exoesqueleto de crustáceos como camarones, cangrejos y langostas. Este origen natural y su capacidad para ser obtenido por métodos sostenibles lo convierten en un material atractivo para aplicaciones biomédicas.

La molécula de quitosano, al ser un polímero poli catiónico, exhibe cargas positivas en sus grupos amino. Esta característica es fundamental, ya que confiere al quitosano propiedades únicas para interactuar con otras moléculas en entornos biológicos. Su solubilidad en soluciones ácidas diluidas, como ácido acético o hidrócloruro, se debe a la protonación de estos grupos amino. Este atributo es particularmente valioso en la formación de hidrogeles de quitosano, que pueden ser utilizados en diversas aplicaciones biomédicas.

El quitosano ha demostrado ser útil en aplicaciones biomédicas por varias razones. Su capacidad para formar hidrogeles a través de redes entrelazadas, enlaces iónicos o reticulación covalente lo convierte en un candidato ideal para matrices tridimensionales en ingeniería de tejidos. Además, su naturaleza biodegradable, metabolizada por enzimas humanas como la lisozima, asegura una degradación controlada en entornos fisiológicos.

En aplicaciones biomédicas específicas, como en la regeneración de tejidos y apósitos para heridas, el quitosano ha sido objeto de extensa investigación. Sus

propiedades químicas versátiles, que incluyen múltiples sitios funcionales de hidroxilo y amino, permiten diversas oportunidades de modificación. La capacidad de conjugación de biomoléculas, ya sea por modificación iónica, adsorción o enlaces covalentes, ha ampliado sus posibilidades en la entrega de fármacos, promoviendo el crecimiento celular y mejorando la eficacia de las aplicaciones biomédicas [8].

Por otro lado, la gelatina tipo B, un biopolímero derivado de la hidrólisis alcalina del colágeno, presenta propiedades únicas que la hacen valiosa en diversas aplicaciones biomédicas. Su estructura química resulta de la modificación del colágeno a través de procesos alcalinos, lo que afecta sus características físicas y químicas. Composicionalmente, la gelatina tipo B se compone principalmente de residuos de aminoácidos provenientes del colágeno, con cambios significativos en su carga iónica durante el proceso de hidrólisis alcalina. Este tratamiento elimina parcialmente los grupos amida de glutamina y asparagina, aumentando así la proporción de ácido aspártico y ácido glutámico [9], [10]. La hidrólisis alcalina también da como resultado una disminución en el tamaño de las cadenas polipeptídicas, contribuyendo a su solubilidad en soluciones acuosas. La gelatina tipo B presenta cargas predominantemente negativas debido a la presencia de los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico en su estructura. Estas cargas hacen que la gelatina tipo B sea particularmente propensa a interacciones iónicas con materiales cargados positivamente, lo que es relevante en aplicaciones biomédicas donde se busca la interacción específica con células y tejidos. En términos de aplicaciones biomédicas, la gelatina tipo B ha demostrado ser extremadamente útil debido a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y capacidad de formar geles reversibles. Se utiliza comúnmente en la fabricación de matrices para ingeniería de tejidos y en sistemas de liberación controlada de fármacos. Su capacidad para formar geles *in situ* la convierte en un material valioso para la administración localizada de terapias, y su interacción con células a través de las cargas en su molécula la hace adecuada para su uso en implantes y andamios para regeneración de tejidos [10].

2.1.3 Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos son materiales innovadores que han revolucionado el campo de los biomateriales debido a su capacidad única para interactuar con tejidos biológicos. Estos materiales poseen propiedades que favorecen la unión directa entre el implante y el hueso, promoviendo la regeneración y remodelación ósea. La fórmula general de estos vidrios bioactivos puede expresarse como $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Esta

composición imita la estructura mineral del hueso humano, lo que facilita su interacción con el medio biológico [11], [12].

La interacción de las partículas de vidrio bioactivo con el medio biológico es fundamental para su funcionalidad. Estas partículas, al entrar en contacto con los fluidos corporales, generan una capa de hidroxiapatita en su superficie, imitando la mineralización natural del hueso [13]. Este proceso se basa en la liberación de iones de calcio y fósforo, que inician la formación de la hidroxiapatita, fortaleciendo la unión implante-hueso. Además, la química de la superficie del vidrio bioactivo durante esta interacción sigue cinco etapas clave:

1. Lixiviación y formación de silanoles (SiOH): Involucra la liberación de iones, especialmente mediante el intercambio de iones de metales alcalinos o alcalinotérreos con iones H^+ o H_3O^+ de la solución. En este proceso, se forman silanoles en la superficie del vidrio.

2. Pérdida de sílice soluble y formación de silanoles: Implica la pérdida de sílice soluble desde la superficie del vidrio y la formación continua de silanoles, contribuyendo a la reestructuración de la capa superficial.

3. Policondensación de silanoles para formar un gel de sílice hidratado: Los silanoles se condensan y repolimerizan, formando un gel de sílice hidratado. Este proceso está asociado con la densificación y reordenamiento de la capa superficial.

4. Formación de una capa amorfa de fosfato de calcio: Se produce la migración de iones de calcio y fosfato hacia la superficie a través de la capa rica en sílice, formando una capa amorfa de fosfato de calcio.

5. Cristalización de una capa de apatita de hidroxicarbonato (HCA): La capa de fosfato de calcio amorfo se cristaliza con el tiempo, incorporando iones de hidrólisis y carbonato de la solución, dando lugar a la formación de una capa cristalina de apatita de hidroxicarbonato (HCA).

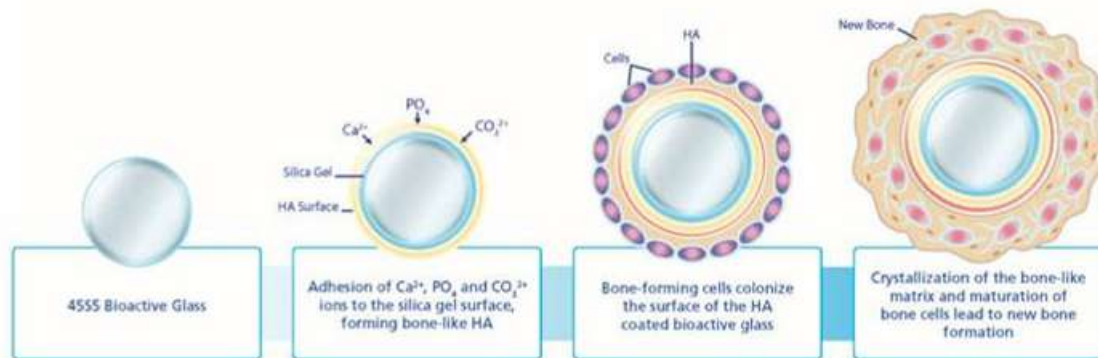


Figura 2. Reacciones de superficie en el vidrio bioactivo.

Estas etapas representan el proceso secuencial mediante el cual el vidrio bioactivo interactúa con fluidos corporales y desarrolla propiedades de unión ósea [14].

Según la clasificación de Hench, los vidrios bioactivos se dividen en tres categorías según la tasa de desarrollo de la unión interfacial implante-hueso: bioinertes, bioactivos y bioactivos reabsorbibles [11]. Los vidrios bioactivos son especialmente relevantes, ya que promueven una unión más rápida y fuerte entre el implante y el hueso, facilitando la integración del material en el sistema biológico.

Existen diversos métodos para obtener vidrios bioactivos, siendo dos de los más destacados la colada o fusión (melting) y el método sol-gel. El método sol-gel, una ruta química innovadora, destaca por su versatilidad y control preciso sobre la estructura del material, llevándose a cabo a temperaturas considerablemente más bajas que las técnicas convencionales.

Este proceso inicia con precursores líquidos que, mediante reacciones químicas controladas, forman una red tridimensional de partículas vítreas, permitiendo mayor homogeneidad y una estructura más fina del material. Su singularidad radica en la capacidad de ajustar con precisión la composición del vidrio para adaptarlo a requisitos específicos.

La preferencia por el método sol-gel se debe a su capacidad para aumentar significativamente el área superficial específica del material, mejorando así la reactividad y degradabilidad del producto final. Además, ofrece un control crucial sobre la homogeneidad y pureza del vidrio, siendo esencial en aplicaciones donde la uniformidad y pureza son críticas, asegurando la calidad consistente del material [14].

En este método se sintetiza una solución de precursores monoméricos que, a través de reacciones de hidrólisis y condensación, se convierte en un sólido con solvente. Este sólido se densifica mediante tratamientos térmicos, y las propiedades

finales dependen de parámetros como el tipo de precursor, cantidad de agua, tipo de catalizador, pH, tiempo y temperatura [15].

Se ha comprobado que los geles obtenidos por sol-gel, como el SiO_2 , pueden inducir la formación de apatita en su superficie, lo que subraya su aplicabilidad en contextos biomédicos. La presencia de grupos no hidrolizables en los precursores otorga propiedades específicas al material resultante, como mayor plasticidad y carácter hidrofóbico [16].

En el contexto del proceso sol-gel, en este estudio se ha introducido una innovación significativa: la síntesis de partículas de vidrio bioactivo mesoporosas. Mediante matrices poliméricas o naturales que luego son eliminadas, se obtienen porosidades ordenadas o aleatorias, pero por sobre todo, generando una gran área expuesta del vidrio. En la Figura 3 se muestra un ejemplo de una matriz orgánica sintética como el bromuro de etiltrimetilamonio (CTAB), que luego se descompone para generar poros en la superficie de las partículas.

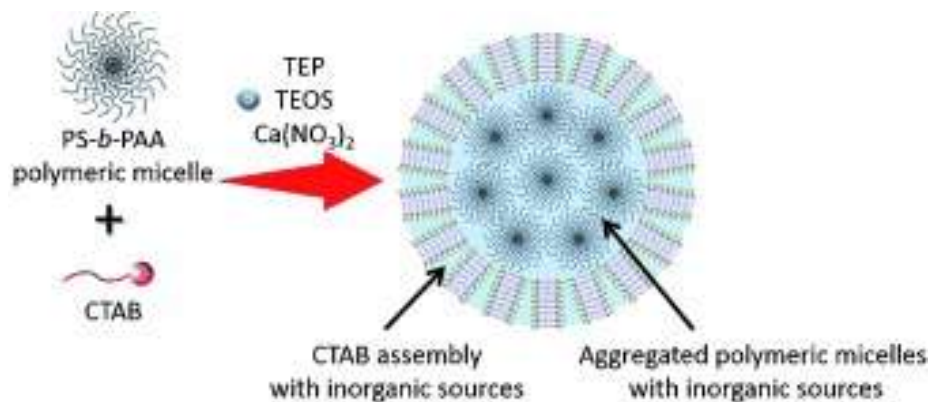


Figura 3. Ejemplo de síntesis de partículas mesoporosas por método Sol Gel [17].

Estas partículas mesoporosas sirven como sistemas de liberación controlada de sustancias terapéuticas. Su alta área superficial y la posibilidad de cargar agentes terapéuticos en los poros las convierten en candidatas ideales para aplicaciones biomédicas. La liberación sostenida de antibióticos desde estas partículas mesoporosas puede contribuir significativamente a la prevención y tratamiento de infecciones en implantes biomédicos [18].

La gentamicina es un antimicrobiano aminoglucósido que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas. Este grupo de antibióticos se caracteriza por su estructura química única, comprende tres anillos fusionados, dos de los cuales son anillos aminociclitol y el tercero es un anillo aminado. Estos anillos

están conectados por puentes glucósidos, formando un esqueleto tricíclico característico (ver Figura 4).

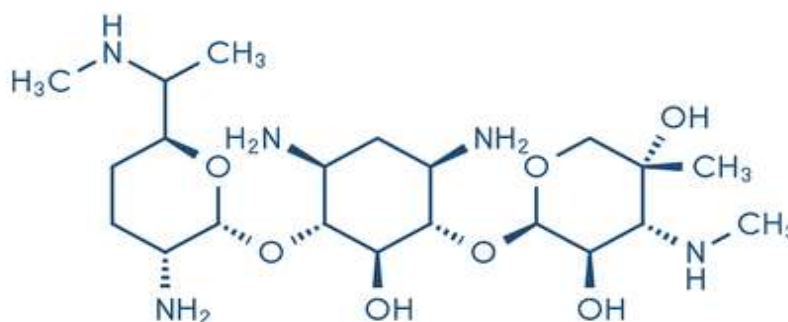


Figura 4. Estructura química de la gentamicina.

2.2 Deposición electroforética

Existen diversas técnicas para la aplicación de recubrimientos, como el dip-coating, spin-coating, spray-coating y la deposición electroforética (EPD, por sus siglas en inglés). La EPD es una técnica avanzada que capitaliza la migración de partículas suspendidas en un fluido bajo la influencia de un campo eléctrico. Este método se ha empleado en aplicaciones que van desde recubrimientos cerámicos hasta la fabricación de dispositivos nanotecnológicos, destacando por su versatilidad y ventajas económicas.

La EPD presenta ventajas notables, siendo altamente versátil y fácilmente adaptable a aplicaciones específicas. Por ejemplo, es posible realizar la deposición en sustratos planos, cilíndricos u otras formas complejas con mínimos ajustes en el diseño y posición del electrodo. A pesar de ser un proceso en medio húmedo, la EPD permite un control sencillo del espesor y la morfología de la capa depositada mediante ajustes en el tiempo de deposición y el potencial aplicado. Además, destaca por ser una técnica de bajo costo en comparación con otros métodos de recubrimiento [19].

El proceso de EPD se lleva a cabo en una celda con dos electrodos (el de trabajo y un contraelectrodo), como se muestra en la Figura 5. Implica la aplicación de un campo eléctrico entre los electrodos, induciendo la migración de partículas cargadas hacia el electrodo con carga opuesta (electroforesis). Posteriormente, las partículas se acumulan en el electrodo de deposición, creando una película compacta y homogénea [20].

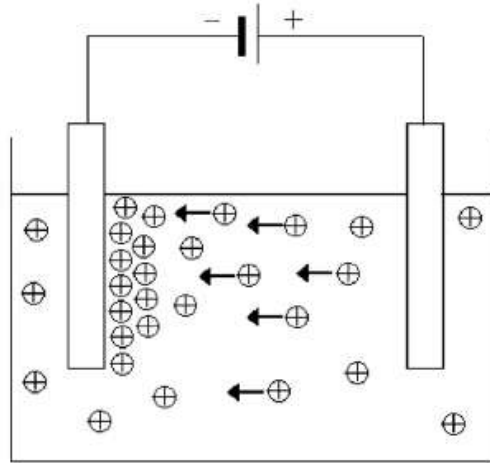


Figura 5. Celda de deposición electroforética.

La técnica de EPD se caracteriza por cuatro variables clave:

1. Distancia entre electrodos.
2. Tiempo o duración del proceso.
3. Solución: es importante que sea estable y que contenga partículas cargadas que puedan moverse libremente cuando se aplica un campo eléctrico (el tamaño, forma y carga de las partículas influyen en su movilidad y en la calidad del depósito).
4. Potencia aplicada.

En resumen, la técnica de EPD, representa una herramienta valiosa en la fabricación de recubrimientos avanzados, proporcionando un control preciso, versatilidad y eficiencia económica en diversas aplicaciones.

2.2.1 Procesamiento de imágenes

En la EPD, la evaluación del área de cobertura se ha llevado tradicionalmente a cabo mediante pesaje. No obstante, en este estudio se introduce una innovación mediante la implementación de un algoritmo basado en procesamiento digital de imágenes, en lugar de métodos convencionales. De esta manera, se utiliza un algoritmo para cuantificar automáticamente el área de cobertura por partículas mesoporosas cargadas con gentamicina. Este método difiere de los enfoques tradicionales, permitiendo una evaluación más precisa y eficiente ya que puede personalizarse. El algoritmo puede adaptarse completamente a las necesidades específicas del problema, teniendo en cuenta todos los detalles y requisitos del mismo. Da una mayor flexibilidad, ya que se puede ajustar y modificar según sea necesario a

medida que se avanza en la comprensión del problema o surgen nuevas restricciones. Las herramientas predefinidas son más fáciles de usar y rápidas de implementar, pero pueden tener limitaciones en términos de personalización y adaptabilidad. El algoritmo consta de tres etapas esenciales.

Primero, se convierte la imagen a niveles de gris, ya que la información de color no es crucial para detectar las partículas. Luego, se realiza la presencia de partículas mediante la transformada Top-Hat, una operación de morfología matemática. Esta transformada destaca objetos localmente brillantes u oscuros en la imagen. La transformada Top-Hat se realiza restando el resultado de una operación de apertura morfológica de la imagen original. Formalmente, se define como el residuo entre la imagen original f y la imagen resultante de un operador de apertura morfológico sobre la misma $\gamma_b(f)$ [21], [22]:

$$\rho_b(f) = f - \gamma_b(f) \quad (\text{Ec. 1})$$

Finalmente, se aplica un umbral basado en el modelo gaussiano adaptativo para obtener una imagen binaria con las partículas claramente segmentadas. De esta imagen es posible obtener de una manera rápida y fácil el porcentaje de área cubierta.

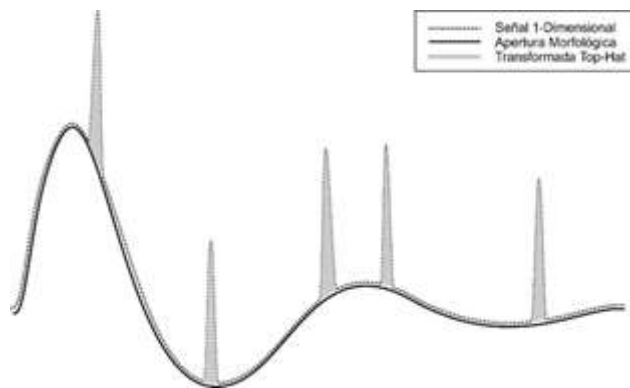


Figura 6. Transformada Top-Hat por apertura sobre una señal 1-dimensional.

Mediante el procesamiento de imágenes propuesto en este trabajo se puede discretizar y cuantificar el área cubierta por recubrimientos y/o partículas de forma automatizada y no dependiendo de pesajes o el análisis de diferentes operadores u observadores. Este procedimiento permitiría optimizar el proceso para la obtención de recubrimientos de mejor calidad.

2.3 Métodos de caracterización

2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Es una técnica avanzada de caracterización de materiales que utiliza un haz de electrones para explorar la superficie de muestras sólidas. A diferencia de los microscopios ópticos, la microscopía electrónica de barrido tiene una mayor resolución y profundidad de campo, permitiendo la observación detallada de la topografía y morfología de las muestras a una escala microscópica. Esto permite revelar detalles finos de la superficie de los materiales, la visualización tridimensional de la topografía de la muestra, revelando rugosidades, porosidades y otros detalles estructurales [23].

2.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia FTIR es una técnica analítica que utiliza la radiación infrarroja para estudiar las vibraciones moleculares de los materiales. Se basa en la absorción de la luz infrarroja por parte de los enlaces químicos presentes en las moléculas, lo que proporciona información sobre la composición química y la estructura molecular de una muestra [24].

La técnica de FTIR ha revolucionado la caracterización de materiales al proporcionar una herramienta no destructiva y altamente informativa para investigaciones en química, ciencia de materiales y otras disciplinas científicas.

2.3.3 Ángulo de contacto

La observación de una gota de líquido en una superficie sólida proporciona información valiosa sobre las propiedades superficiales. El ángulo de contacto, determinado por la interacción gota-superficie, mide directamente la mojabilidad de la superficie, considerándose hidrofílica para ángulos menores a 90° e hidrofóbica para mayores, e indirectamente mide la energía superficial. Este equilibrio de fuerzas se expresa como:

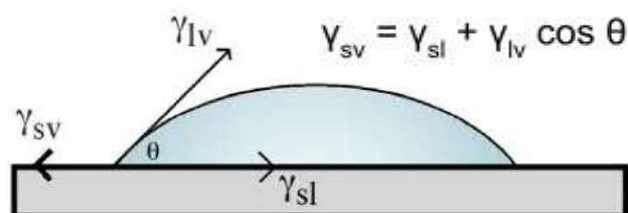


Figura 7. Definición del ángulo de contacto.

Siendo γ_{sv} , γ_{sl} y γ_{lv} , la tensión superficial de las interfases sólido/vapor, sólido/líquido y líquido/vapor respectivamente. Por otro lado, θ se corresponde con el ángulo de contacto formado en la interfase.

La medición del ángulo de contacto, realizada con goniómetros o sistemas de video, ofrece una visión directa de cómo la superficie interactúa con su entorno. Esta técnica simple es esencial para la caracterización de materiales, ya que determinar la hidrofiliicidad de la superficie es de gran importancia debido a la influencia que posee sobre la adhesión de proteínas y la subsiguiente interacción con las células. Es importante mencionar que existen otras propiedades de superficie que también influyen, como por ejemplo la rugosidad [8].

2.3.4 Ensayo de adhesión por cinta

La prueba de cinta adhesiva evalúa la adhesión de recubrimientos a través de la aplicación y retirada de cinta adhesiva. Se busca determinar la cohesión y adherencia del recubrimiento, observando cuánto material se desprende. Esta técnica es común en la industria de recubrimientos para garantizar la calidad y durabilidad de las capas aplicadas, norma ASTM D3359-09 (“Métodos de Prueba Estándar para Medir la Adhesión mediante la Prueba de Cinta”) [25].

2.3.5 Rugosidad

La perfilometría es una técnica de medición que utiliza un instrumento denominado perfilómetro para determinar el perfil de una superficie, permitiendo cuantificar su rugosidad. Esta medida se realiza a través de parámetros que evalúan la amplitud relativa entre los picos y valles de la superficie en relación con la longitud medida. En el contexto de aplicaciones biomédicas, donde la interacción entre materiales y tejidos es crucial, la caracterización de la rugosidad de las superficies es de gran importancia.

En líneas generales y para diferentes aplicaciones, cuando se aplica un recubrimiento uniforme sobre un sustrato metálico, se tiende a suavizar la superficie, ocultando posibles imperfecciones, como las generadas durante procesos de pulido. Esta transformación es detectable mediante la variación de parámetros de rugosidad medidos. En el ámbito biomédico, comprender y controlar la rugosidad es esencial debido a su influencia en la respuesta del cuerpo a los implantes. En los materiales intracorpóreos algunas veces se necesitan superficies “lisas”, como en cabezas femorales para mejorar el deslizamiento o en stents cardíacos para evitar la adhesión

celular; o superficies con un cierto grado de rugosidad, para controlar la adhesión selectiva de células o mejorar procesos de anclaje, como tornillos óseos o dentales.

La rugosidad superficial es un factor crítico, ya que puede afectar tanto la función mecánica como la biológica de los implantes. Por ejemplo, una mayor rugosidad puede mejorar el trabado mecánico entre el implante y el hueso, pero también podría desencadenar procesos inflamatorios no deseados y facilitar la adhesión de bacterias. Por otro lado, un perfil de rugosidad en la escala de micrones o nanómetros puede aumentar la energía superficial, mejorando la adsorción de proteínas y la adhesión celular, aspectos fundamentales para la integración de los implantes en el tejido circundante.

Dos parámetros clave en la evaluación de la rugosidad son el Ra (rugosidad media aritmética) y el Rz (rugosidad media). El Ra se calcula como la media aritmética de los valores absolutos de las coordenadas de los puntos del perfil de rugosidad en relación con la línea media (ver Figura 8 y Ec.2).

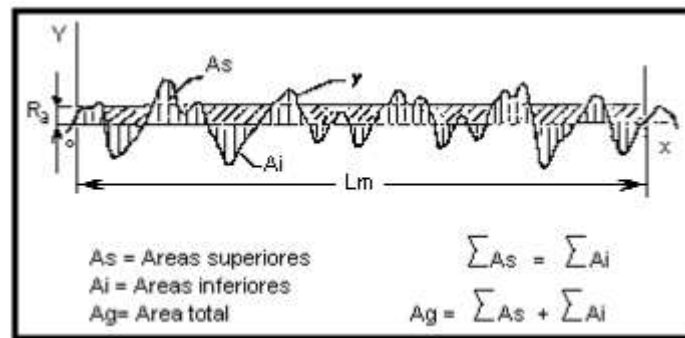


Figura 8. Determinación del parámetro Ra.

$$Ra = \frac{1}{Lm} \int_0^{Lm} |y| dx \quad (Ec. 2)$$

Por otro lado, el Rz proporciona información complementaria al Ra al considerar la media aritmética de los valores de rugosidad parcial Zi en cinco módulos a lo largo de la longitud de medición (Ver Figura 9 y Ec. 3). Estos parámetros son fundamentales para comprender y controlar las propiedades superficiales en aplicaciones biomédicas, asegurando la eficacia y la biocompatibilidad de los implantes.

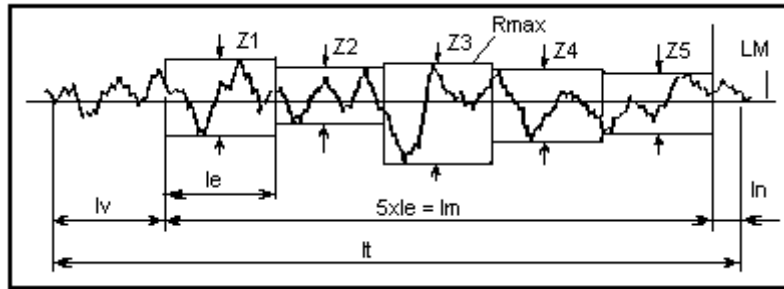


Figura 9. Determinación del parámetro Rz.

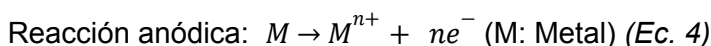
$$R_z = \frac{1}{5} (Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5) \quad (\text{Ec. 3})$$

A su vez, esta técnica es empleada con el objetivo de medir el espesor de la capa depositada por la deposición electroforética.

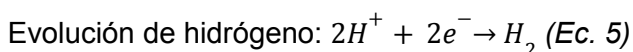
2.3.6 Ensayos electroquímicos

Dado que resulta inviable estudiar la reacción a la corrosión de un implante metálico *in situ* dentro del organismo, se recurre a técnicas de caracterización electroquímica que permiten acelerar y realizar evaluaciones *in vitro* de la respuesta del material en un entorno fisiológico simulado. En este contexto, se emplea un medio artificial que replica la temperatura, pH, y iones inorgánicos presentes en el plasma sanguíneo, aunque omite considerar componentes orgánicos que también interactúan con el implante en el organismo.

Estos ensayos se llevan a cabo en celdas electroquímicas termostatzadas a 37°C con un electrolito conductor (solución fisiológica), utilizando tres electrodos: un electrodo de trabajo que representa el metal a analizar, un electrodo de referencia y un contraelectrodo. En el caso de un metal con o sin recubrimiento, las reacciones de oxidación se ven limitadas por el contacto del electrolito con el metal en los poros o defectos que pueda presentar el recubrimiento u óxido. De manera genérica, las posibles reacciones que se podrían dar en el medio son:



Posibles reacciones catódicas:



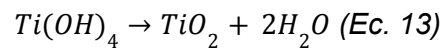
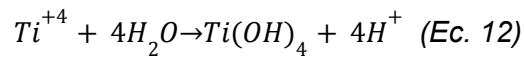
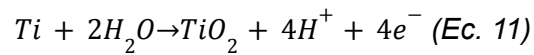
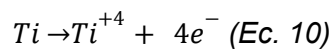
Reducción de oxígeno: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ (soluciones ácidas) (Ec. 6)

Reducción de oxígeno: $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$ (soluciones básicas) (Ec. 7)

Reducción del agua: $2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$ (Ec. 8)

Reducción de ión metálico: $M^{n+} + ne^- \rightarrow M$ (Ec. 9)

De manera más específica para las aleaciones de titanio de uso médico, es importante remarcar la formación de óxido de titanio dentro de las reacciones que ocurren en el sistema, ya que es la encargada de formar una película o capa de protección en la superficie, lo cual le otorga una mayor resistencia a la corrosión.



Para analizar el comportamiento del material metálico recubierto y contrastarlo con el metal sin recubrimiento a diferentes períodos de inmersión, se emplean dos de las técnicas más utilizadas: la espectroscopía de impedancia electroquímica y la curva de polarización potenciodinámica. Estas técnicas proporcionan información crucial sobre la cinética de las reacciones redox y la corrosión, permitiendo una evaluación detallada de la resistencia del material en condiciones simuladas que se asemejan a las del entorno fisiológico.

2.3.6.1 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica analítica no destructiva utilizada en la caracterización de interfaces electroquímicas. Esta técnica permite estudiar la respuesta de un sistema a una perturbación sinusoidal de pequeña amplitud aplicada a través de un rango de frecuencias. Se implementa comúnmente en sistemas electroquímicos para comprender procesos fundamentales, evaluar la cinética de reacciones redox y caracterizar la resistencia de la interfaz electroquímica.

La impedancia Z se define como la relación entre la amplitud de la onda sinusoidal de la señal aplicada $V(t)$ y la respuesta resultante $I(t)$, representada por la fórmula:

$$Z(\omega) = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \theta)} \quad (\text{Ec. 14})$$

Esta relación compleja se expresa en forma polar como la magnitud de la impedancia ($|Z|$) y el ángulo de fase (ϕ). El espectro de impedancia proporciona información detallada sobre la resistencia, capacitancia y procesos difusionales en el sistema estudiado.

La representación gráfica más común de los datos de EIS es el diagrama de Nyquist y el gráfico de Bode. El diagrama de Nyquist representa la impedancia compleja en un plano de coordenadas imaginarias y reales, mientras que el gráfico de Bode muestra la respuesta en frecuencia en una escala logarítmica (ver Figura 10).

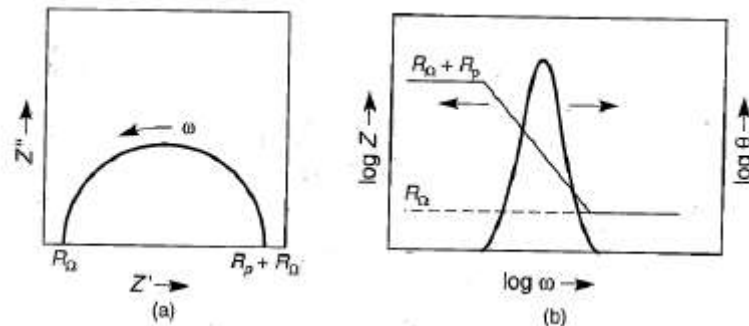


Figura 10. (a) Gráfico de Nyquist, (b) Gráfico de Bode.

En el diagrama de Nyquist, la resistencia de la solución se proyecta sobre el eje real, y los elementos capacitivos o inductivos se representan en el eje imaginario. La frecuencia angular (ω) y la constante de tiempo (τ) están relacionadas por $\tau=1/\omega$. A muy alta frecuencia, el componente imaginario desaparece, quedando únicamente la resistencia de la solución, mientras que a muy bajas frecuencias, nuevamente desaparece la componente imaginaria, pero queda la suma de la resistencia de la solución y la resistencia de polarización.

El gráfico de Bode traza la magnitud de la impedancia y el ángulo de fase frente a la frecuencia. Este tipo de representación permite identificar la frecuencia de relajación de los componentes del sistema y evaluar la respuesta a diferentes frecuencias.

2.3.6.2 Curvas de polarización potenciodinámicas

Las curvas de polarización potenciodinámicas desempeñan un papel crucial en la caracterización electroquímica, ofreciendo una visión de la cinética de las reacciones

redox y la corrosión de materiales. Este análisis destructivo se lleva a cabo mediante un barrido potenciodinámico, donde se varía progresivamente el sobrepotencial aplicado, ya sea positivo o negativo, en relación con el potencial de corrosión, registrando las corrientes resultantes.

Una curva de polarización típica consta principalmente de dos regiones: la catódica y la anódica. La región catódica refleja la relación entre la corriente y el potencial cuando predomina la reducción, mientras que la región anódica proporciona información sobre la oxidación.

Un aspecto clave de estas curvas es el potencial de corrosión (E_{corr}), que señala el punto en el cual la velocidad de oxidación se iguala a la velocidad de reducción, indicando un estado de corrosión mínimo.

Por otro lado, también permiten extraer parámetros esenciales, como la densidad de corriente de corrosión (i_{corr}), que cuantifica la velocidad general de corrosión. La pendiente en la región anódica o catódica en el punto de corrosión activa se emplea para calcular la velocidad de corrosión local. Ambos parámetros (E_{corr} e i_{corr}) pueden ser obtenidos de la curva de polarización potenciodinámica aplicando el método de extrapolación de Tafel.

A pesar de que los potenciales aplicados en estos ensayos pueden superar los valores a los que el material estará expuesto durante su vida útil, proporcionan una comprensión general de su comportamiento bajo condiciones extremas. Este enfoque, aunque destructivo para la muestra, resulta invaluable para diseñar estrategias efectivas de protección contra la corrosión en diversas aplicaciones o para evaluar el comportamiento del material en diferentes medios.

2.3.7 Hemólisis y adhesión plaquetaria

La evaluación de la hemocompatibilidad en implantes, especialmente en prótesis permanentes, generalmente no se realiza como parte de la rutina estándar. Estos ensayos son más comunes en dispositivos que están en contacto directo con la sangre, como los stents. Sin embargo, es crucial tener en cuenta la importancia de la hemocompatibilidad en todos los tipos de implantes, ya que puede tener consecuencias significativas si no se aborda adecuadamente.

La hemocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material para interactuar con la sangre sin desencadenar respuestas adversas. Si un implante no es

hemocompatible, puede provocar respuestas inmunológicas, coagulación no deseada, o incluso rechazo del dispositivo. En el caso de implantes permanentes, esto puede llevar a complicaciones graves a largo plazo.

Cuando un implante entra en contacto con la sangre, varias células del sistema circulatorio entran en juego, incluyendo glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Cada uno de estos desempeña un papel vital en las cascadas biológicas que ocurren en respuesta a la presencia del implante. Los glóbulos rojos transportan oxígeno y nutrientes, los leucocitos participan en respuestas inmunológicas, y las plaquetas están involucradas en la coagulación sanguínea.

Las plaquetas, en particular, desempeñan un papel crucial en la hemostasia. Cuando se produce la activación de las plaquetas, liberan factores de crecimiento y químicos que desencadenan respuestas inflamatorias y reparativas. Además, aunque la activación de las plaquetas a menudo se asocia con eventos trombóticos no deseados, también es un parámetro de medición de la bioactividad de un implante.

La bioactividad se refiere a la capacidad de un material para interactuar de manera beneficiosa con los tejidos circundantes, favoreciendo la integración exitosa del implante. La activación controlada de las plaquetas puede ser utilizada estratégicamente para mejorar la integración del dispositivo y promover la regeneración tisular alrededor del implante.

En términos de cascadas biológicas para la integración del implante, se requieren una serie de eventos biológicos y respuestas celulares que deben ocurrir en secuencia para garantizar que el implante sea bien tolerado y funcione de manera efectiva. La respuesta inflamatoria inicial debe ser controlada y seguida por procesos de reparación y regeneración tisular. La activación de células clave, como fibroblastos y osteoblastos, es esencial para la formación de tejido alrededor del implante y esta es promovida por la liberación de moléculas por las plaquetas activadas. De manera experimental la activación de las plaquetas se puede determinar por la morfología que adoptan.

En el presente trabajo se buscará poner a punto un protocolo que permita evaluar la hemocompatibilidad y adhesión plaquetaria para analizar la biocompatibilidad de la aleación recubierta.

2.3.8 Actividad antibacterial

Los ensayos de actividad antibacterial juegan un papel fundamental en la evaluación de implantes, garantizando su seguridad y eficacia al prevenir potenciales infecciones. Estos ensayos son esenciales para determinar la capacidad de los materiales recubiertos en la inhibición del crecimiento bacteriano, especialmente en presencia de *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) y *Escherichia coli* (Gram-negativo), dos bacterias comúnmente asociadas con infecciones en entornos médicos [26].

La importancia de estos ensayos radica en la necesidad de prevenir infecciones relacionadas con implantes, ya que la presencia de bacterias puede conducir a complicaciones graves en pacientes. En el contexto de los implantes, la actividad antibacterial es crucial para asegurar que el material recubierto sea capaz de resistir la colonización bacteriana, reduciendo así el riesgo de infecciones postoperatorias y la posterior administración de antibióticos de manera prolongada y por vía sistémica.

La presencia de bacterias en implantes y prótesis representa un riesgo significativo para la salud del paciente. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, dos de los microorganismos más comunes, tienen la capacidad de adherirse a la superficie de los materiales implantables, formando biopelículas [27]. Estas biopelículas son comunidades bacterianas altamente resistentes, capaces de desencadenar infecciones persistentes y difíciles de tratar. Además, la resistencia adquirida por las bacterias dentro de las biopelículas complica aún más su erradicación. La presencia de estas biopelículas bacterianas en implantes y prótesis aumenta significativamente el riesgo de infecciones crónicas, rechazo del implante y la necesidad de intervenciones quirúrgicas adicionales. En consecuencia, es importante que los materiales recubiertos con propiedades antibacterianas sean capaces de prevenir la formación de biopelículas y conserven así la integridad y funcionalidad de los implantes biomédicos. En este contexto, la medición del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo proporciona información valiosa sobre la eficacia antibacteriana de los implantes, resultando indispensable para su evaluación y desarrollo continuo.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Se espera diseñar, optimizar y probar un sistema de implante-recubrimiento, que mejore las características bioactivas y antibacterianas, para utilizar como implantes permanentes de titanio gr. 5. El recubrimiento a base de quitosano y biovidrio mesoporoso se espera que tenga características biocompatibles, y bioactivas. También, mediante la incorporación de gentamicina como dopante en las partículas mesoporosas, se pretende inducir un efecto antibacterial para evitar infecciones. También se pondrá a punto un protocolo de hemocompatibilidad y adhesión plaquetaria para analizar biocompatibilidad de la aleación recubierta.

3.2 Objetivos específicos

El proyecto se divide en dos grandes grupos de objetivos específicos: diseñar primero, y evaluar después. Posteriormente se presenta una etapa de comparación.

3.2.1 Diseño

- Optimizar la síntesis de partículas mesoporosas de vidrio y su dopaje con gentamicina de uso médico.
- Optimizar parámetros de EPD para generar películas homogéneas, continuas y que contengan las partículas sobre muestras de Ti gr 5.
- Adaptar y sistematizar un protocolo de ensayos de hemólisis y adhesión plaquetaria en solución para los nuevos materiales.

3.2.2 Evaluación

- Estudiar mediante microscopía, espectroscopias, y métodos complementarios, la estructura de la aleación y del recubrimiento, así como sus propiedades superficiales.
- Estudiar la respuesta *in vitro* inorgánica de los materiales mediante inmersión en solución fisiológica simulada (SBF), por técnicas ópticas, de microscopía electrónica, espectroscópicas y de difracción.

- Analizar y simular la respuesta a la corrosión de los materiales mediante ensayos electroquímicos en condiciones simuladas.
- Estudiar la hemólisis y adhesión plaquetaria sobre la aleación.
- Estudiar la capacidad antibacterial de los materiales resultantes.

3.2.3 Comparación

- Realizar un estudio de costos de mercado para la implementación de los recubrimientos en prótesis de cadera, comparadas con recubrimientos de apatita que se encuentran disponibles en el mercado.

4 Materiales y métodos

4.1 Materiales

El sustrato utilizado consistió en discos de aleación de titanio Ti-6Al-4V, con un diámetro de 15 mm y espesor de 1 mm (Torlopp, Industrie und Masstechnik GmbH, Alemania). Estos discos se prepararon mediante un proceso de pulido con papel de lija hasta llegar a una granulometría 1000 (tamaño del abrasivo de 9.6 micrones), seguido de una limpieza en un baño de ultrasonido durante 10 minutos con alcohol isopropílico.

Para los recubrimientos se utilizó quitosano de peso molecular medio con un grado de desacetilación del 75-85% (Sigma Aldrich, Alemania), gelatina tipo B (Sigma Aldrich, Alemania) comerciales, y partículas de vidrio bioactivo, sintetizadas en el laboratorio, que son una opción adecuada como fase de refuerzo en un recubrimiento compuesto para implantes metálicos, ya que imparten resistencia y capacidad de bioactividad al recubrimiento. Al ser fabricadas mediante el proceso sol-gel con una matriz flexible, se obtienen partículas mesoporosas, las cuales con su gran superficie específica permiten ser cargadas con diferentes agentes terapéuticos, lo que conduce a un posible sistema de administración de fármacos. Para este trabajo se utilizó sulfato de gentamicina (Ge) (Parapharm) en polvo, que es un antibiótico de amplio espectro.

4.2 Síntesis de partículas MBG y carga

4.2.1 Síntesis de partículas MBG

Se ha demostrado que ciertas composiciones de vidrios bioactivos producen la unión con el tejido óseo, principalmente las compuestas por SiO_2 , Na_2O , CaO y P_2O_5 en diferentes proporciones. Las partículas de vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) que se sintetizaron tienen una composición nominal de 60% SiO_2 , 30% CaO , 10% P_2O_5 en moles, y se produjeron utilizando el método sol-gel (Stöber modificado) [28], [29]. En la síntesis se utilizaron tetraetil ortosilicato [TEOS]–99% (Sigma-Aldrich, Alemania), trietil fosfato [TEP]–99% (Sigma-Aldrich, Alemania) como fuentes de sílice y fósforo, y nitrato de calcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] –98% (Sigma-Aldrich, Alemania) como fuente de calcio. Además, se empleó bromuro de cetyltrimethylammonium [CTAB]—(Merck, Alemania), etilacetato y una solución de hidróxido de amonio al 28% (Biopack, Argentina) durante la síntesis.

Los pasos llevados a cabo en la síntesis de MBG se describen a continuación:

1. Se disolvieron 1.4 g de CTAB en 66 mL de agua bidestilada bajo agitación continua durante 15 minutos.
2. Se agregaron 20 mL de acetato de etilo gota a gota a la mezcla anterior y se continuó agitando por 30 minutos.
3. Se añadieron 1.4 mL de solución de hidróxido de amonio al 28% para mantener un pH de 10.5 y se agitó por 30 minutos.
4. Se incorporaron 7.2 mL de TEOS a la mezcla y se agitó durante 30 minutos adicionales.
5. Finalmente, se añadieron las fuentes de calcio (3.84 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y fósforo (1.84 mL de TEP), y se agitó durante 4 hs.
6. La suspensión resultante se centrifugó durante 10 minutos a 8258 rpm (7700 g) (neofunge 1600-instrumentalia).
7. Se realizaron dos lavados con agua y uno con etanol (entre cada uno se centrifugó por 10 minutos).
8. Las partículas obtenidas se secaron durante la noche en estufa a 60 °C
9. Finalmente, se calcinaron a 700 °C durante 3 horas, con una velocidad de calentamiento de 2 °C/min (Horno Indef 332).

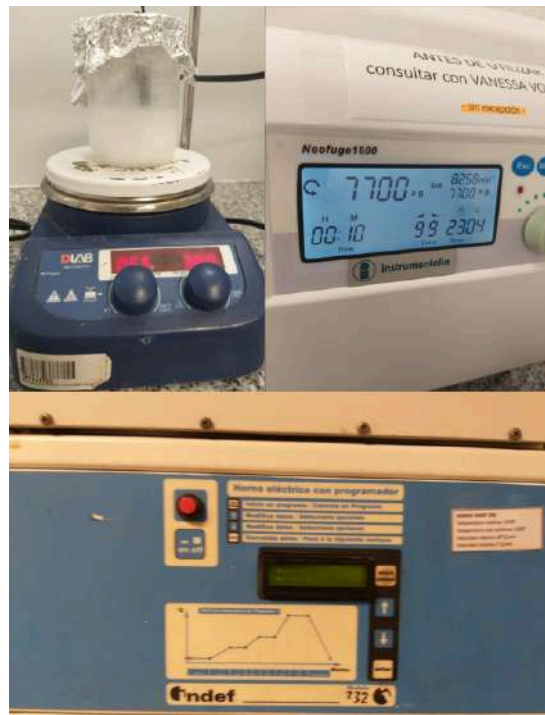


Figura 11. Parte del proceso de síntesis de partículas.

4.2.2 Carga de partículas MBG

Se llevó a cabo la carga de las partículas asumiendo que la absorción de gentamicina por las partículas mesoporosas es del 60% aproximadamente, y que posteriormente la liberación ronda en un 75% [29]. Los siguientes pasos describen el proceso:

1. Se preparó una solución de etanol 99% con 50 µg/mL de gentamicina.
2. Se sumergieron 0.5 g de partículas de MBG en 100 mL de solución durante 6 horas bajo agitación continua.
3. Luego, se centrifugaron a 4800 rpm durante 10 minutos.
4. Las partículas cargadas se secaron durante la noche a 60 °C.

4.3 Preparación de soluciones de quitosano y gelatina

Con el propósito de utilizar la técnica de deposición electroforética (EPD) se preparó un complejo polielectrolítico coloidal de quitosano [0.5 g/L] y gelatina [1 g/L] mediante los siguientes pasos:

Quitosano (100 mL de solución):

1. Se mezclaron 0.05 g de quitosano en 20 mL de agua destilada y 1 mL de ácido acético bajo agitación magnética durante 30 minutos.
2. Luego, se agregaron 79 mL de etanol (99% pureza) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente.
3. La solución resultante se almacenó en la heladera a 4 °C

Gelatina (100 mL de solución):

1. Se mezclaron 0.1 g de gelatina en 20 mL de agua destilada y 1 mL de ácido acético bajo agitación magnética durante 1 hora a 45 °C.
2. A temperatura ambiente, se incorporaron 79 mL de etanol (99% pureza) y se agitó durante 20 minutos.
3. La solución de gelatina se almacenó en la heladera a 4 °C

Al momento de preparar el complejo polielectrolítico coloidal, se mezclan las soluciones almacenadas en cantidades iguales.

4.4 Sistemas estudiados

Se compararon tres condiciones durante los ensayos:

1. Sustrato desnudo (disco de aleación de Ti6Al4V sin recubrimiento).
2. Sustrato recubierto con quitosano y gelatina, con una concentración final de 0.5 g/L y 1 g/L, respectivamente.
3. Sustrato recubierto con quitosano-gelatina en igual concentración que la condición 2, con la adición de 2 g/L de partículas de vidrio bioactivo cargadas con gentamicina.

A lo largo del trabajo se hará referencia a la condición 2 de recubrimiento con quitosano y gelatina como CG, y a la 3 como CG/MBG-Ge, del recubrimiento completo.

Todos los ensayos que se llevaron a cabo a lo largo del trabajo se realizaron por duplicado, en algunos casos hasta triplicado o cuadruplicado de ser necesario.

4.5 Preparación y optimización del recubrimiento mediante EPD

El recubrimiento se aplicó mediante el método de deposición electroforética (EPD), seleccionado debido a su capacidad para modificar fácilmente las superficies y su idoneidad para producir recubrimientos a temperatura ambiente.

Los depósitos realizados por EPD se llevaron a cabo con corriente continua, a temperatura ambiente, con una placa de acero inoxidable como contraelectrodo, y con una distancia de 10 mm entre electrodos (variable de la técnica que se mantuvo fija para todos los ensayos).

Teniendo en cuenta que la solución es otra variable de la técnica, para cada tipo de recubrimiento se variaron los potenciales aplicados entre 10-30 V y los tiempos entre 1-4 minutos, hasta definir las condiciones más favorables para cada solución.

En la Figura 12 se muestra la configuración utilizada para llevar a cabo la EPD, con el propósito de reducir y optimizar la cantidad de solución empleada en cada deposición (se buscó emplear el mínimo volumen que permita un recubrimiento total de la muestra)..



Figura 12. Configuración de la celda implementada para la deposición electroforética.

4.5.1 Procesamiento digital de imágenes

Al momento de definir los parámetros de agitación y sonicación de la solución con partículas MBG-Ge empleada para la EPD, se obtuvieron diferencias en el área de cobertura de la superficie dependiendo del tiempo de agitación y sonicación. Para esto, se contó con la ayuda del grupo ICYTE de CONICET, donde el Dr. Juan Pastore implementó un algoritmo basado en técnicas de procesamiento digital de imágenes con el objetivo de cuantificar automáticamente el área de cobertura, por las partículas de MBG-Ge, en cada muestra. Los siguientes pasos describen el proceso:

1. Se convierte la imagen obtenida por microscopía a procesar a una imagen en niveles de gris (Figura 13b), dado que la información de color no es relevante para la detección de las partículas.
2. Para cuantificar el área de cobertura, se realzan las partículas (Figura 13c) utilizando la transformada Top-Hat definida dentro de la teoría de la Morfología Matemática [30]. Esta transformada es ampliamente utilizada para extraer objetos localmente brillantes u oscuros de una imagen en escala de grises.
3. Se aplica un umbral basado en el modelo gaussiano adaptativo [31] con el objetivo de obtener una imagen binaria con las partículas segmentadas (Figura 13d). De esta imagen es posible obtener de una manera rápida y fácil el porcentaje de área cubierta.

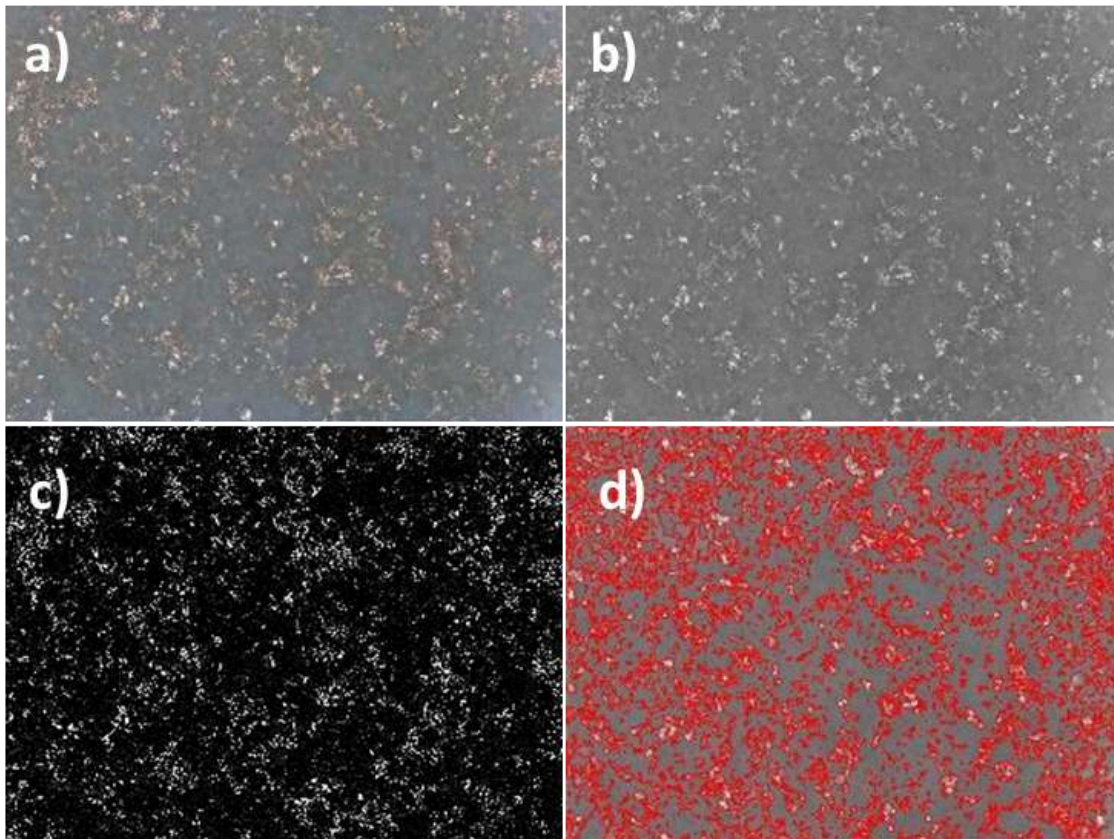


Figura 13. Resultados en cada etapa del algoritmo. (a) Imagen original. (b) Imagen en niveles de gris. (c) Transformada Top-hat por apertura. (d) imagen binaria con las partículas segmentadas.

4.6 Caracterización superficial

La morfología de los depósitos generados fue analizada por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Luego, las muestras como sus componentes se estudiaron por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La hidrofiliidad de la superficie se evaluó mediante la técnica de ángulo de contacto. Por otro lado, la adhesión del recubrimiento a los sustratos de Ti6Al4V fue evaluada mediante el ensayo cualitativo normalizado de “Tape test” (ASTM 3362) y también se analizó la rugosidad de la superficie.

4.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se implementó esta técnica para evaluar la superficie de la muestra de Ti6Al4V pulidas, así como también para las muestras con recubrimientos con el objetivo de evaluar la integridad de los mismos y la caracterización del recubrimiento de CG/MBG-Ge.

Esta técnica también se utilizó posteriormente para evaluar la presencia de depósitos de fosfato con los ensayos *In vitro* en las muestras a diferentes tiempos de inmersión en un fluido corporal simulado, al igual que para observar el cambio en los recubrimientos.

En todos los casos estudiados, las muestras fueron previamente metalizadas y se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo Zeiss Crossbeam 350.

4.6.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se llevó a cabo un análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Nicolet 6700 FTIR, Thermo Scientific™, USA), en transmitancia (ATR-FTIR), en un intervalo de longitud de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 scans, para caracterizar los polvos de las partículas de MBG, las partículas cargadas con gentamicina, la gentamicina y las muestras de las tres condiciones tanto en el punto inicial (sin inmersión) como después de la inmersión en una solución de fluido corporal simulado (SBF, consulte la sección 4.9 Ensayos *In vitro*) a los tiempos: 1, 7 y 28 días. El rango de escaneo abarcó desde 400 hasta 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} , utilizando 32 escaneos en el espectrómetro Nicolet 6700 de Thermo Scientific (EE. UU.).

4.6.3 Ángulo de contacto

Se realizó el ensayo de ángulo de contacto para evaluar la hidrofiliidad de las tres condiciones estudiadas, una propiedad crítica que influye en la adhesión y propagación de bacterias/células en las superficies de los implantes. Este análisis se llevó a cabo utilizando el goniómetro Ramé Hart, donde se ensayaron tres muestras para cada condición con una gota de agua y otra de diiodometano (DIM) en cada una.

4.6.4 Ensayo de adhesión por cinta

Se llevó a cabo una evaluación cualitativa de la adhesión del recubrimiento al sustrato (en la jerga, mencionado como "Tape test"), siguiendo los criterios establecidos en la norma ASTM D3359-09 (Métodos de Prueba Estándar para Medir la Adhesión mediante la Prueba de Cinta), mediante la aplicación del Método B recomendado para laboratorio, para las muestras recubiertas con CG y CG/MBG-Ge.

Para el procedimiento, se creó un patrón cuadrulado con seis líneas en direcciones horizontal y vertical, con un espaciado de 1 mm entre ellas. A continuación, se aplicó un trozo de cinta adhesiva sobre el patrón y se retiró de manera rápida (ver Figura 14).

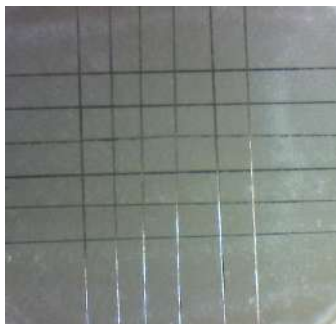


Figura 14. Cuadrícula Tape Test en muestra con CG/MBG-Ge.

La clasificación de la adhesión se llevó a cabo mediante la observación de la superficie del recubrimiento utilizando un microscopio óptico, comparando los resultados obtenidos con los criterios detallados en la norma.

4.6.5 Rugosidad

Se llevaron a cabo mediciones de rugosidad en las muestras del sustrato sin recubrimiento para evaluar la superficie posterior al pulido. Además, se midió la rugosidad en las muestras recubiertas con quitosano-gelatina y en aquellas con el recubrimiento completo. Por otra parte, se trazó una "raya" en las muestras después de aplicar el recubrimiento por EPD, es decir, antes de que se sequen por completo. El objetivo de este procedimiento era obtener una aproximación del espesor de los recubrimientos.

4.7 Ensayos *in vitro* (inmersión en SBF)

Se llevó a cabo un estudio *in vitro* de las tres condiciones estudiadas en solución fisiológica simulada (SBF, por sus siglas en inglés), a diferentes tiempos (1, 7 y 28 días), para evaluar el comportamiento de las muestras en un entorno que simula la temperatura, el pH y la concentración de los iones inorgánicos presentes en el plasma sanguíneo. Tras la inmersión, se realizaron análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM) con el propósito de identificar zonas con evidente nucleación de hidroxapatita carbonatada (HCA), considerado como un primer indicador de bioactividad en el recubrimiento.

Para poder realizar los ensayos, se utilizó la norma ISO/FDIS 23317 para la síntesis de la solución y para el cálculo de los mL necesarios para la inmersión de las muestras. En base a esta norma, en la Tabla 1 se reportan las concentraciones de iones de la SBF y del plasma sanguíneo.

Iones	SBF	Plasma sanguíneo
Na ⁺	142	142
K ⁺	5	5
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.8	103
HCO ₃ ⁻	4.2	27
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

Tabla 1. Concentración de iones (10^{-3} mol) en SBF y plasma sanguíneo.

Los pasos a seguir para la síntesis de 1 Litro de SBF consistieron en:

1. En un matraz aforado colocar colocar aproximadamente 250 mL de agua destilada con 1 mL de HCl concentrado.
2. Luego, agregar en orden los siguientes reactivos (para lo cual se utilizó una balanza analítica):
 1. 8.053 g de NaCl
 2. 0.224 g de KCl
 3. 0.368 g de CaCl₂.2H₂O
 4. 0.305 g de MgCl₂.6H₂O
 5. 0.174 g de K₂HPO₄
 6. 0.353 g de NaHCO₃
 7. 6.057 g de Tis(hidoximetil)aminometano (Buffer)
3. Agregar 0.5 mL de HCl concentrado y medir el pH, continuar agregando de a gotas hasta que el pH final esté entre 7.25 y 7.35

4. Completar a 1 Litro con agua destilada.

Para la inmersión se utilizaron tubos falcon y la disposición de las muestras fue como indica la Figura 15. Luego, se colocaron en la estufa a 37°C los tiempos indicados.

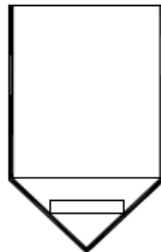


Figura 15. Disposición de las muestras para inmersión.

4.8 Ensayos electroquímicos

Se llevaron a cabo ensayos electroquímicos con el propósito de evaluar la resistencia a la corrosión en las diferentes condiciones estudiadas. Dado el buen desempeño de la aleación Ti-6Al-4V en entornos intracorpóreos, el objetivo principal fue asegurar que la adición de un recubrimiento no comprometa esta característica del sustrato desnudo. Se realizaron evaluaciones en tres momentos distintos: al inicio (tiempo 0), es decir, sin inmersión en SBF, y posteriormente después de 1 y 7 días de inmersión a 37 °C en SBF.

Los ensayos electroquímicos fueron realizados utilizando el equipo Gamry Instruments Reference 600, con pruebas aceleradas por triplicado para cada condición. La configuración de la celda consistió en un recipiente de vidrio que contenía la SBF (30 mL aproximadamente), un portamuestra con el electrodo de trabajo (con un área expuesta de 1 cm²), un electrodo de referencia de calomel saturado (SCE) y un contraelectrodo de platino, como se ilustra en la Figura 16. La temperatura se mantuvo constante a 37 °C mediante el uso de un baño termostático a lo largo de todo el ensayo.

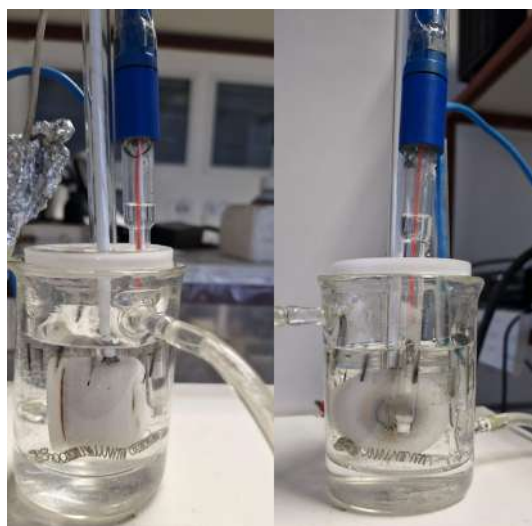


Figura 16. Celda electroquímica empleada para los ensayos.

Se inició la fase experimental con la medición del potencial de circuito abierto, realizada durante un periodo comprendido entre 2500 y 3600 segundos, con el propósito de verificar la estabilidad antes de emprender los ensayos. Posteriormente, se procedió con el ensayo de impedancia electroquímica, una técnica no destructiva, seguido por las curvas de polarización potenciodinámicas, las cuales son consideradas ensayos destructivos.

4.8.1 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Se llevó a cabo un barrido de frecuencias en el rango de 20 kHz a 0.005 Hz, implementando una modulación del potencial de ± 15 mV con respecto al potencial de circuito abierto (E_{oc}) para obtener los valores de la impedancia del sistema.

4.8.2 Curvas de polarización potenciodinámicas

Se procedió a generar la curva de polarización potenciodinámica para cada muestra. Inicialmente, se partió 0.15 V por debajo del potencial medido en circuito abierto (E_{oc}), trazando la curva catódica hasta alcanzar 1.6 V respecto al electrodo de referencia en la curva anódica. Este proceso se llevó a cabo con una velocidad de barrido de 1 mV/s. Luego, para completar la curva cíclica, se invirtió el barrido de potenciales al llegar al potencial máximo predefinido o cuando la densidad de corriente superó 1 mA.

Posteriormente, a los resultados obtenidos se les aplicó el método de extrapolación de Tafel con el objetivo de obtener los parámetros cinéticos de corrosión. Esta técnica

consiste en extender las porciones donde se observa una relación lineal entre la densidad de corriente y el potencial aplicado, la cual se corresponde con la región de polarización activa de la curva de polarización en una gráfica semilogarítmica. Esto permite determinar dos parámetros importantes: el potencial de corrosión de equilibrio (E_{corr}) y la densidad de corriente de corrosión de equilibrio (i_{corr}). E_{corr} representa el potencial en el cual la velocidad de oxidación del metal es igual a la velocidad de reducción, lo que indica un estado de equilibrio electroquímico donde la corrosión neta del material es cero. Por otro lado, i_{corr} es la corriente de corrosión de equilibrio, que indica la tasa de oxidación o reducción del metal en este punto de equilibrio.

4.9 Ensayos de hemocompatibilidad

La evaluación de la hemocompatibilidad es importante para los nuevos biomateriales que estarán en contacto con órganos irrigados, como el hueso. Sin embargo, a pesar de su importancia, no es común que esta evaluación se realice para materiales con aplicaciones en traumatología. Por ello, uno de los objetivos de este proyecto fue poner a punto ensayos de hemocompatibilidad para los materiales desarrollados en el laboratorio, sobre la base de lo que está reportado.

La prueba de hemólisis evalúa la tasa de lisis de glóbulos rojos inducida por contacto directo con biomateriales en relación a los controles positivos y negativos, y de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 10993-4, la tasa de hemólisis debe ser inferior al 5% para ser considerado hemocompatible.

Por otro lado, la adhesión plaquetaria también es un indicativo de hemocompatibilidad y bioactividad, donde se realiza una cuantificación aproximada y se evalúa la morfología y activación plaquetaria a través de imágenes de SEM.

Ambos ensayos se realizaron por triplicado para las 3 condiciones estudiadas.

4.9.1 Ensayo de hemólisis

Para el ensayo de hemólisis, en primer lugar se preparó una silicona para recubrir la cara inferior de las muestras y evitar su interacción con la sangre. Para esto se empleó silicona SYLGARD (184 Silicone Elastomer Base, marca Dow) e iniciador (SYLGARD Silicone Elastomer Curing Agent) en una relación 10:1 en peso. Se dejó curar por 24-48 hs previo al ensayo.

Luego, se llevó a cabo el protocolo estandarizado [32] y más empleado en literatura para los ensayos de hemólisis. El cual consiste en:

1. Obtención de sangre entera anticoagulada (colecta con 3.8% de citrato de sodio: 1 mL de citrato cada 9 mL de sangre entera).
2. Diluir la sangre anticoagulada en solución salina fisiológica (9 g de NaCl por cada litro de agua); 1.25 mL de solución salina cada 1 mL de sangre.
3. Preparar, por triplicado, controles positivos y negativos. Para el control negativo C-, poner en cada tubo Falcon 10 mL de solución fisiológica salina y 0.2 mL de sangre anticoagulada y diluida. Para el control positivo C+, poner en cada tubo 10 mL de agua destilada y 0.2 mL de sangre anticoagulada y diluida.
4. Colocar cada muestra en un tubo y adicionar 10 mL de solución fisiológica salina en cada uno. Acomodar todos los tubos en forma vertical en una gradilla (Son tres condiciones por triplicado, es decir, nueve tubos).
5. Llevar a estufa a 37 °C y dejar incubando todo durante 30 min.
6. Sacar los tubos de la estufa y a cada uno (con muestras y controles) agregar
7. 0.2 mL de la sangre anticoagulada y diluida, y volver a meter en estufa a 37 °C durante 60 min.
8. Sacar los tubos de la estufa. Con una pipeta automática con tip descartable resuspender 5 veces en cada Falcon la sangre (anticoagulada, diluida e incubada) para mezclar bien todos los componentes. Usar un tip distinto para cada tipo de muestra. Tomar 1.5 mL de cada muestra y guardarlo en un tubo eppendorf previamente rotulado.
9. Centrifugar los tubos a 3000 rpm durante 5 min.
10. De cada tubo aspirar cuidadosamente sólo el sobrenadante con la pipeta, procurando que no se aspiren los glóbulos sedimentados. Ya con el UV Visible (UV-160A - Shimadzu) prendido poner en la cubeta de cuarzo de referencia la solución fisiológica salina y en la otra cubeta el sobrenadante recuperado a medir (1.5 mL aprox.), procurando que no queden burbujas. Cuidar de dejar bien limpio los laterales no opacos (que será donde pasa el haz verde).
11. Leer absorbancia a 540 nm.
12. Calcular la tasa de hemólisis para cada muestra (triplicados).

Posteriormente, debido a que el primer protocolo trabaja con sangre entera y en condiciones muy diluidas, se optó por emplear un segundo protocolo, también

reportado en literatura, que emplea sólo glóbulos rojos en solución y en una concentración mayor. Los pasos llevados a cabo fueron:

1. Obtención de sangre entera anticoagulada (colecta con 3.8% de citrato de sodio: 1 mL de citrato cada 9 mL de sangre entera).
2. Centrifugación a 1500 rpm, 15 min y recupero de la fracción con glóbulos rojos (GR). (La fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) se conserva para el ensayo de adhesión de plaquetas).
3. Diluir los GR al 2% en solución fisiológica. Diluir GR al 2% en agua deionizada para usar como control positivo [33].

Incubación con las muestras:

1. En placas de 24 wells (pocillos) (diámetro 1.5 cm) colocar cada muestra por triplicado. Dejar 6 wells vacíos para los controles.
2. Colocar 2 mL de GR al 2% en cada well e incubar 3 h a 37 °C. Colocar 2 mL de GR 2% en 3 wells vacíos como control negativo y 2 mL de GR 2% en agua deionizada en 3 wells como control positivo.
3. Centrifugar 1 mL de cada well a 3000 rpm, 5 min. Recuperar el sobrenadante.
4. De cada tubo aspirar cuidadosamente sólo el sobrenadante, cuidando que no se aspiren los glóbulos sedimentados. Ya con el UV Visible prendido poner en la cubeta de cuarzo de referencia la solución fisiológica salina y en la otra cubeta el sobrenadante recuperado a medir (1.5 mL). Cuidar de dejar bien limpio los laterales no opacos (que será donde pasa el haz verde) y que no haya burbujas en la cubeta.
5. Leer absorbancia a 540 nm.
6. Calcular la tasa de hemólisis para cada muestra (triplicados). Para ambos protocolos la tasa de hemólisis se calculó según:

$$\text{Hemolisis (\%)} = (OD_s - OD_n)/(OD_p - OD_n) \times 100\% \quad (\text{Ec. 15})$$

ODs: abs. Muestra (promedio triplicados)

ODn: abs. control negativo (promedio triplicados)

ODp: abs. Control positivo (promedio triplicados).

En todos los protocolos se empleó sangre humana aportada por personas pertenecientes al grupo de trabajo.

4.9.2 Ensayo de adhesión plaquetaria

Para el ensayo de adhesión plaquetaria los pasos llevados a cabo fueron [34]:

1. En placas de 24 wells (diámetro 1.5 cm) colocar cada muestra por triplicado. Dejar 6 wells vacíos para los controles.
2. Utilizar la fracción PRP obtenida anteriormente. Colocar cuidadosamente 200 µL PRP sobre cada muestra. Incubar 1 h, 37° C.
3. Lavar las muestras con solución fisiológica, dos veces, para remover plaquetas no adheridas.
4. Fijar con glutaraldehído 2.5%, 3 h a 4° C.
5. Deshidratar en serie de alcohol: 50%, 70%, 90%, 100% alcohol, 15 min cada paso. Secar a temperatura ambiente.
6. Observar en SEM. Tomar 10 imágenes aleatoriamente de cada muestra.
7. Contar plaquetas en las imágenes. Promediar y calcular el número de plaquetas por unidad de área. Realizar un análisis cualitativo de la morfología de las plaquetas adheridas.

4.10 Ensayo de actividad antibacterial

Los ensayos de actividad antibacterial estuvieron a cargo de Ingrid E. Redersdorff y María K. Herrera Seitz, que se desempeñan en el Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), UNMDP – CONICET.

Para los ensayos de reacción a bacterias se prepararon suspensiones stock de *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) y *Escherichia coli* (Gram-negativo) en 10 mL de medio LB estéril (Luria/Miller LB es Luria Bertani o Luria Broth medium, Carl Roth, Alemania) y se cultivaron durante la noche a 37 °C con agitación. La suspensión se diluyó para alcanzar una concentración de bacterias con un valor de absorbancia inicial de 0,015 (medido a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Ultrospec (OD600)). Estos cultivos se colocaron en los pocillos de una placa de 24 wells, y se incubaron a 37 °C con agitación en presencia o no de los materiales recubiertos. A los tiempos indicados (6, 24 y 48 horas), se extrajeron alícuotas de la suspensión bacteriana de cada pozo y se midió el crecimiento bacteriano (OD600 nm). La viabilidad relativa de las bacterias se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad bacterias (\%)} = \frac{OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{control}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 16})$$

OD muestra: abs. muestra.

OD control: abs.control.

5 Resultados y discusión

5.1 Determinación de variables para la técnica de EPD

Se logró con éxito la deposición de los recubrimientos compuestos mediante la técnica de EPD. Después de varios intentos y análisis ópticos (inspección visual a ojo desnudo y microscopía óptica 5X o 10X), se determinaron los parámetros que condujeron a la aplicación óptima de los recubrimientos. En la Figura 17 se pueden observar a modo de ejemplo, varios intentos realizados tanto para los recubrimientos de CG/MBG-Ge (columna de la izquierda, 2 minutos) como los de CG (columnas correspondientes a 3 y 4 minutos). Finalmente, se estableció que la aplicación de una corriente continua de 30 V durante 2 minutos fue la más efectiva para las muestras que contenían quitosano, gelatina y partículas de MBG-Ge cargadas. En el caso de las muestras recubiertas con quitosano y gelatina tipo B, pero sin la adición de partículas de MBG-Ge, el proceso se llevó a cabo de manera similar (con 30 V), pero con una duración de 4 minutos en lugar de 2 minutos en el proceso de EPD.

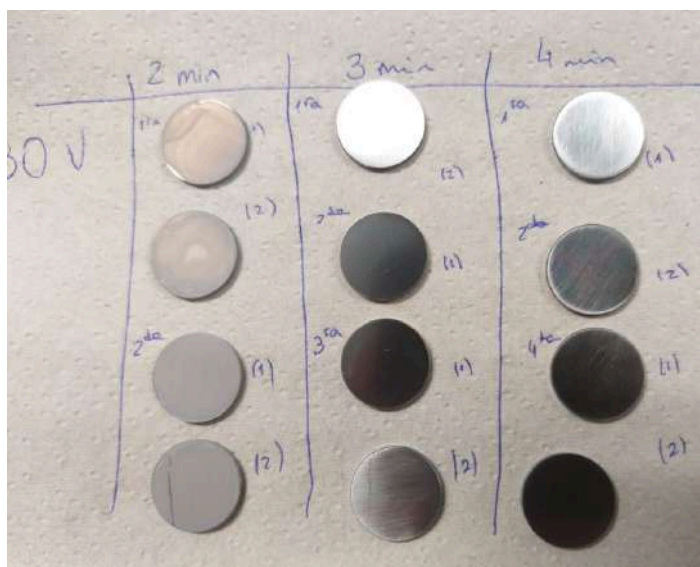


Figura 17. Muestras obtenidas en los ensayos llevados a cabo para definir parámetros de EPD con CG/MBG-Ge (2 min) y CG (3 y 4 min).

5.1.1 Procesamiento digital de imágenes

Como se mencionó anteriormente, se implementó un procesamiento digital de imágenes para definir los tiempos de agitación y sonicación previos a la EPD para los recubrimientos de CG/MBG-Ge, con el objetivo de maximizar la deposición de

partículas en los sustratos. Para ello se analizaron a razón de 6 imágenes obtenidas por microscopía óptica a 20 X de al menos 4 muestras para cada situación.

El porcentaje de área cubierta, como se muestra en la Figura 18, está directamente vinculado con la cantidad de partículas de MBG-Ge depositadas en la superficie. En este trabajo, se emplearon dos intervalos de agitación y sonicación diferentes. La condición A consistió en 30 minutos de agitación seguidos de 20 minutos de sonicación, mientras que la condición B implicó 90 minutos de agitación y 40 minutos de sonicación. En este contexto, al prolongar el procedimiento de agitación y sonicación antes del recubrimiento, se observa un incremento del 30% en la cantidad de partículas depositadas en la superficie. Este método sencillo y eficaz se utiliza para evaluar cualitativamente la eficiencia de los parámetros de agitación y deposición en el proceso de EPD.

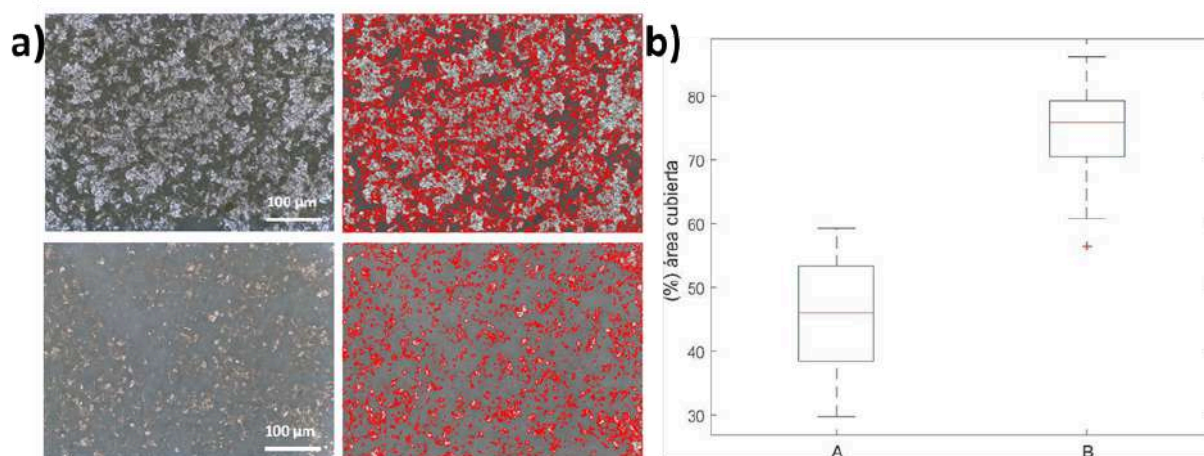


Figura 18. a) Imágenes ópticas de recubrimientos CG/MBG-Ge y su procesamiento digital, para dos condiciones de agitación: A (30 min agitación y 20 min sonicado), y B (90 min agitación y 40 min sonicado); b) Gráfico Box-Plot para resumir y comparar ambos conjuntos de datos.

El método de procesamiento de imágenes propuesto en este estudio posibilita la discretización y cuantificación del área cubierta por las partículas de MBG-Ge en ambos casos, permitiendo así una optimización del proceso para obtener recubrimientos de mayor calidad. Al analizar el gráfico Box-Plot, se puede rápidamente inferir que, en promedio, las muestras obtenidas con el método de mayor tiempo de sonicación generan recubrimientos con una mayor densidad de partículas en la superficie, indicando una mejora significativa en el proceso. Este hallazgo destaca la importancia de la duración adecuada de la agitación y sonicación para optimizar la eficiencia del recubrimiento por EPD.

Finalmente, previo a la deposición, la solución de CG/MBG-Ge se agitó durante 90 minutos y se sonicó 40 minutos. En cambio, la solución de CG se agitó durante 30 minutos y fue sonicada por 20 minutos.

5.2 Caracterización superficial

En la Figura 19 (a) y (b), se presentan los aspectos morfológicos de los recubrimientos CG y CG/MBG-Ge, obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los recubrimientos que carecen de partículas de vidrio bioactivo exhibieron una superficie lisa que cubre los defectos del sustrato. En contraste, el sistema CG/MBG-Ge reveló un aspecto de depósito homogéneo pero no continuo, con las partículas distribuídas uniformemente en la matriz y presentando un diámetro aproximado de 280 nm con morfología ovoide.

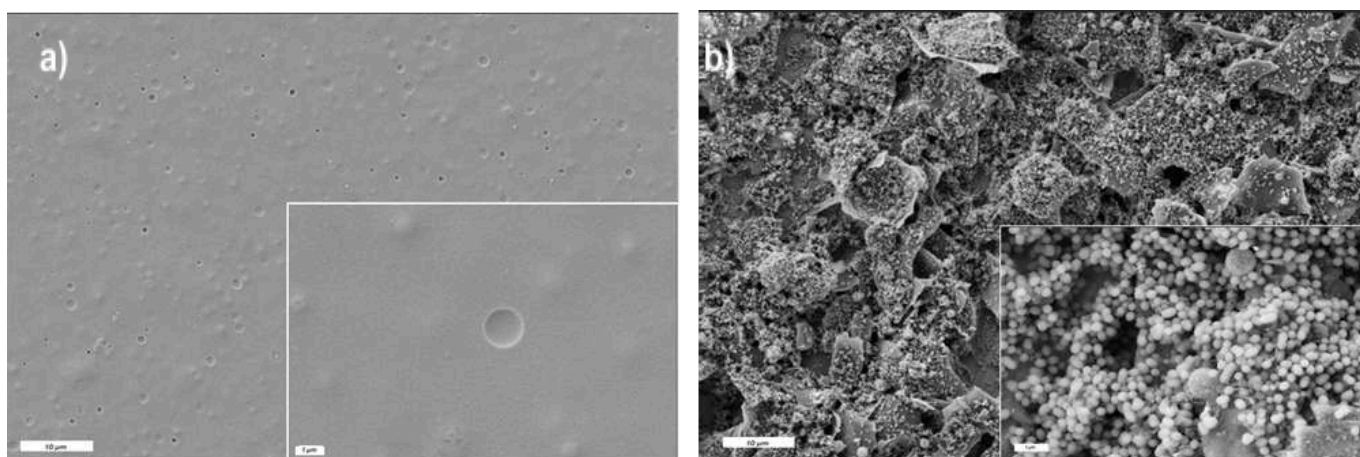


Figura 19. Imágenes obtenidas por SEM de los recubrimientos a distintos aumentos: a) CG y b) CG/MBG-Ge.

5.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se llevó a cabo la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada para las tres condiciones ensayadas, así como para los polvos de gentamicina, partículas de vidrio bioactivo sintetizadas (MBG) y partículas cargadas con gentamicina (MBG-Ge). La Figura 20 presenta los espectros resultantes, y a partir de su análisis, se destaca la imposibilidad de detectar la gentamicina mediante esta técnica debido a la superposición de sus picos principales con los del recubrimiento de quitosano/gelatina (CG) y las partículas de MBG (picos alrededor de 1600 y 1050 cm^{-1}). La identificación y liberación de gentamicina de las partículas se evaluarán indirectamente mediante ensayos antibacterianos en fases posteriores.

En cuanto al sistema CG/MBG-Ge, los análisis FTIR revelaron algunas de las bandas más intensas correspondientes a MBG y los componentes de quitosano/gelatina/gentamicina. Los picos presentes a 1540 y 1630 cm^{-1} son relacionados mayoritariamente con las vibraciones C-O y N-H de la gelatina y el quitosano, aunque también se encuentran en compuestos nitrogenados como la gentamicina [35], [36]. Sin embargo, estas últimas se observaron con una intensidad considerablemente menor debido a que al estar presente en una capa delgada, su presencia en la muestra es menor. Se puede observar a 1056 cm^{-1} y 450 cm^{-1} , las vibraciones de estiramiento y las vibraciones de flexión del Si-O-Si, respectivamente [37]. Además, el estiramiento simétrico de Si-O está presente en 794 cm^{-1} y podría indicarse un hombro en 950 cm^{-1} relacionado con el modo de vibración de Si-O-Ca [38].

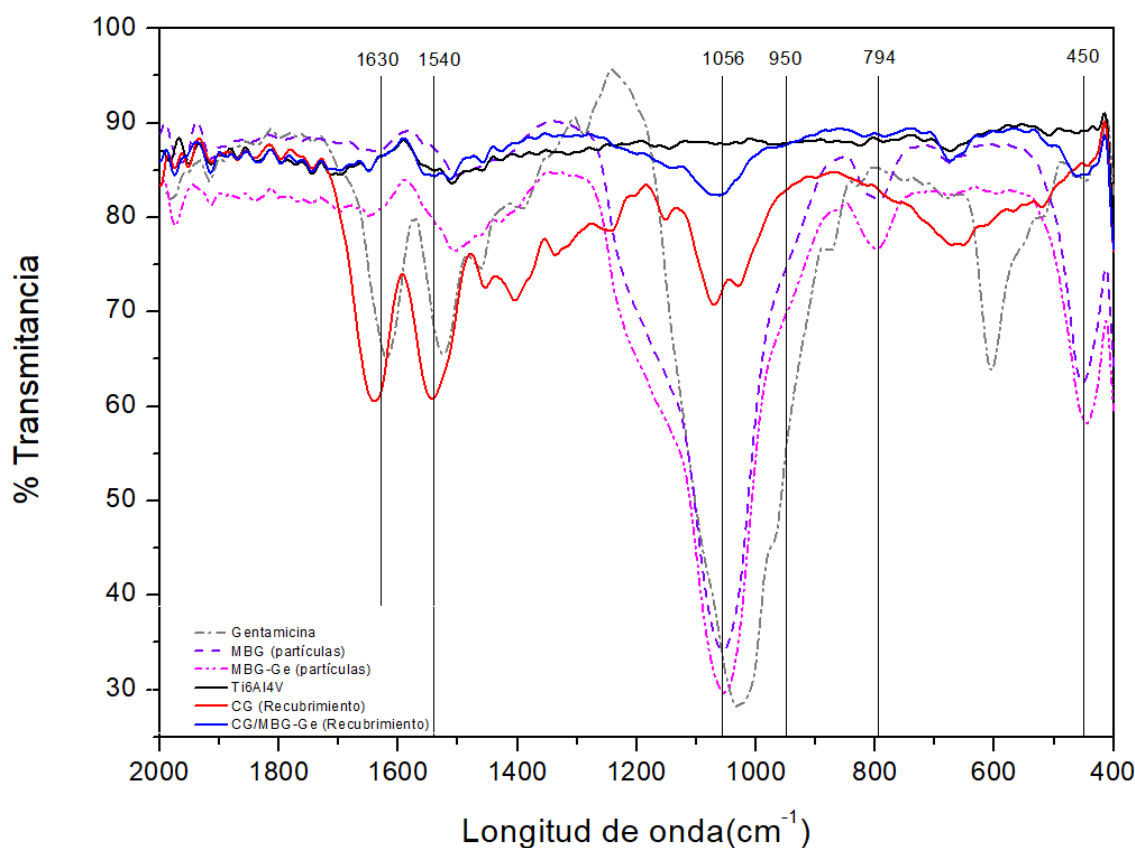


Figura 20. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para los componentes de los recubrimientos y los tres sistemas estudiados.

5.2.2 Ángulo de contacto

Se evaluó la mojabilidad de las tres condiciones estudiadas mediante la técnica de ángulo de contacto, como se observa en la Figura 21. En el caso de las muestras con CG/MBG-Ge, al depositar una gota, esta se dispersó instantáneamente, lo cual se

consideró como un ángulo de contacto de 0°, indicando una superficie altamente hidrofílica, debido a que se considera que una superficie es hidrofílica o mojable cuando el ángulo de contacto es inferior a 90°.

Los resultados obtenidos para las otras muestras se resumen en la Tabla 2, para el sustrato de aleación de titanio, y para los recubrimientos CG sin y con MBG. Aunque se han registrado los datos tanto para DIM como para agua, cabe destacar que los valores de mojabilidad en agua son de especial relevancia para aplicaciones en entornos biológicos.

Muestra	Agua [°]	DIM [°]
Ti6Al4V	56 ± 2	38 ± 2
CG	55 ± 3	45 ± 1
CG/MBG-Ge	0	0

Tabla 2. Resultados obtenidos en el ensayo de ángulo de contacto.

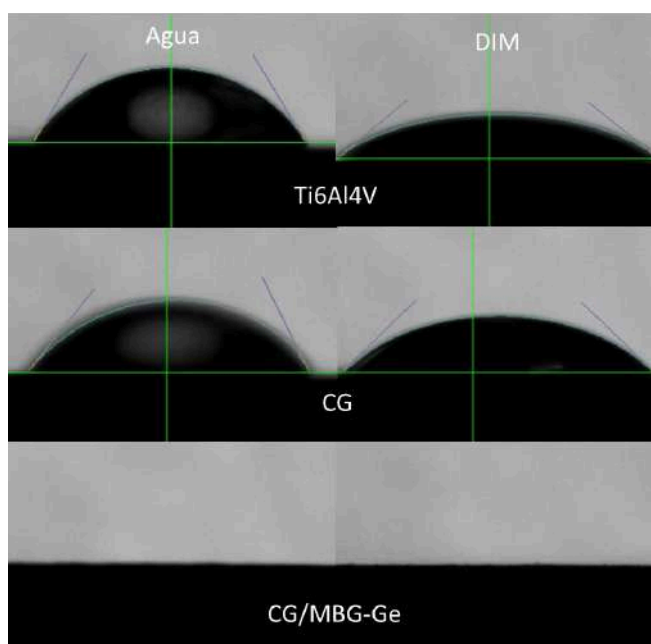


Figura 21. Medición de ángulo de contacto para las muestras de Ti6Al4V, CG y CG/MBG-Ge con agua destilada y DIM.

La hidrofiliidad de la superficie es de gran importancia para la adhesión celular y de proteínas, ya que las superficies hidrofílicas favorecen la interacción con el entorno biológico [39]. Una superficie hidrofílica facilita la adsorción de moléculas biológicas,

promoviendo la adherencia celular y mejorando la respuesta biocompatible de los implantes. Además, la medición del ángulo de contacto proporciona información valiosa sobre la capacidad de la superficie para interactuar con fluidos biológicos, lo que es esencial para comprender la respuesta del material implantado en un entorno fisiológico.

A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que los valores de ángulo de contacto entre el sustrato desnudo y el recubierto con CG son muy similares, a diferencia de las muestras con CG/MBG-Ge donde hay un marcado aumento de la hidrofiliidad. Las partículas bioactivas presentes en este recubrimiento pueden ser las responsables de este aumento, acorde a lo reportado por otras experiencias [40], [41]. Esta propiedad y la exposición de partículas mesoporosas al entorno acuoso una vez implantadas promoverían la disolución del recubrimiento y la consecuente liberación de gentamicina.

5.2.3 Ensayo de adhesión por cinta

Por microscopía óptica se pudo observar los resultados del ensayo de Tape test (Figura 22) y de acuerdo a lo establecido por la norma ASTM D3359-09 se clasificó a los recubrimientos de CG como “4B” y CG/MBG-Ge como “5B”, donde los bordes de los cortes son completamente lisos; ninguno de los cuadrados de la celda se desprende. Es decir, presentan una excelente adherencia al sustrato, donde menos del 5% del recubrimiento se desprendió con la cinta para CG y el 0% para el recubrimiento de CG/MBG-Ge.

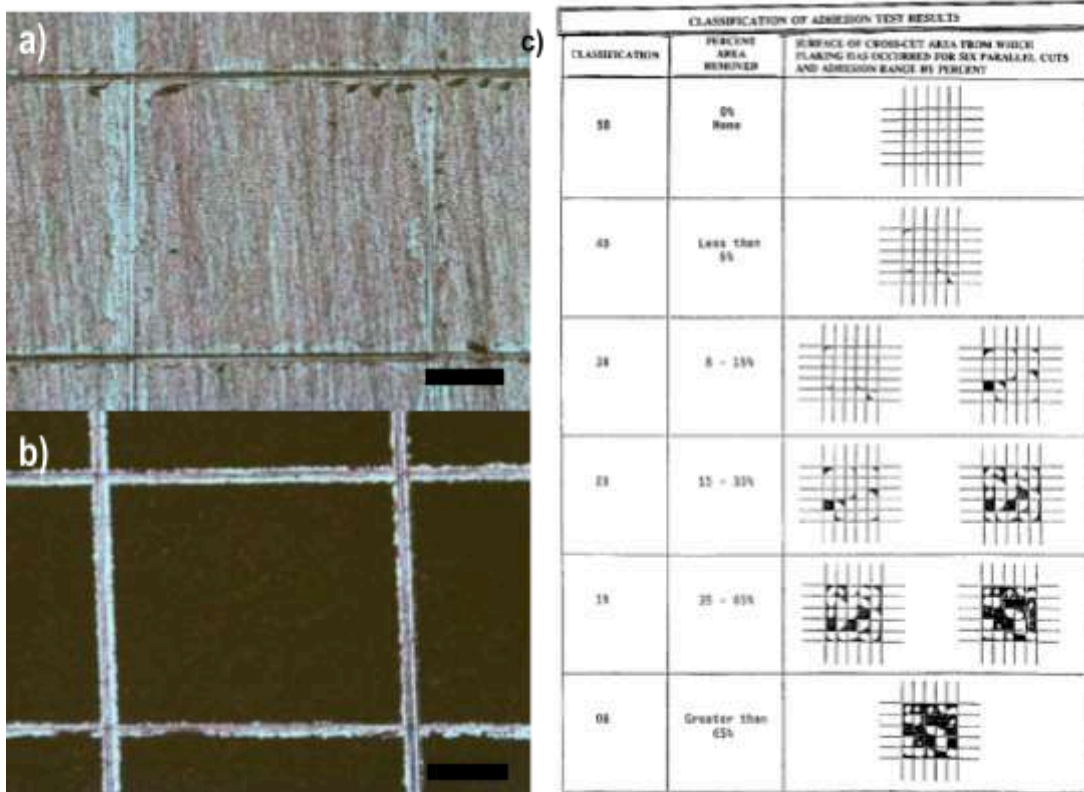


Figura 22. a y b) Imágenes ópticas de los recubrimientos de CG y CG/MBG-Ge luego del ensayo. C) Tabla de clasificación de la norma ASTM D3359-09 [25].

5.2.4 Rugosidad

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos de los parámetros Ra y Rz para las tres muestras estudiadas. En el caso del sustrato desnudo, la rugosidad se corresponde con los picos y valles del pulido.

	Ti6Al4V	CG	CG/MBG-Ge
Ra [μm]	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.90 ± 0.12
Rz [μm]	0.48 ± 0.05	0.70 ± 0.05	5.42 ± 1.21

Tabla 3. Parámetros Ra y Rz de las muestras.

Como se puede observar, la rugosidad de la muestra CG/MBG-Ge aumenta. Este incremento puede atribuirse a la forma inhomogénea y facetada que adoptaron los depósitos al aplicarse sobre el sustrato mediante la técnica de EPD, por la incorporación de las partículas mesoporosas.

Mediante la medida de la profundidad de la “raya” generada en los recubrimientos, se puede estimar el espesor de las capas. Para las de CG el valor está en 1.5 micrones aproximadamente, y en 2 micrones para las capas de CG/MBG-Ge. En la Figura 23 se ve la estimación del espesor para esta última capa, y puede verse el efecto de la inhomogeneidad y alto Rz de dicha capa.

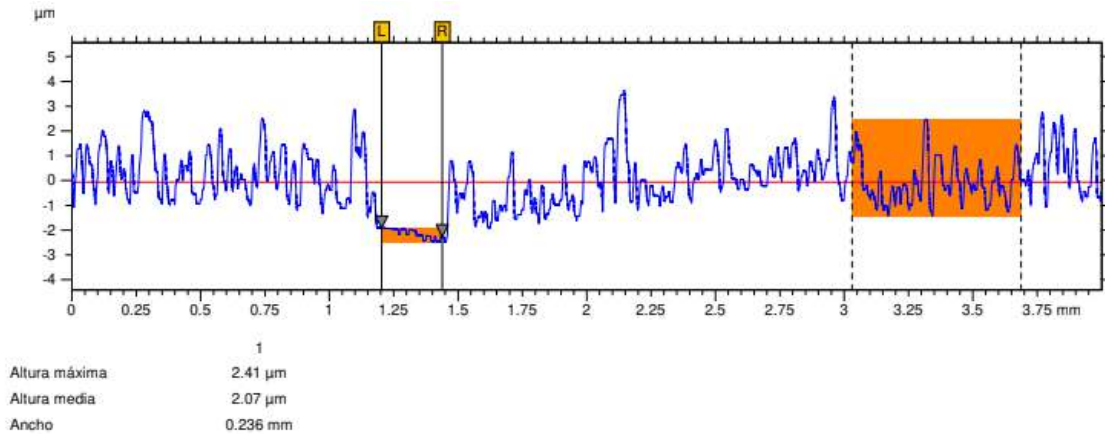


Figura 23. Estimación del espesor de la capa de CG/MBG-Ge

5.3 Ensayos *in vitro* (inmersión en SBF)

5.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) tras 1, 7 y 28 días de inmersión en un fluido fisiológico simulado (SBF), con el propósito de evaluar la respuesta de las muestras: sustrato desnudo Ti6Al4V, recubrimiento de quitosano/gelatina (CG), y recubrimiento compuesto CG/MBG-Ge. Las imágenes correspondientes a cada periodo de inmersión, así como el estado inicial (tiempo 0) para cada muestra, se presentan en figuras sucesivas.

En la Figura 24, se observan las imágenes obtenidas para la aleación de Ti6Al4V. En los cuatro casos resaltan las marcas de pulido del sustrato, siendo más notorio en las Figuras 24a y 24c. En las Figuras 24b y 24d, se observan depósitos atribuibles al cloruro de sodio del SBF en los periodos de 1 y 28 días, lo que puede atribuirse a que estas muestras no fueron lavadas suavemente al ser retiradas de la solución, previo a la toma de imágenes. Es crucial señalar que no se logró visualizar la formación de hidroxiapatita en ninguna de las imágenes analizadas.

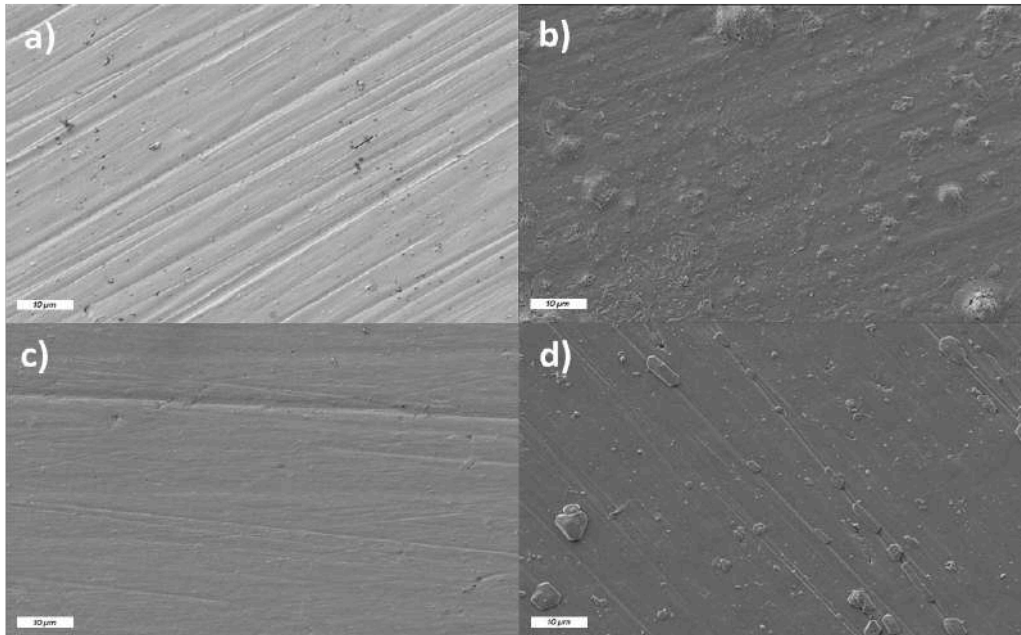


Figura 24. Fotografías SEM de la aleación de Ti6Al4V al tiempo 0 (a), 1 día (b), 7 días (c) y 28 días (d) luego de la inmersión en SBF.

En la Figura 25, se observan las imágenes de los 4 tiempos correspondientes del recubrimiento de CG. La comparación entre las imágenes 25a y 25b, correspondientes a 0 y 1 día respectivamente, revela una notable pérdida de integridad del recubrimiento, y esta disminución continúa a los 7 días. Al igual que en el sustrato Ti6Al4V, no se observaron depósitos de hidroxiapatita, y los depósitos que se denotan a los días 1 y 28 (25b y 25d) se atribuyen al cloruro de sodio del SBF por la omisión del lavado. A su vez, en la imagen 25d se observa una pérdida total del recubrimiento.

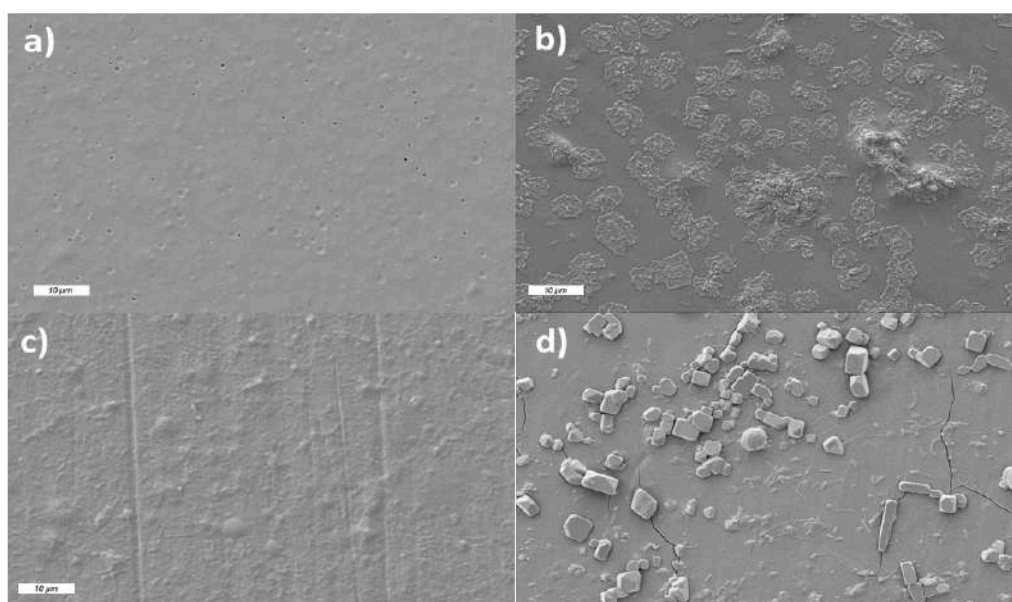


Figura 25. Fotografías SEM del recubrimiento CG al tiempo 0 (a), 1 día (b), 7 días (c) y 28 días (d) luego de la inmersión en SBF.

En el caso del recubrimiento CG/MBG-Ge, observable en la Figura 26, se evidencia una pérdida de integridad del recubrimiento menos pronunciada entre los periodos de 0, 1 y 7 días en comparación con el de CG. A mayores aumentos, se pudo distinguir la persistencia de partículas bioactivas. Por otro lado, al igual que en las otras muestras anteriores, los depósitos observados en los periodos de 1 y 28 días se relacionan con cristales de cloruro de sodio provenientes de la solución de inmersión. Esto se debe al inadecuado protocolo de limpieza de las muestras, previa a la observación por microscopía. Tampoco se observa la clara presencia de estructuras o cristales de hidroxiapatita, cuya morfología es de depósitos globulares, compuestos por agujas o acículas cristalinas.

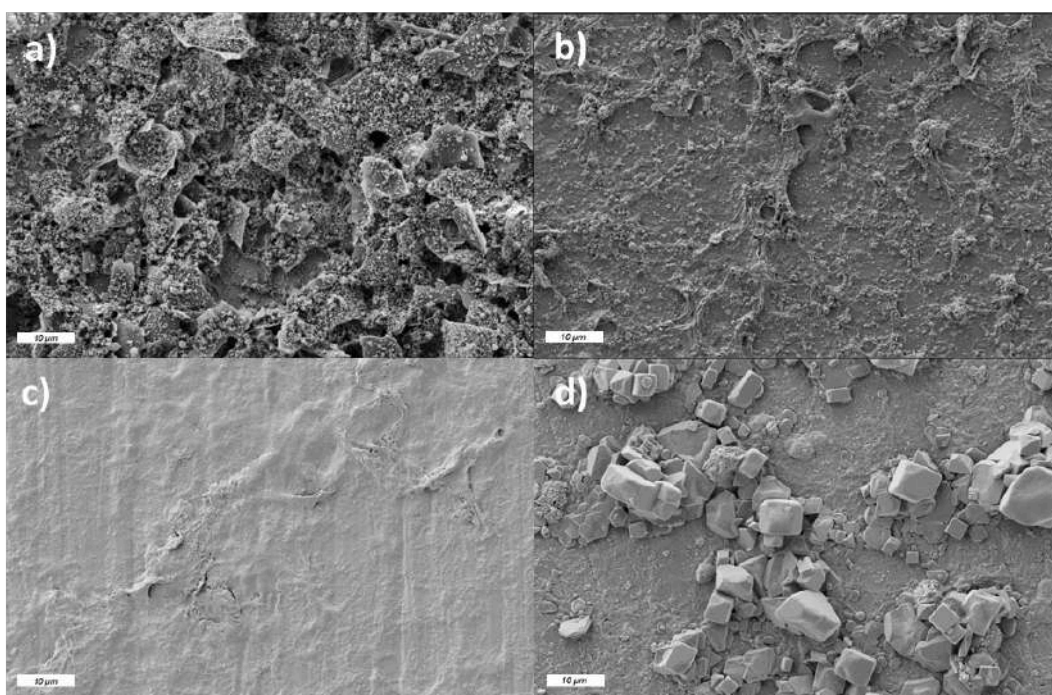


Figura 26. Fotografías SEM del recubrimiento CG/MBG-Ge al tiempo 0 (a), 1 día (b), 7 días (c) y 28 días (d) luego de la inmersión en SBF.

Es esencial recalcar que la no visualización de depósitos de fosfato por esta técnica no implica su ausencia. Para abordar esta limitación, se complementará con el análisis mediante la técnica de FTIR, y se llevarán a cabo ensayos electroquímicos para examinar cómo la degradación de los recubrimientos afecta al poder de cobertura de la aleación y su resistencia a la corrosión.

5.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para evaluar la degradación en el tiempo de los recubrimientos estudiados, así como también su bioactividad, se realizaron ensayos de inmersión a temperatura

corporal (37 °C) y en fluido simulado (SBF). Luego de 1, 7 y 28 días de inmersión, las superficies resultantes fueron evaluadas cualitativamente por FTIR para determinar la presencia remanente de capa, partículas y posibles depósitos que podrían haberse generado.

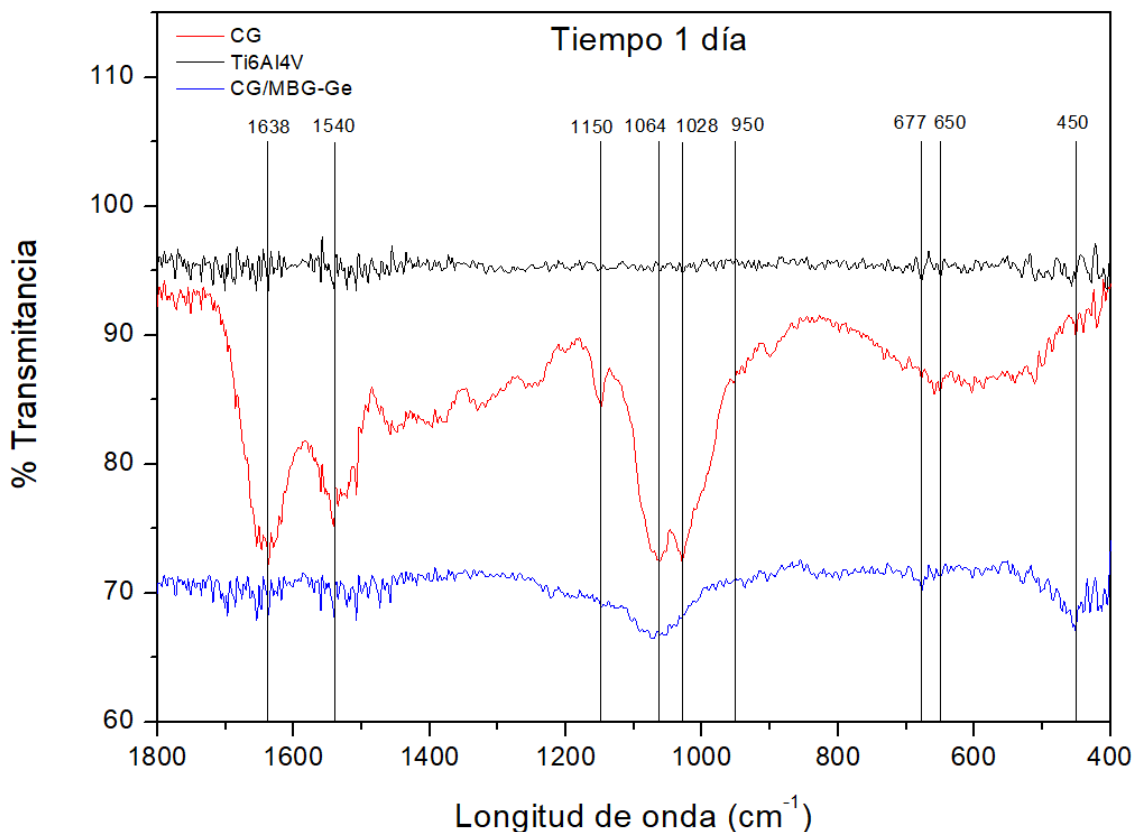


Figura 27. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los tres sistemas estudiados luego de 1 día de inmersión.

En la Figura 27 puede observarse la presencia de recubrimiento de quitosano y gelatina en la muestra CG, luego de 1 día de inmersión. Las muestras conteniendo partículas MBG-Ge no muestran la significativa presencia de las bandas correspondientes a las amidas y aminas de los componentes quitosano y gelatina de manera marcada, debido a su deposición en escamas y posible disolución, como también la menor cantidad de las mismas. Aun así una banda alrededor de 1064 cm⁻¹ y otra en 450 cm⁻¹ se presentan indicando la presencia de las partículas conteniendo uniones Si-O-Si.

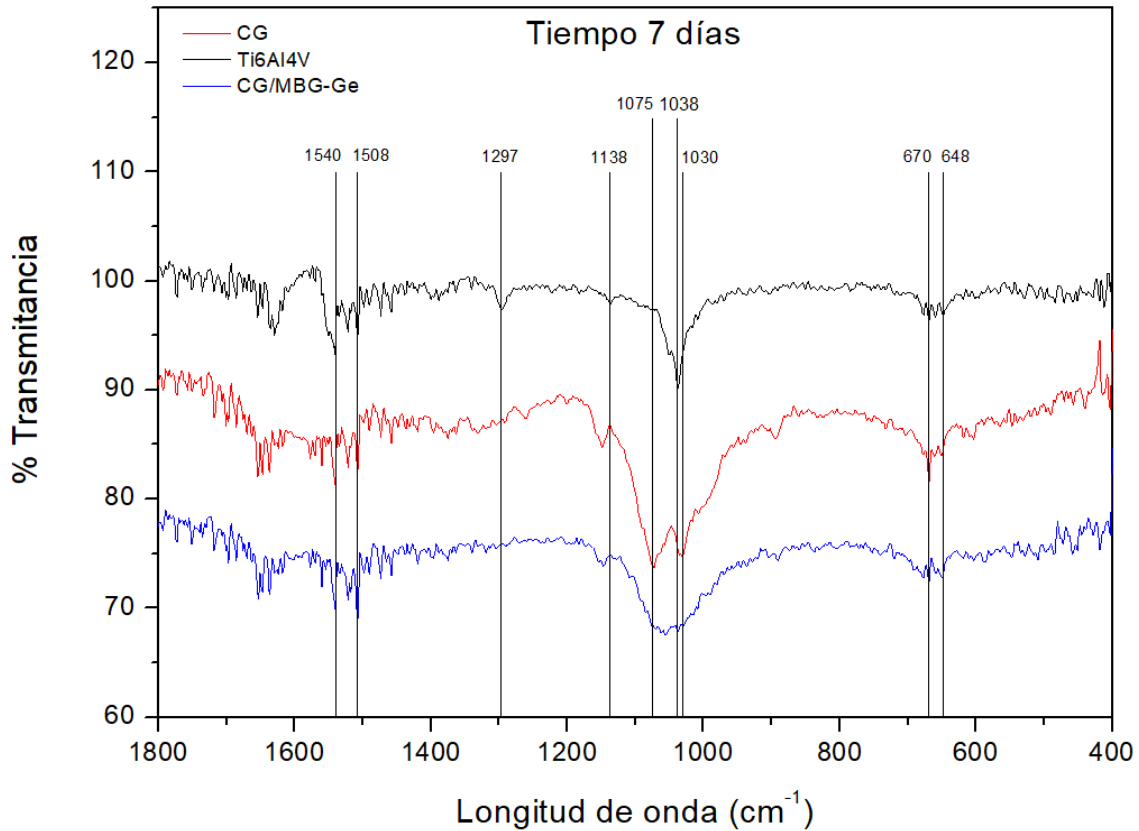


Figura 28. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los tres sistemas estudiados luego de 7 días de inmersión.

Después de 7 días de inmersión de las muestras en solución fisiológica simulada aún se ven vestigios de las MBG y de restos de quitosano y gelatina, marcado por la presencia de picos alrededor de 1540 y de 1070 cm^{-1} . Pero lo que comienza a marcarse es, al igual que en las muestras de material sin recubrir, son bandas en 1297, 1038, 670 y 648 cm^{-1} , relacionadas con vibraciones de grupos PO_3^{-4} , HPO_3 y vibraciones en uniones Ca-P, como se observa en la Figura 28 [42]. Lo que hay que destacar es la presencia de las mismas incluso en la aleación de titanio sin recubrimiento, lo que indica la bioactividad ya probada del material de osteosíntesis. Luego de 28 días de inmersión, los tres sistemas ya se encuentran en igual condiciones, demostrando que se ha perdido la capa y se ha generado una pequeña capa de fosfatos (capa bioactiva) sobre las tres superficies (ver Figura 29).

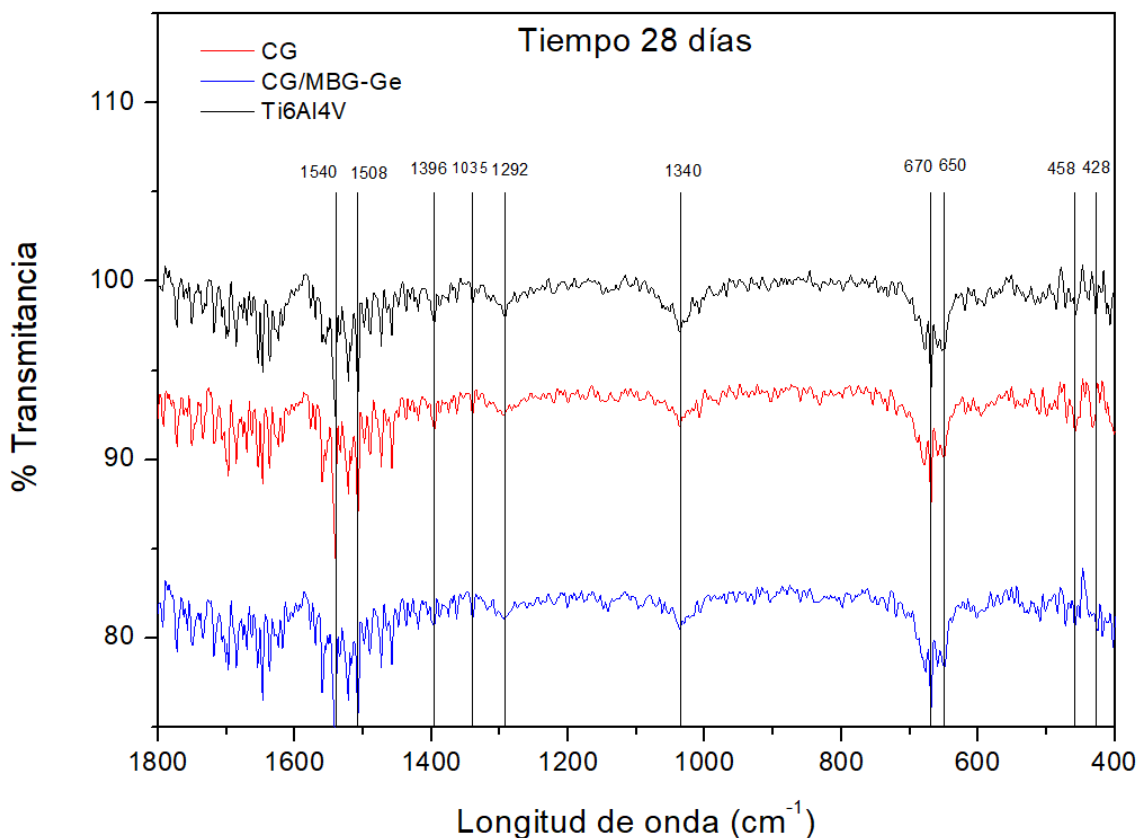


Figura 29. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de los tres sistemas estudiados luego de 28 días de inmersión.

5.4 Ensayos electroquímicos

Para evaluar la degradación de los recubrimientos y la deposición de especies sobre la superficie, otra serie de técnicas *in vitro* es la de los ensayos electroquímicos, donde mediante la aplicación de una corriente o un potencial podemos medir la respuesta del sistema en un cierto medio, al flujo de corriente. En nuestro caso resulta indicado para evaluar la reactividad de las capas después de 1 y 7 días de inmersión en SBF, ya que a tiempos más largos como 28 días, la capa de CG o CG/MBG-Ge se encuentra degradada y se hallan depósitos de fosfatos al igual que lo que sucede con el sustrato desnudo en inmersión, como se pudo observar en las imágenes de SEM y FTIR anteriores. Cabe aclarar que en este sistema no se espera que el recubrimiento sea protector a la corrosión, ya que la aleación de Ti6Al4V ya posee capacidad anticorrosiva frente a los fluidos fisiológicos [43].

5.4.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

Mediante la Espectroscopía de Impedancia electroquímica se puede monitorear el comportamiento del sistema, con una muy pequeña perturbación del mismo, es decir, sin tener que sacrificar la muestra ni interferir en la superficie de la misma.

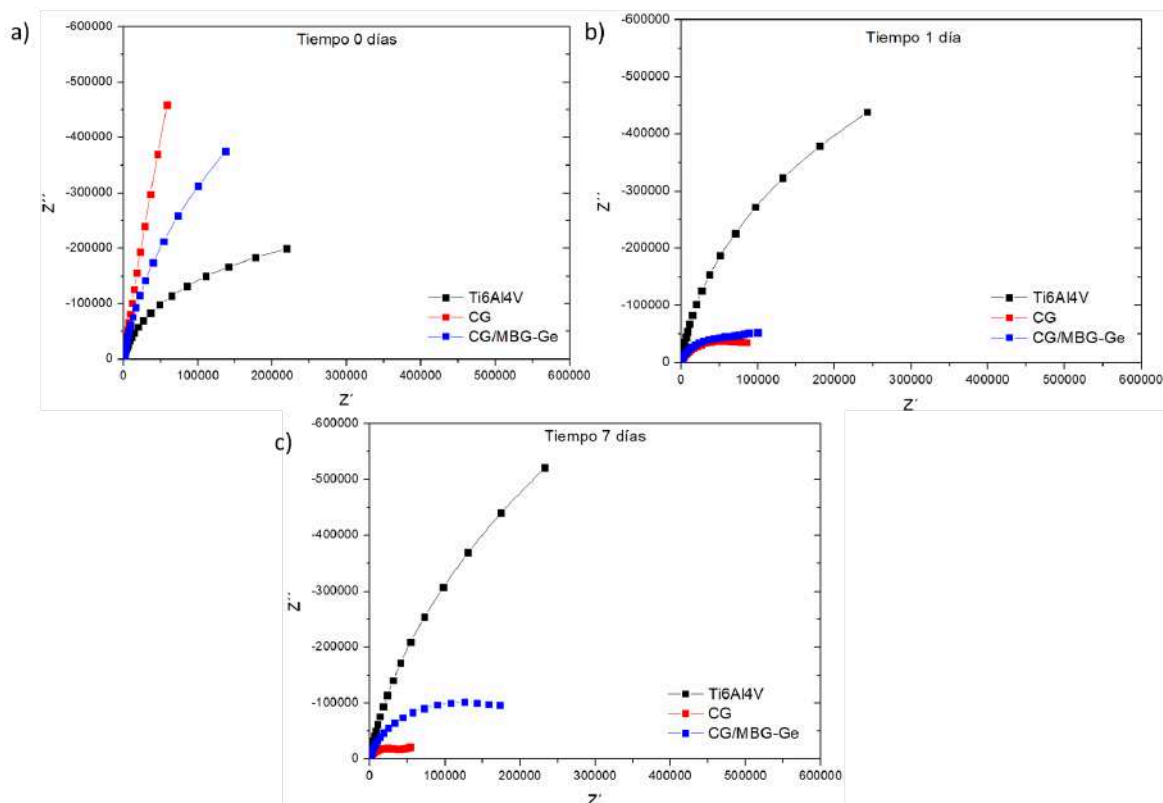


Figura 30. Gráficos de Nyquist para los sistemas Ti6Al4V, CG y CG/MBG-Ge: a) tiempo 0, b) tiempo 1 día y c) tiempo 7 días de inmersión en SBF.

La Figura 30 muestra los gráficos de Nyquist para los tres sistemas estudiados sin inmersión previa en SBF, y luego de 1 y 7 días de inmersión en la solución fisiológica simulada a 37 °C. Cualitativamente puede verse cómo se comportan los diferentes sistemas para tiempos iniciales: el recubrimiento CG, que se observó por SEM íntegro y continuo, presentaría la mayor impedancia total del sistema, así como la resistencia total, la cual podría estimarse prolongando el semi-círculo correspondiente hasta que Z_{imag} sea cero (Figura 30 a)). Y cuando se incorporan las partículas a la capa, la impedancia disminuye, pero sigue siendo mayor que la del implante desnudo. Es claro por la disminución en la impedancia y resistencia del sistema, que la capa de CG/MBG-Ge es un depósito irregular que permite el paso de fluido hacia el sustrato metálico. Por el contrario, luego de la inmersión en SBF por 1 y 7 días, tanto los recubrimientos CG como CG/MBG-Ge se degradan paulatinamente, con una resistencia total del sistema menor. Esto se supone que se debe al bloqueo de la

superficie metálica a ser pasivada por la presencia del recubrimiento [44], impidiendo parcialmente el ingreso de solución. A medida que las capas se degradan y la solución entra en contacto con el metal, la aleación de Ti6Al4V puede pasivarse en SBF e ir adquiriendo su comportamiento pasivo. Luego de 7 días de inmersión (Figura 30 c)), el depósito de CG/MBG-Ge mejora su comportamiento a la corrosión con respecto al sistema CG y con respecto a tiempos menores de inmersión, ayudado por los depósitos de fosfatos que se dan en la superficie.

5.4.2 Curvas de polarización potenciodinámicas

En la Figura 31 se presentan las curvas de polarización potenciodinámicas para las muestras a 0, 1 y 7 días de inmersión en SBF, y en la Tabla 4 se presenta la comparación de los parámetros electroquímicos más significativos de cada una.

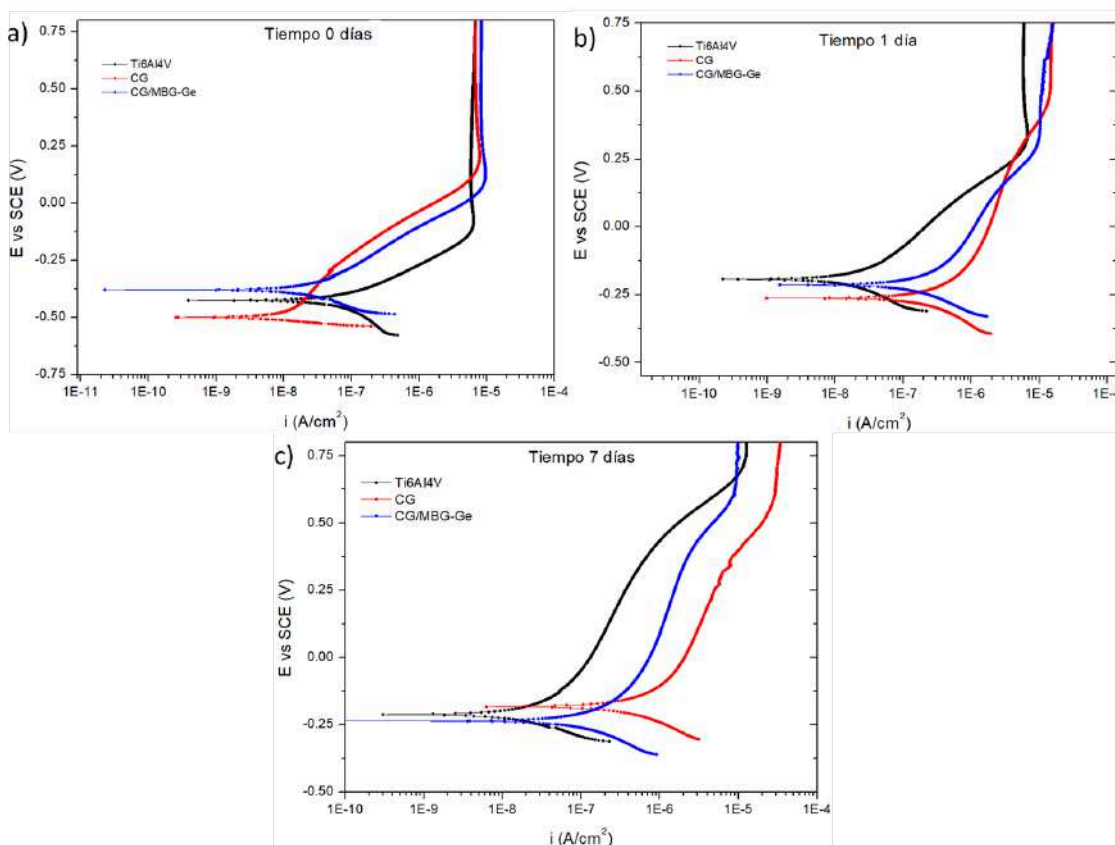


Figura 31. Curvas de polarización potenciodinámicas para los sistemas Ti6Al4V, CG y CG/MBG-Ge a tiempo 0 y luego de 1 y 7 días de inmersión en SBF.

A tiempo inicial, sin inmersión, la capa de CG presenta un comportamiento protector, y donde no se puede ver el efecto del sustrato ya que está perfectamente cubierto. En el caso del depósito de CG/MBG-Ge, el mismo tiene un pequeño carácter protector, pero puede verse claramente el comportamiento activo del sustrato, por la

pendiente de la rama anódica. En el caso de los tiempos iniciales, tanto el recubrimiento CG como el depósito con MBG-Ge las ramas anódicas se ven muy afectadas, lo que demostraría que hay cargas en la superficie activas y que se estaría impidiendo la reducción del oxígeno. A medida que las capas se van degradando, al 1 y 7 días de inmersión, ya la rama catódica es igual en todos los casos al metal desnudo, mostrando que ya estaría sucediendo el mismo proceso de reducción en todos los casos. Igualmente puede observarse que, al haber más superficie “descubierta” al degradarse el recubrimiento, la superficie de la aleación comienza a pasivarse, asimilándose con el tiempo al material desnudo pasivado.

	Tiempo de inmersión en SBF	E_{corr} (V)	i_{corr} (A/cm²)
Ti6Al4V	0	-0.44	8.72 x 10 ⁻⁸
	1d	-0.21	2.1 x 10 ⁻⁸
	7d	-0.22	1.45 x 10 ⁻⁸
CG	0d	-0.51	1.13 x 10 ⁻⁸
	1d	-0.25	1.74 x 10 ⁻⁷
	7d	-0.18	3.43 x 10 ⁻⁷
CG/MBG-Ge	0d	-0.38	2.16 x 10 ⁻⁸
	1d	-0.22	1.4 x 10 ⁻⁷
	7d	-0.23	6.4 x 10 ⁻⁸

Tabla 4. Valores de potencial de corrosión y densidad de corriente de corrosión estimadas gráficamente por extrapolación de Tafel.

La aleación Ti6Al4V sin depósitos de CG o CG/MBG-Ge presenta un comportamiento que vale la pena resaltar. Para el estudio de la misma, las muestras fueron pulidas y limpiadas antes de su inmersión en SBF, o antes de su análisis a tiempo cero. En este caso se puede ver que la superficie está activa, por la pendiente de la curva anódica de polarización. Una vez que transcurre el tiempo de inmersión en la solución, el material se comienza a pasivar y eso puede verse en la pendiente de la curva anódica con un corrimiento a mayores valores de la misma (curva más “parada”, mostrando una capa protectora).

Esto indicaría que a tiempos mayores, el material recubierto tendría un comportamiento a la corrosión similar al material desnudo, lo que no sería indeseado

ya que la aleación Ti6Al4V es muy resistente a fluidos agresivos como el corporal, y un material altamente recomendado para implantes.

5.5 Ensayos de hemocompatibilidad

5.5.1 Ensayo de hemólisis

En el ensayo de hemólisis, se evalúa la liberación de hemoglobina como resultado de la lisis de los glóbulos rojos. La hemoglobina, una proteína rica en hierro que transporta oxígeno en la sangre, se encuentra encapsulada en los glóbulos rojos. Cuando estos se someten a condiciones que inducen la lisis, la hemoglobina se libera al entorno circundante. La medición de la hemoglobina libre es indicativa del grado de hemólisis experimentado por los glóbulos rojos y proporciona información valiosa sobre la compatibilidad sanguínea y la seguridad de los materiales en contacto con la sangre. Este ensayo es crucial para evaluar el impacto potencial de los dispositivos médicos o implantes en la integridad de los glóbulos rojos y garantizar la biocompatibilidad en aplicaciones clínicas.

De acuerdo a lo establecido en la norma ISO 10993-4 (*“Biological evaluation of medical devices —Part 4: Selection of tests for interactions with blood”*) y siguiendo el protocolo de mayor consenso en la literatura, se procedió a evaluar la hemocompatibilidad de las muestras. En este protocolo, tanto las muestras de Ti6Al4V como las de CG/MBG-Ge revelaron tasas de hemólisis del 0%, indicando una completa compatibilidad con los glóbulos rojos. No obstante, las muestras recubiertas con CG mostraron una tasa de hemólisis del 1.3%, las cuales también se mantuvieron dentro del umbral aceptable del 5% para considerarse hemocompatibles.

Es relevante destacar que los valores de absorbancia obtenidos para estimar la hemoglobina libre fueron del orden de 10^{-2} , los cuales estuvieron por debajo del rango confiable de detección del equipo (valores de absorbancia de 0.15 a 1), lo que impide una interpretación correcta de las diferencias entre las muestras. Por ello, se decidió implementar un segundo protocolo, menos común en la literatura, que utiliza una solución más concentrada de glóbulos rojos (del 2%) en comparación con el 0.016% de sangre entera utilizado en el protocolo anterior. Con este enfoque, se obtuvo una tasa de hemólisis de Ti6Al4V, CG y CG/MBG-Ge del 5%, 6.5% y 3.1%, respectivamente. Estos resultados confirman que Ti6Al4V y CG/MBG-Ge presentan valores similares de hemólisis, y que el recubrimiento CG/MBG-Ge mejora la hemocompatibilidad de la aleación de titanio. Este segundo protocolo proporciona una

evaluación más concreta del efecto de los materiales sobre los glóbulos rojos (ya que los aísla de otros componentes de la sangre entera) y confiable (ya que los valores de absorbancia caen en el rango apropiado del espectrofotómetro), permitiendo una mejor comprensión de su comportamiento.

En la parte superior de la Figura 32 se observan algunas muestras luego de ser centrifugadas, donde se pueden evidenciar los glóbulos rojos en la base del tubo y el sobrenadante, que es el líquido que se toma para la medición. En la parte inferior de la figura, se observa el equipo utilizado para la medición de la absorbancia.

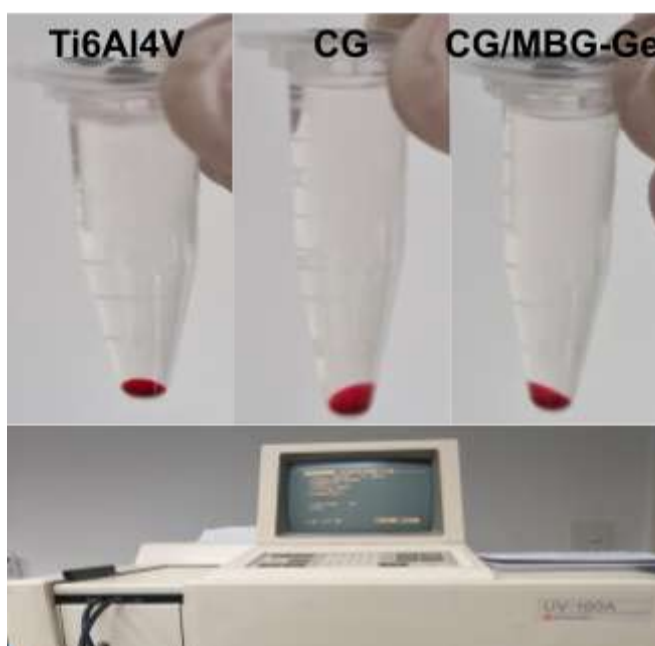


Figura 32. Superior: Muestras utilizadas para análisis de hemocompatibilidad. Inferior: equipo UV-Visible.

5.5.2 Ensayo de adhesión plaquetaria

La evaluación de la adhesión plaquetaria a un implante es de vital importancia en la investigación biomédica y en el diseño de biomateriales, ya que proporciona información crucial sobre la biocompatibilidad y la respuesta del sistema circulatorio a los dispositivos implantables. La adhesión plaquetaria es una interacción clave que determina la respuesta inicial del sistema circulatorio a los biomateriales, y puede tener implicaciones críticas en la biocompatibilidad y la seguridad a largo plazo de los implantes, debido a que la sangre es el primer tejido que entra en contacto con su superficie. Las plaquetas son componentes clave de la sangre que liberan moléculas que determinan los primeros pasos de la curación, también fundamentales para el correcto proceso de regeneración a largo plazo y la modulación de la respuesta

inmunológica. Al activarse, las plaquetas forman el coágulo inicial necesario para la estabilización del implante y la atracción química de otros tipos de células [45]. Dentro de los factores que se liberan con la activación de las plaquetas en la cascada de coagulación, se encuentra el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los cuales tienen implicancias en la osteogénesis [46].

En base a esto, para la evaluación de la adhesión plaquetaria se realizó un análisis cuantitativo de las mismas por medio de imágenes obtenidas por SEM, así como también de la morfología que presentaban, la cual es un sinónimo de su nivel de activación. En la Figura 33, se observa de bibliografía la morfología que puede ir adoptando la plaqueta [47].

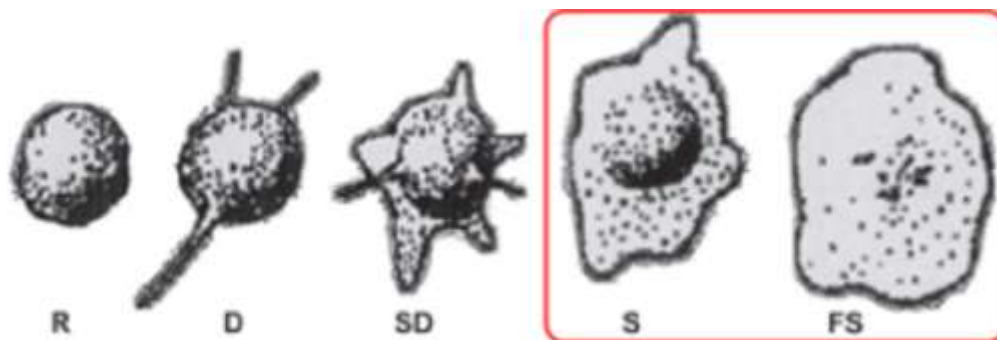


Figura 33. Morfología típica de las plaquetas adheridas: R (Round), D (Dendritic), SD (Spreading Dendritic), S (Spreading), FS (Fully Spreading)

En la Figura 34 se muestra a modo de ejemplo las imágenes SEM de muestras de Ti6Al4V (a), CG (b) y CG/MBG-Ge (c) y como se marcaron las plaquetas para su cuantificación y posterior análisis de su morfología.

En el análisis de las imágenes, se observó que tanto las muestras de Ti6Al4V como las de CG/MBG-Ge presentaron una notable cantidad de plaquetas adheridas en comparación con las muestras de CG (Figura 34 d), sugiriendo una inducción rápida del proceso de respuesta celular en ambas superficies. Es relevante señalar que la identificación de plaquetas en las muestras de CG/MBG-Ge resultó difícil debido a la complejidad topográfica de la superficie, por lo cual, el recuento podría estar subestimado.

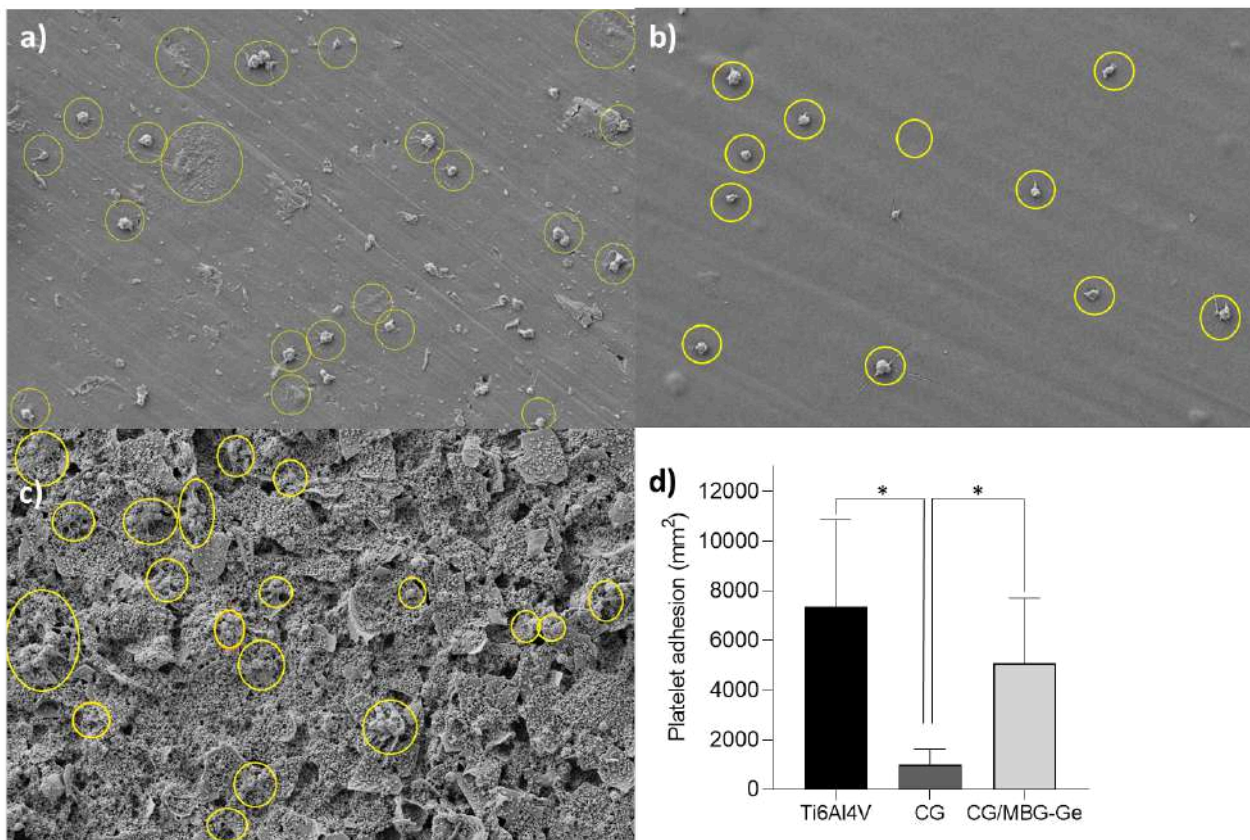


Figura 34. Fotografías SEM de muestras de a) Ti6Al4V, b) CG, c) CG/MBG-Ge, con identificación de plaquetas para su cuantificación. d) Gráfico de cuantificación de adhesión plaquetaria. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

El análisis morfológico cualitativo de las plaquetas reveló respuestas distintas según la superficie. En Ti6Al4V, la mayoría de las plaquetas mostraron una forma redonda con seudópodos incipientes (Figura 35 a); en cambio, en las muestras de CG, las plaquetas eran predominantemente redondeadas y carecían en su mayoría de seudópodos (Figura 35 b). Estas morfologías se asocian con un estado no activado. Sin embargo, en la superficie de CG/MBG-Ge, las plaquetas exhibieron consistentemente extensiones dendríticas largas e incluso formaron agregados (Figura 53 c), indicando un estado activado [48]. En base a estos hallazgos, se puede inferir que el recubrimiento completo favorece la adhesión y activación de las plaquetas, con respecto al recubrimiento de CG, elementos cruciales para la rápida formación de un coágulo que estabiliza el implante e inicia el proceso de cicatrización.

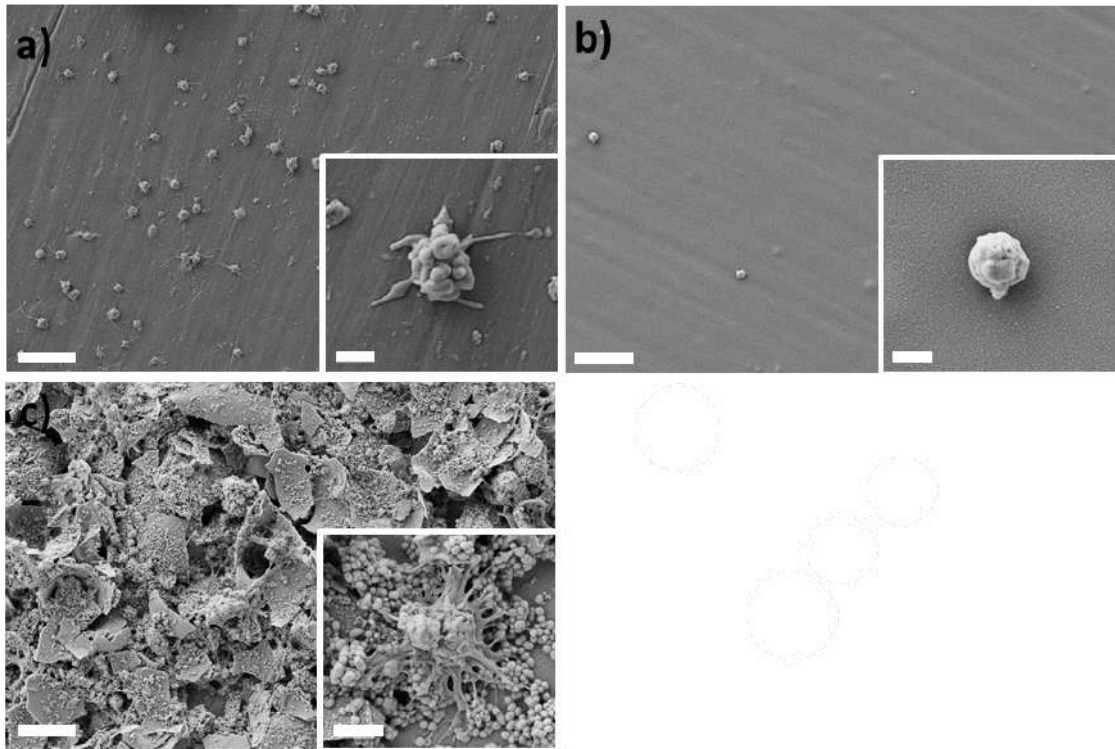


Figura 35. Imágenes SEM típicas de plaquetas adheridas en las diferentes muestras: Ti6Al4V (a), CG (b) y CG/MBG-Ge (c).

5.6 Ensayo de actividad antibacterial

La aplicación de recubrimientos funcionales mediante la técnica de electrodeposición ha revelado el distintivo efecto antibacteriano del recubrimiento CG/MBG-Ge. Este fenómeno se atribuye a la liberación y disolución controlada de las partículas de MBG-Ge, evidenciando su eficacia contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, como se detalla en la Tabla 5. Es importante destacar que, aunque la liberación directa de gentamicina no pudo ser medida, ni tampoco la cantidad específica de gentamicina cargada en las partículas, la confirmación de la carga y la liberación se lleva a cabo mediante el método indirecto de ensayos antibacterianos.

En el contexto de estos ensayos, se observa una disminución significativa en la cantidad de *E. coli* en contacto con las muestras recubiertas con CG/MBG-Ge a las 24 horas, manteniéndose este efecto hasta las 48 horas. Por otro lado, las muestras recubiertas solo con CG exhiben un efecto antibacteriano, aunque este se manifiesta únicamente a las 48 horas. En el caso de *S. aureus*, el efecto antibacteriano es evidente desde las primeras 6 horas para las muestras recubiertas con CG/MBG-Ge. A las 24 horas, la cantidad de bacterias aumenta temporalmente antes de disminuir

significativamente a las 48 horas de contacto. Las muestras recubiertas solo con CG también muestran una reducción, pero solo después de 48 horas. Estos resultados subrayan que la inclusión de partículas de MBG-Ge en la matriz de quitosano potencia la actividad antibacteriana de los implantes de Ti6Al4V, proporcionando una valiosa contribución a la resistencia antimicrobiana del material implantado.

		6 hs	24 hs	48 hs
<i>E. Coli</i> (media ± SD)	Control	100	100	100
	Ti6Al4V	97.3 ± 1.9	108.5 ± 8.4	100 ± 5
	CG	98 ± 0.9	105.1 ± 13.2	68.6 ± 4*
	CG/MBG-Ge	104.7 ± 23.6	65.2 ± 6*	71.8 ± 0.5*
<i>S. Aureus</i> (media ± SD)	Control	100	100	100
	Ti6Al4V	104.6 ± 0.6	101 ± 0.1	100.9 ± 5.8
	CG	120.1 ± 18.7	100 ± 13.4	67.3 ± 6.2*
	CG/MBG-Ge	20.6 ± 8.4*	75.9 ± 1.8	35.3 ± 0.4*

*Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos dentro de un mismo tiempo (ANOVA de medidas repetidas, test post-hoc de Tukey).

Tabla 5. Viabilidad bacteriana de los recubrimientos y sustrato.

5.7 Discusión general

A lo largo de este trabajo sobre recubrimientos para implantes de aleación de titanio (Ti6Al4V), se buscó llevar a cabo una evaluación de las propiedades superficiales, funcionales, electroquímicas y de hemocompatibilidad de los recubrimientos de quitosano/gelatina (CG) y CG/MBG-Ge. Esta evaluación nos proporciona una idea parcial de cómo respondería el material en el cuerpo humano. El propósito principal ha sido mejorar las características funcionales de los implantes, particularmente enfocándonos en propiedades antibacterianas y bioactivas.

En términos de la caracterización superficial, las técnicas empleadas, como la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), han proporcionado una visión detallada de la

morfología y composición de los recubrimientos luego de la electrodeposición y en distintos períodos de inmersión en fluido fisiológico simulado (SBF). Se ha observado una variación en la integridad de los recubrimientos a los diferentes tiempos. Cabe destacar que la concentración de las soluciones precursoras de gelatina y quitosano en las capas CG y en las capas CG/MBG-Ge fueron las mismas, pero la presencia de las MBG cargadas genera un desbalance en el potencial de la solución (por la presencia de las partículas cargadas eléctricamente), cambiando drásticamente la morfología de los depósitos logrados. Aun así, la capa lograda se ve que es adherente, pareja y con rugosidad constante.

El análisis electroquímico, a través de técnicas como la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) y las curvas de polarización potenciodinámicas, se ha centrado principalmente en los tiempos cortos (0, 1 y 7 días). Esto se debe a una decisión estratégica de evaluar la condición de tiempo real donde se liberará el antibiótico en el medio circundante, y también debido a que a tiempos más prolongados (28 días) se observa una pérdida total del recubrimiento. Este enfoque permite destacar la degradación de los recubrimientos en etapas críticas y relevantes para su funcionalidad a corto plazo, así como también podemos estimar que luego de un tiempo, las condiciones superficiales del implante de Ti6Al4V serán similares a la de las prótesis en el mercado, con una capa pasiva altamente protectora a la corrosión.

En cuanto a la concentración de gentamicina utilizada, esta elección se fundamenta en estudios previos que reportan la capacidad de absorción de las partículas mesoporosas y la posterior liberación. La intención es lograr una liberación controlada del antibiótico, crucial para abordar posibles infecciones postoperatorias. Esta liberación local permitiría evitar el tratamiento preventivo del paciente con antibióticos por vía sistémica, además de minimizar la dosis. Aun así, la dosis local suministrada por las partículas en la zona de la interfase implante/recubrimiento, es mayor a la concentración mínima inhibitoria para las bacterias hospitalarias comunes, así como es menor a la concentración tóxica para las células [49], [50].

A medida que reflexionamos sobre el proyecto en su conjunto, se destaca la importancia de abordar no sólo la eficacia antibacteriana sino también la integridad y la capacidad de los recubrimientos para resistir condiciones simuladas del cuerpo. Las exclusiones estratégicas en el análisis electroquímico, centradas en tiempos prolongados, subrayan la relevancia de comprender la dinámica de degradación en las

primeras etapas, proporcionando una visión más específica y aplicable para aplicaciones clínicas.

La aleación Ti6Al4V, ampliamente utilizada en tornillos, placas e implantes traumatológicos, no presenta un impedimento a la deposición de compuestos inductores de bioactividad, por el contrario, con el tiempo generan una fina capa bioactiva que podría ayudar a la oseointegración de las piezas. Al agregar un recubrimiento con capacidad bioactiva, ésto se incrementa en períodos cortos de tiempo, aunque a tiempos más largos al liberarse las partículas y disolverse las capas, el efecto se diluye. Sin embargo, no hay que perder de vista uno de los objetivos troncales de este proyecto, que es brindar a la aleación un comportamiento que de por sí no podría tener nunca, que es el carácter antibacterial, logrado por la incorporación de gentamicina en las partículas mesoporosas.

6 Análisis económico

El mercado de recubrimientos para prótesis intracorpóreas incluye diversas técnicas de aplicación de hidroxiapatita, siendo una de las más empleadas la deposición por plasma spray tanto en el vástago de prótesis de cadera como en tornillos. Esta tecnología se ha destacado por su eficacia en la mejora de la osteointegración. Sin embargo, dada la alta inversión requerida en equipamiento para aplicar estos recubrimientos, se ha generado un interés creciente en buscar alternativas de aplicación y otros recubrimientos bioactivos que puedan ser más accesibles en términos de costos. Además, otro aspecto de importancia es la incorporación local de antibióticos en los recubrimientos. Esto se debe a que los antibióticos suelen administrarse por vía sistémica y se busca optimizar su aplicación para prevenir posibles infecciones posteriores a la intervención quirúrgica. Este enfoque responde a la necesidad de mejorar la durabilidad y seguridad de los implantes, especialmente en pacientes jóvenes y activos.

Con base en esta información, se llevará a cabo un estudio de mercado para evaluar la viabilidad de implementar los depósitos de CG/MBG-Ge en prótesis de cadera, en comparación con los recubrimientos de hidroxiapatita (HAp) . Este análisis permitirá comprender la demanda del mercado y las oportunidades de penetración para los nuevos recubrimientos. Además, se realizará un estudio económico para evaluar la posibilidad de producir estas modificaciones en el vástago del implante de cadera de titanio grado 5. Se compararán los costos asociados con la implementación de los depósitos de CG/MBG-Ge mediante deposición electroforética, frente a los costos de la misma aleación con depósito de apatita por plasma spray que existen hoy en el mercado.

Estudio de Mercado:

- **Demanda del Mercado:** La demanda de prótesis de cadera en Argentina está influenciada por factores demográficos, como el envejecimiento de la población y el aumento de la esperanza de vida. Se espera que la demanda de prótesis de cadera crezca en línea con estos factores, así como con una mayor conciencia sobre la calidad de vida y la disponibilidad de tecnologías médicas avanzadas [51].
- **Tendencias del Mercado:** Las tendencias mundiales en el campo de la ortopedia indican una preferencia creciente por materiales y tecnologías biomédicas avanzadas que mejoren la durabilidad, la biocompatibilidad y la

funcionalidad de las prótesis de cadera [52]. Los recubrimientos CG/MBG-Ge pueden alinearse con estas tendencias al ofrecer propiedades antibacterianas y bioactivas.

- Beneficios y Ventajas: Los recubrimientos CG/MBG-Ge pueden proporcionar ventajas sobre los recubrimientos de HAp al reducir el riesgo de infección y poseer características similares respecto a la integración del implante con el hueso circundante. Estas propiedades pueden traducirse en una mejor tasa de éxito a largo plazo y una menor incidencia de complicaciones postoperatorias.
- Precios y Competencia: Los precios de las prótesis de cadera varían según el fabricante, el tipo de implante y los materiales utilizados. Los recubrimientos CG/MBG-Ge podrían presentar un costo inicial menor en comparación con los de HAp por plasma spray debido al método de deposición empleado, en base a los costos de equipamiento requeridos para cada caso. Además tienen un beneficio adicional debido al carácter antibacterial que presentan por la incorporación de la gentamicina.
- Regulaciones y Normativas: En Argentina, la fabricación y comercialización de dispositivos médicos, incluidas las prótesis de cadera, están reguladas por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) [53]. Los recubrimientos CG/MBG-Ge deberán cumplir con los estándares de calidad y seguridad establecidos por esta autoridad regulatoria.

Análisis Económico:

- Costos de Producción de CG/MBG-Ge: Los costos de producción de los recubrimientos CG/MBG-Ge pueden incluir materiales (quitosano, gelatina, partículas de vidrio bioactivo mesoporosas, gentamicina), mano de obra, equipos y procesos de fabricación. Los costos directos y fijos de producción variarán según la escala de producción y la eficiencia operativa de la instalación de fabricación.
- Costos de Producción de HAp: Los costos de producción de los recubrimientos de HAp pueden seguir una estructura similar a la de los CG/MBG-Ge, pero pueden diferir en función de los materiales y procesos específicos utilizados en su fabricación. Los costos de materiales y equipos pueden ser comparables, pero pueden variar según la disponibilidad de materias primas y la tecnología utilizada para la deposición del recubrimiento.

- Comparación de Costos: Para realizar un análisis económico detallado, se requerirían datos específicos sobre los costos de producción de ambos tipos de recubrimientos en Argentina. Estos costos podrían variar según la ubicación geográfica, los proveedores de materiales y otros factores logísticos. Sería necesario realizar un estudio de costos específico para determinar con precisión la viabilidad económica de cada opción de recubrimiento.
- Análisis de Costo-Beneficio: Además de los costos de producción, se deben considerar los beneficios clínicos y económicos a largo plazo de cada tipo de recubrimiento. Esto incluye la reducción de complicaciones postoperatorias, la durabilidad del implante y los costos asociados con posibles reintervenciones o tratamientos adicionales debido a complicaciones. Un análisis completo de costo-beneficio permitiría evaluar mejor la rentabilidad de cada opción de recubrimiento en el contexto de la atención médica en Argentina.

Para realizar el análisis económico, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones. En primer lugar, se excluyó el costo de fabricación de la prótesis en sí misma, enfocándonos únicamente en el proceso de recubrimiento. Se estimó que la planta sería capaz de producir 30000 recubrimientos anualmente, cubriendo completamente el vástago de cada una. Para determinar la cantidad de materia prima requerida, se tomó en cuenta un vástago de tamaño intermedio, considerando que existen en el mercado prótesis con diferentes dimensiones. A partir de estas medidas, se calculó el volumen de un recipiente adecuado para la electrodeposición, estimando así el volumen anual de la solución necesaria. Los costos de las materias primas se basaron en los precios proporcionados por las mismas marcas mencionadas a lo largo del trabajo. Utilizando las cantidades obtenidas durante la síntesis de partículas en el trabajo experimental, se estableció una relación para determinar la cantidad necesaria de cada materia prima para el volumen estimado de producción de 30000 deposiciones. Además, se tuvo en cuenta que cada solución empleada en el proceso puede recubrir 2 piezas. En cuanto a la mano de obra, se calculó por tablas que era necesaria la participación de 6 operarios y 2 supervisores en el proceso. Estas consideraciones fueron la base para calcular los costos de producción del recubrimiento CG/MBG-Ge. Finalmente, se estima el precio de una pieza unitaria de la prótesis recubierta con este material, sumando el costo del recubrimiento al precio de mercado de la prótesis de Ti6Al4V desnuda.

Análisis económico detallado para la producción anual de 30000 vástagos de
Ti6Al4V recubiertos con CG/MBG-Ge

Costos de fabricación del recubrimiento:

Costos variables	USD/año
Materias primas	34430.6
Mano de obra (6 operarios)	67530
Supervisión (2 operarios)	13506
Servicios	28137.5
Mantenimiento	562.75
Suministros	22510
Gastos de Laboratorio	3376.5
Subtotal costos variables	170053.35
Costos fijos	USD/año
Depreciación anual	1290
Impuestos	500
Seguros	1500
Subtotal costos fijos	3290
Total gastos de fabricación	173343.35

Costos de producción:

Costos fijos	USD/año
Administración y dirección	4830
Total costos de producción	4830

Gastos totales: 178173.35 USD/año

Gasto de recubrimiento por pieza: 6 USD/pieza

A partir de un contacto de una ortopedia de Neuquén, sin permiso para hacer mención de la misma, se obtuvieron los precios a los que ellos acceden a las prótesis de Ti6Al4V y las mismas recubiertas con HAp por plasma spray, siendo de:

Vástago de cadera de Ti6Al4V recubierto con HAp por plasma spray: 1150 USD

Vástago de cadera de Ti6Al4V: 856 USD.

Si a este costo le agregamos el valor del recubrimiento obtenemos un valor de 862 USD, siendo considerablemente más rentable que el existente hoy en el mercado.

7 Conclusiones

El presente estudio se enfocó en el diseño, optimización y evaluación de un sistema de implante-recubrimiento destinado a mejorar las características bioactivas y antibacterianas de implantes permanentes de titanio Gr. 5. El recubrimiento, compuesto por quitosano, gelatina y biovidrio mesoporoso, demostró ser biocompatible y exhibió propiedades antibacterianas, gracias a la incorporación de gentamicina en las partículas mesoporosas.

En relación con el objetivo general, se logró diseñar y optimizar un recubrimiento que cumplió con los criterios de biocompatibilidad y presentó una destacada actividad antibacterial. Aunque la evaluación de la bioactividad, en términos de formación de hidroxiapatita, no otorgó resultados significativos, la eficacia antibacteriana resultó ser un componente crucial y exitoso del recubrimiento.

En cuanto a los objetivos específicos, la fase de diseño alcanzó todos sus objetivos. Se optimizó la síntesis de partículas mesoporosas de vidrio, su dopaje con gentamicina y los parámetros de EPD para generar películas homogéneas, aunque no continuas, para el recubrimiento de CG/MBG-Ge, sobre las muestras de titanio Gr. 5. Además, se implementó un protocolo de ensayos de hemólisis y adhesión plaquetaria que brindó información valiosa sobre la biocompatibilidad de la aleación recubierta. Este protocolo no se encontraba disponible en el laboratorio, y fue puesto a punto para poder utilizarse en diferentes sistemas de implantes metálicos que trabaja el grupo.

En la fase de evaluación, se estudiaron en detalle la estructura de la aleación, las propiedades superficiales y la respuesta *in vitro* inorgánica de los materiales mediante diversas técnicas analíticas. Aunque no era un objetivo específico que los recubrimientos tuvieran una mejor respuesta a la corrosión que el sustrato desnudo, lo que se pretende es que a tiempos largos el implante tenga las mismas condiciones pasivas y protectoras que se espera de estos materiales, sin sufrir corrosión localizada o picado. Este proyecto exploró el comportamiento sobre todo a tiempos cortos del sistema, ya que se vio enfocado en la capacidad antibacterial de estos materiales, funcionalidad que per se no tienen.

Finalmente, se logró realizar un análisis económico para estimar los costos de producción para implementar este tipo de recubrimientos. Adicionalmente se lo comparó con el de HAp por plasma spray, el cual se encuentra disponible actualmente en el mercado. Se pudo observar que los recubrimientos de CG/MBG-Ge resultan ser más económicos que los de HAp por plasma spray.

8 Trabajo a futuro

El trabajo futuro puede enfocarse en diversas direcciones para profundizar y mejorar los resultados obtenidos. Algunas sugerencias a considerar son:

- **Optimizar la homogeneidad de la capa depositada:** Trabajar en la mejora de la uniformidad y la morfología de la capa depositada. Esto podría lograrse mediante la modificación de los parámetros de deposición, explorando diferentes condiciones experimentales para obtener recubrimientos más homogéneos y menos facetados.
- **Lograr una liberación más controlada del antibiótico:** Investigar y desarrollar estrategias para optimizar la liberación controlada de la gentamicina. Se pueden explorar nuevos métodos de encapsulación o recubrimiento que permitan una liberación más gradual y sostenida, lo que podría ser beneficioso en aplicaciones clínicas.
- **Cuantificar la liberación de gentamicina de forma directa:** Buscar métodos directos de cuantificación de la liberación de gentamicina, como la cromatografía. Esto proporcionaría una medición más precisa de la cantidad de antibiótico liberado en diferentes momentos, lo que sería fundamental para ajustar y optimizar las cargas de gentamicina en las partículas mesoporosas.
- **Análisis a largo plazo del efecto de los depósitos en la capa de óxido pasiva:** Realizar estudios a intervalos más prolongados, como 28 días o más, para examinar en detalle cómo los depósitos afectan la formación y estabilidad de la capa de óxido pasiva en los sistemas estudiados después de la inmersión en SBF. Esto permitiría una comprensión más completa de la respuesta a largo plazo de los materiales frente a condiciones similares a las del cuerpo humano.
- **Profundización en los estudios de impedancia utilizando modelos eléctricos equivalentes:** Emplear modelos eléctricos equivalentes para analizar con mayor detalle las propiedades electroquímicas de los sistemas estudiados. Esto podría proporcionar información adicional sobre la interacción entre los recubrimientos y el entorno circundante, así como mejorar la comprensión de los mecanismos subyacentes involucrados en la respuesta electroquímica de los materiales.
- **Complementar los ensayos celulares:** Llevar a cabo estudios celulares a 1, 4 y 7 días utilizando un linaje celular específico del sistema óseo.

9 Referencias

- [1] Elsevier, “Biomaterials”, [En línea]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/journal/biomaterials>
- [2] A. Hudecki, G. Kiryczyński, y M. J. Łos, “Chapter 7 - Biomaterials, Definition, Overview”, en *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, M. J. Łos, A. Hudecki, y E. Wiecheć, Eds., Academic Press, 2019, pp. 85–98. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>.
- [3] D. F. Williams, “On the mechanisms of biocompatibility.”, *Biomaterials*, vol. 29, núm. 20, pp. 2941–2953, jul. 2008, doi: [10.1016/j.biomaterials.2008.04.023](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023).
- [4] V. Biehl y J. Breme, “Metallic Biomaterials”, *Mat.-wiss, u. Werkstofftech.*, vol. 32, pp. 137–144, 2001.
- [5] Q. Chen y G. A. Thouas, “Metallic implant biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 87, pp. 1–57, 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>.
- [6] M. Diefenbeck, T. Mückley, y G. O. Hofmann, “Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics”, *Injury*, vol. 37, núm. 2, Supplement 1, pp. S95–S104, 2006, [En línea]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T78-4JV5MHB-K/2/595f6148cd84db54f9e902155642de0b>
- [7] R. M. Pilliar, “Metallic Biomaterials”, en *Biomedical Materials*, Cham: Springer International Publishing, 2021, pp. 1–47. doi: [10.1007/978-3-030-49206-9_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-49206-9_1).
- [8] J. L. Gilbert, *Metals: Basic Principles in Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*. 2020.
- [9] T. Ahmad *et al.*, “Physicochemical characteristics and molecular structures of gelatin extracted from bovine skin: effects of actinidin and papain enzymes pretreatment”, *Int. J. Food Prop.*, vol. 22, núm. 1, pp. 138–153, ene. 2019, doi: [10.1080/10942912.2019.1576731](https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1576731).
- [10] F. Milano, A. Masi, M. Madaghiele, A. Sannino, L. Salvatore, y N. Gallo, “Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems”, *Pharmaceutics*, vol. 15, núm. 5, p. 1499, may 2023, doi: [10.3390/pharmaceutics15051499](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051499).
- [11] L. L. Hench, N. Roki, y M. B. Fenn, “Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration”, *J. Mol. Struct.*, vol. 1073, núm. 0, pp. 24–30, 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.066>.
- [12] R. G. Ribas *et al.*, “Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review”, *Ceram. Int.*, vol. 45, núm. 17, pp. 21051–21061, 2019, doi: [10.1016/j.ceramint.2019.07.096](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096).
- [13] *et al.* Kokubo, “Solutions able to reproduce in vivo surface–structure changes in bioactive glass-ceramic A-W”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, doi: [10.1002/jbm.820240607](https://doi.org/10.1002/jbm.820240607).
- [14] X. Chen y Q. Hu, “Bioactive glasses”, *Front. Nanobiomedical Res.*, vol. 9, núm. 3, pp. 147–182, 2017, doi: [10.1142/9789814317351_0003](https://doi.org/10.1142/9789814317351_0003).
- [15] C. J. Brinker, G. C. Frye, A. J. Hurd, y C. S. Ashley, “Fundamentals of sol-gel dip coating”, *Thin Solid Films*, vol. 201, núm. 1, pp. 97–108, 1991, doi: [10.1016/0040-6090\(91\)90158-T](https://doi.org/10.1016/0040-6090(91)90158-T).

- [16] P. Li *et al.*, “Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid”, *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 75, núm. 8, pp. 2094–2097, ago. 1992, doi: 10.1111/j.1151-2916.1992.tb04470.x.
- [17] Y. Li, B. P. Bastakoti, y Y. Yamauchi, “Smart Soft-Templating Synthesis of Hollow Mesoporous Bioactive Glass Spheres”, *Chem. – A Eur. J.*, vol. 21, núm. 22, pp. 8038–8042, may 2015, doi: 10.1002/chem.201406570.
- [18] W. Xia y J. Chang, “Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system”, *J. Control. Release*, vol. 110, núm. 3, pp. 522–530, feb. 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.11.002.
- [19] L. Besra y M. Liu, “A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD)”, *Prog. Mater. Sci.*, vol. 52, núm. 1, pp. 1–61, 2007, [En línea]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TX1-4KVXPHW-1/2/b759ffb376e738ded087ee8f1347c18e>
- [20] I. Corni, M. P. Ryan, y A. R. Boccaccini, “Electrophoretic deposition: From traditional ceramics to nanotechnology”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, núm. 7, pp. 1353–1367, 2008, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.011.
- [21] J. Serra, “Image Analysis and Mathematical Morphology”, vol. vol I, 1982.
- [22] J. Serra, “Image analysis and mathematical morphology”, vol. vol II, 1988.
- [23] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. M. Ritchie, J. H. J. Scott, y D. C. Joy, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York, NY: Springer New York, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-6676-9.
- [24] J. A. D. H. Peter R. Griffiths, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 2007.
- [25] “Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test 1”, doi: 10.1520/D3359-09E02.
- [26] X. Chen, J. Zhou, Y. Qian, y L. Zhao, “Antibacterial coatings on orthopedic implants”, *Mater. Today Bio*, vol. 19, p. 100586, abr. 2023, doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100586.
- [27] Y. L. Jeyachandran *et al.*, “Bacterial adhesion studies on titanium, titanium nitride and modified hydroxyapatite thin films”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, pp. 35–41, 2007.
- [28] J. Ballarre, D. Buldain, I. Unalan, J. I. Pastore, N. Mestorino, y A. R. Boccaccini, “Melaleuca armillaris Essential Oil as an Antibacterial Agent: The Use of Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles as Drug Carrier”, *Nanomaterials*, vol. 13, núm. 1, 2023, doi: 10.3390/nano13010034.
- [29] Q. Nawaz *et al.*, “Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, núm. 5, p. 64, 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6070-4.
- [30] S. Omar *et al.*, “SiO₂-CaO-P₂O₅ (58S) sol gel glass applied onto surgical grade stainless steel by spray technique: morphological characterization by digital image processing”, *Biomedical glasses*, vol. 2, núm. 1. p. 10, 2016. doi: 10.1515/bglass-2016-0002.
- [31] Z.-K. Huang y K.-W. Chau, “A new image thresholding method based on Gaussian mixture model”, *Appl. Math. Comput.*, vol. 205, núm. 2, pp. 899–907, 2008, doi: 10.1016/j.amc.2008.05.130.

- [32] ISO, "10993 Biological evaluation of medical devices. Part 4: Selection of tests for interaction with blood", *Geneva, Switz.*, 2002.
- [33] T. Zhao, Y. Li, Y. Gao, Y. Xiang, H. Chen, y T. Zhang, "Hemocompatibility investigation of the NiTi alloy implanted with tantalum", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, núm. 10, pp. 2311–2318, 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4406-4.
- [34] F. Gao *et al.*, "Fabrication of chitosan/heparinized graphene oxide multilayer coating to improve corrosion resistance and biocompatibility of magnesium alloys", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, p. 109947, jul. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109947.
- [35] Y. W. Y. and N. M. W. Ng W L, "Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering", *Int. J. Bioprinting*, 2016.
- [36] C. Dwivedi, H. Pandey, A. Pandey, y P. Ramteke, "Fabrication and Assessment of Gentamicin Loaded Electrospun Nanofibrous Scaffolds as a Quick Wound Healing Dressing Material", *Curr. Nanosci.*, vol. 11, núm. 2, pp. 222–228, feb. 2015, doi: 10.2174/1573413710666141003221954.
- [37] A. Witecka, S. Valet, M. Basista, y A. R. Boccaccini, "Electrophoretically deposited high molecular weight chitosan/bioactive glass composite coatings on WE43 magnesium alloy", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 418, 2021, doi: 10.1016/j.surfcoat.2021.127232.
- [38] J. Román, S. Padilla, y M. Vallet-Regí, "Sol-Gel Glasses as Precursors of Bioactive Glass Ceramics", *Chem. Mater.*, vol. 15, núm. 3, pp. 798–806, feb. 2003, doi: 10.1021/cm021325c.
- [39] S. Metwally y U. Stachewicz, "Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, p. 109883, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109883>.
- [40] J. Ballarre, T. Aydemir, L. Liverani, J. A. Roether, W. H. Goldmann, y A. R. Boccaccini, "Versatile bioactive and antibacterial coating system based on silica, gentamicin, and chitosan: Improving early stage performance of titanium implants", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 381, 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.125138.
- [41] J. L. Merlo, R. Detsch, S. Ceré, A. R. Boccaccini, y J. Ballarre, "Degradable magnesium implants: improving bioactive and antibacterial performance by designed hybrid coatings", *J. Mater. Res.*, 2021, doi: 10.1557/s43578-020-00099-w.
- [42] T. T. Nge y J. Sugiyama, "Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 81A, núm. 1, pp. 124–134, abr. 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31020.
- [43] W. Xu *et al.*, "Microstructure, wear resistance, and corrosion performance of Ti35Zr28Nb alloy fabricated by powder metallurgy for orthopedic applications", *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 41, pp. 191–198, mar. 2020, doi: 10.1016/j.jmst.2019.08.041.
- [44] E. Matykina, R. Arrabal, B. Mingo, M. Mohedano, A. Pardo, y M. C. Merino, "In vitro corrosion performance of PEO coated Ti and Ti6Al4V used for dental and orthopaedic implants", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 307, pp. 1255–1264, dic. 2016, doi: 10.1016/j.surfcoat.2016.08.018.
- [45] R. Tejero, E. Anitua, y G. Orive, "Toward the biomimetic implant surface:

- Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration”, *Prog. Polym. Sci.*, núm. 39, pp. 1406–1447, 2014.
- [46] M. Weber *et al.*, “Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility.”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, p. 99, 2018.
- [47] Y. Ding *et al.*, “Directing vascular cell selectivity and hemocompatibility on patterned platforms featuring variable topographic geometry and size”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, núm. 15, pp. 12062–12070, 2014, doi: 10.1021/am502692k.
- [48] K. Park, F. W. Mao, y H. Park, “Morphological characterization of surface-induced platelet activation.”, *Biomaterials*, vol. 11, núm. 1, pp. 24–31, ene. 1990, doi: 10.1016/0142-9612(90)90047-t.
- [49] C. J. Hodiamont, A. K. van den Broek, S. L. de Vroom, J. M. Prins, R. A. A. Mathôt, y R. M. van Hest, “Clinical Pharmacokinetics of Gentamicin in Various Patient Populations and Consequences for Optimal Dosing for Gram-Negative Infections: An Updated Review”, *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 61, núm. 8, pp. 1075–1094, ago. 2022, doi: 10.1007/s40262-022-01143-0.
- [50] E. Gentilini, G. Denamiel, P. Llorente, S. Godaly, M. Reuelto, y O. DeGregorio, “Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitis in Argentina”, *J. Dairy Sci.*, vol. 83, núm. 6, pp. 1224–1227, jun. 2000, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74988-5.
- [51] C. González, A., López, B., & Martínez, “Análisis demográfico de la demanda de prótesis de cadera en Argentina”, *Revista de Salud Pública*, pp. 45–53, 2020.
- [52] R. (Smith, J., & Jones, “Tendencias globales en la ortopedia: avances en materiales y tecnologías”, *J. Orthop. Res.*, pp. 78–86, 2019.
- [53] A. y T. M. (ANMAT) Administración Nacional de Medicamentos, “Normativas vigentes para dispositivos médicos en Argentina”, 2021. [En línea]. Disponible en: www.anmat.gob.ar/normativas/dispositivos-medicos