



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS
DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Evaluación del efecto piezoeléctrico de un
biorecubrimiento osteointegrador "HA-BaTiO₃-
nAg" mediante ensayos in vitro**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES**

**Presenta:
M.C. Roberto Gómez Batres**

Director de Tesis
Dr. Víctor M Orozco Carmona
Metalurgia e Integridad Estructural
Centro de Investigación en Materiales Avanzados
Chihuahua, Chih.

Co-Director de Tesis
PhD. Irene Leal-Berumen
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Chihuahua, Chih.

El presente trabajo de investigación se lo dedico a las personas mas importantes en mi vida.

***A MI MADRE:** Quien se adelantó en el camino de la vida. Te agradezco por ser ese pilar inquebrantable, haberme llenado de todas esas enseñanzas de la vida, esa fortaleza para enfrentar los problemas y todos los valores con los cuales me formaste y educaste.*

***A MI PADRE:** Por ser ese segundo pilar en mi formación y educación como individuo, por esas enseñanzas de la vida y por todo el apoyo tuyo tanto en los buenos como en los malos momentos.*

***A MI HERMANO:** Por ser ese mejor amigo que está en todos los buenos y malos momentos y todo el apoyo que me has brindado en cada etapa de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C (CIMAV) por permitirme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A CONACYT por el soporte económico otorgado durante mi formación como Doctor en Ciencia de Materiales

A la Facultad de Medicina y ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua por permitirme el acceso y uso de las instalaciones para el desarrollo de una parte fundamental de la presente investigación.

A mis asesores de tesis: Dr. Víctor Orozco Carmona y PhD. Irene Leal-Berumen por todo el apoyo académico y guía en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

A mis compañeros y colaboradores de proyecto: M.C. Zelma Guzmán, M.C. Norberto Godina, M.C. Adán Borunda, M.C. Karime Carrera, Ing. Johana Garay, M.C. Omar Morales, M.C. Janette Moreno, Dr. Everardo González, Dra. Verónica Moreno, Dra. Claudia Ramírez, M.C. Karla Campos, Dr. César Leyva, M.C. Óscar Solís, M.S.C. Rubén Castañeda, Dr. Alberto Diaz, M.C. Ernesto Guerrero, M.C. Roberto Talamantes, Dr. Abel Hurtado, por el apoyo en el desarrollo de materiales y caracterización de los productos obtenidos en la presente investigación.

A los miembros del comité de sinodales, por el tiempo y las aportaciones realizadas para el desarrollo de la presente tesis doctoral:

Dr. Erasmo Orrantia Borunda

Dr. Guillermo Manuel Herrera Pérez

Dr. José Guadalupe Chacón Nava

Dra. Ana María Arizmendi Morquecho

Dr. Mario Sánchez Carrillo

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la optimización y desarrollo de un recubrimiento biomimético el cual mediante la aplicación de técnicas como ultrasonido pulsado de baja intensidad ayudara a promover y acelerar el proceso de osteoconducción así como prevenir las fallas debidas a la infección causadas por bacterias y fallas debidas a una baja adherencia del recubrimiento. Para el desarrollo del recubrimiento se utilizó una base de hidroxiapatita (HA) y titanato de bario (BT) a diferentes concentraciones, una vez optimizada la metodología de proyección se añadió 1% de nanopartículas de plata soportadas en extracto de nopal (nAg) a la matriz de recubrimiento HA/BT. La deposición del recubrimiento se llevó a cabo mediante la técnica de proyección térmica por plasma (APS). Para la caracterización de fases, la materia prima así como los recubrimientos fueron caracterizados mediante técnicas como difracción de rayos X (DRX) y espectroscopia Raman. Para el análisis de morfología y distribución elemental fue utilizado un microscopio electrónico de barrido (MEB) empleando técnicas como formación de imagen mediante electrones secundarios, electrones retrodispersados y microanálisis elemental de dispersión de energía de rayos X (EDS, por sus siglas en ingles). Para el análisis de adherencia y comportamiento de falla, los recubrimientos fueron sometidos a un ensayo de tensión uniaxial, con base en la norma ASTM C633. Para la determinación de dureza, modulo elástico y rigidez, se utilizó la técnica de nanoindentación. Para la evaluación de piezorespuesta se utilizó un microscopio de fuerza atómica (AFM, siglas en inglés) empleando el módulo DART (dual AC resonance-tracking). Para el análisis de estabilidad del recubrimiento y el grado de protección a la corrosión se realizaron las mediciones electroquímicas mediante los ensayos de curvas de polarización lineal utilizando un potenciostato/galvanostato. Para determinar la compatibilidad, citotoxicidad y actividad celular en los recubrimientos, se realizaron los ensayos in vitro empleando la línea celular de osteosarcoma humano (ATCC CRL-1543). El grado de citotoxicidad y compatibilidad fue determinada mediante un ensayo MTT-formazan por espectroscopia UV-Vis. Mediante inmunofluorescencia por microscopia confocal se observó la actividad celular por expresión de osteocalcina (OCN). Por último para la determinación de eficiencia antibacteriana de acuerdo con la norma JIS Z2801 [90] fueron utilizadas las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 4157), *Staphylococcus aureus* (ATCC 24213) y *Pseudomona*

aeruginosa (ATCC 27833). En los resultados se observó que una relación de 30% en peso (%P/P) de BT en la matriz mostró el mejor comportamiento en cuanto a propiedades de adherencia alcanzando valores ≈ 43 MPa, los cuales son superiores a los establecidos por la Food and Drug Administration (FDA) (>15 MPa) para el desarrollo de recubrimientos base HA; por otra parte mediante los ensayos in vitro con y sin tratamiento de ultrasonido pulsado de baja intensidad, se logró observar que a esta concentración de BT en la matriz del recubrimiento se observa una buena compatibilidad y citotoxicidad nula, manteniendo la expresión de OCN, proteína la cual está involucrada en los procesos de osteointegración. Por otra parte, mediante los ensayos in vitro con y sin tratamiento de ultrasonido, se observó que el 1% (P/P) de nAg en la matriz del recubrimiento HA con 30% de BT, no muestran un efecto negativo en cuanto a la actividad celular, manteniendo una expresión de OCN, en cuanto a la actividad antibacterial, el recubrimiento muestra una alta eficiencia, alcanzando valores superiores al 99% posterior a 24 horas de incubación para las diferentes cepas bacterianas (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*).

CONTENIDO

Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	XI
1 INTRODUCCION	1
2 JUSTIFICACIÓN	3
3 OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo General	3
3.2 Objetivos Específicos	3
4 HIPÓTESIS	4
5 ANTECEDENTES	5
5.1 Recubrimientos base HA	5
5.2 Efecto piezoeléctrico de la HA y caracterización de piezorespuesta	6
5.3 Biomateriales piezoeléctricos de BaTiO ₃ y HA-BaTiO ₃ ; caracterización, ensayos in vitro e in vivo.	7
6 MARCO TEORICO	9
6.1.1 Tejido Óseo.....	9
6.1.2 Proteínas óseas especializadas.....	9
6.2 Biomateriales	10
6.3 Evaluación de biomateriales	12
6.4 Biomateriales para regeneración ósea	12
6.4.1 Hidroxiapatita.....	13
6.5 Modificación superficial en materiales	14
6.5.1 Proyección térmica por plasma.....	16
7 MATERIALES Y METODOS	17
7.1 Etapa I: Caracterización de materia prima	17
7.1.1 Materiales.....	17
7.1.2 Caracterización de materia prima.....	19
7.2 Etapa II: Desarrollo de los recubrimientos HABT	19
7.2.1 Preparación de muestras para proyección térmica.....	19
7.2.2 Proyección Térmica por Plasma.....	20

7.3	Etapa III: Caracterización de los recubrimientos	20
7.3.1	Optimización del recubrimiento	20
7.3.2	Caracterización Física y Fisicoquímica: Recubrimiento Optimizado HA-BT 23	
7.3.3	Caracterización in vitro: Ensayos biológicos.....	28
7.4	Etapa IV: Incorporación de nanopartículas de plata a recubrimiento HA-BT	32
7.4.1	Desarrollo del recubrimiento	32
7.4.2	Caracterización	33
8	RESULTADOS	37
8.1	Etapa II: Caracterización de materia prima	37
8.1.1	Difracción de Rayos X.....	37
8.1.2	Espectroscopia Raman	37
8.1.3	Morfología: Microscopia electrónica de barrido	38
8.2	Etapa III: Caracterización de recubrimientos	39
8.2.1	Optimización.....	39
8.2.2	Caracterización Física y Fisicoquímica: Recubrimiento Optimizado	48
8.2.3	Caracterización in vitro: Ensayos biológicos.....	65
8.3	Etapa IV: Incorporación de nanopartículas de plata a recubrimiento HA-BT, caracterización del recubrimiento	72
8.3.1	Caracterización	72
8.3.2	Caracterización in vitro: Ensayos biológicos.....	77
9	DISCUSIÓN	83
10	CONCLUSIONES	89
11	RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	91
12	REFERENCIAS	93

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema representativo de etapas para el desarrollo de un biomaterial.	12
Figura 2 Esquema, división de etapas de metodología experimental.	17
Figura 3 Esquema representativo de probeta para ensayo de adherencia del recubrimiento empleando tensión uniaxial.....	25
Figura 4Celda de cultivo "lab on a chip"; en la imagen a) se observan las muestras sometidas a los tratamientos, en la imagen b) se logra observar los puertos de entrada y salida para la adición de medio de cultivo.	29
Figura 5 Esquema representativo de placa de 96 pozos para ensayo por MTT.....	31
Figura 6 Patrones de difracción obtenidos para polvos primarios: HA y BT.....	37
Figura 7 Espectros Raman característicos para polvos primarios: HA y BT, en línea punteada se muestra la banda característica de la fase tetragonal del BT.	38
Figura 8 Micrografías MEB obtenidos para los polvos primarios y sus respectivos histogramas generados para el tamaño de partícula: a) y c) corresponden a la HA, b) y d) corresponden a el BT.	39
Figura 9 Micrografías MEB en sección superficial para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías descritas: a) y b) metodología tipo I, recubrimientos HA8.1Z10BT y HA8.1Z50BT respectivamente, c) y d) metodología tipo II, recubrimientos HA10BT-S y HA50BT-S respectivamente.....	40
Figura 10 Micrografías MEB en sección superficial para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías: a) y b) metodología tipo III, recubrimientos HA10BT-S450 y HA50BT-S450 respectivamente, c) y d) metodología tipo IV, recubrimientos HA10BT-A y HA50BT-A respectivamente, e) y f) metodología tipo V, recubrimientos HA10BT-M y HA50BT-M respectivamente.	42
Figura 11 Micrografías MEB en sección transversal para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías descritas: a) y b) metodología tipo I, recubrimientos HA8.1Z10BT y HA8.1Z50BT respectivamente, c) y d) metodología tipo II, recubrimientos HA10BT-Sy HA50BT-S respectivamente.....	43

Figura 12 Micrografías MEB en sección transversal para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías: a) y b) metodología tipo III, recubrimientos HA10BT-S450 y HA50BT-S450 respectivamente, c) y d) metodología tipo IV, recubrimientos HA10BT-A y HA50BT-A respectivamente, e) y f) metodología tipo V, recubrimientos HA10BT-M y HA50BT-M respectivamente.	45
Figura 13 Valores de adherencia nominal alcanzados por los recubrimientos tipo III, IV y V respectivamente.	46
Figura 14 Fixturas en sección superficial para análisis de falla de los recubrimientos tipo III, IV y V, con base a la norma ASTM C633.	47
Figura 15 Comparativo de difractogramas: a) polvos primarios y mezcla de polvos precursores para recubrimiento, b) polvos primarios y recubrimientos a diferentes concentraciones HA/BT.	49
Figura 16 Comparativo espectros Raman para polvos primarios y mezcla de polvos precursores de recubrimiento HA/BT.	50
Figura 17 Estructuras cristalinas para: a) BT fase tetragonal y b) HA estructura hexagonal. En a) se muestra la distorsión de la estructura debida a la interacción entre Ti central y el O.	50
Figura 18 Espectros Raman característicos para: a) polvos primarios y b) recubrimientos HA/BT.	51
Figura 19 Micrografías MEB en sección superficial; a), c) y e) Análisis de morfología pseudo 3D en electrones secundarios para recubrimientos HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente. b), d) y e) Análisis de fases mediante electrones retrodispersados HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente.	53
Figura 20 Micrografías MEB en transversal a 250X y 1000X; a) y c) recubrimiento HA10BT, c) y d) recubrimiento HA30BT, d) y e) recubrimiento HA50BT respectivamente. b), d) y e) Análisis de fase mediante electrones retrodispersados HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente.	55
Figura 21 Mapeo elemental en sección transversal de recubrimiento HA10BT.	56
Figura 22 Mapeo elemental en sección transversal de recubrimiento HA30BT.	56
Figura 23 Mapeo elemental en sección transversal de recubrimiento HA50BT.	57
Figura 24 Micrografía MEB y espectro de EDS: a) recubrimiento HA10BT, b) recubrimiento HA30BT y c) recubrimiento HA50BT.	58

Figura 25 Cuadro comparativo de valores de adherencia nominal de los recubrimientos HA/BT BM mediante el ensayo por tension en base a la norma ASTM C633.	59
Figura 26 Comparativo visual del comportamiento de falla de los recubrimientos recubrimientos HA/BT BM posterior al ensayo de tension. Las flechas en color azul indican las zonas de falla de tipo adherente.....	60
Figura 27 Comparativo curvas de esfuerzo desplazamiento para los recubrimientos base HA/BT BM.	61
Figura 28 Micrografia MEB representativa para la identificacion de zonas de interes para su posterior analisis depiezorespuesta mediante AFM modulo DART.....	62
Figura 29 Curvas de polarizacion vs dezplazamiento y polarizacion vs coeficiente piezoelectrico para los recubrimientos; a) HA, b) HA10BT, c) HA30BT y d) HA50BT. 63	
Figura 30 a) Curvas RP obtenidas para los recubrimientos base HA/BT, b) Velocidadesde corrosion obtenidas para sustrato Ti6Al4V ELI, recubrimientos HA, BT y recubrimientos base HA/BT.	65
Figura 31 Comportamiento de citotoxicidad a diferentes tiempos de exposici3n, 1 d3a, 3 d3as, 7 d3as y 21 d3as.	66
Figura 32 Comportamiento de actividad celular a diferentes tiempos de exposici3n, 1 d3a, 3 d3as, 7 d3as y 21 d3as.	67
Figura 33 Viabilidad celular para los recubrimientos HA/BT BM a diferentes diluciones de sobrenadante: a) dilucion 1:2, b) dilucion 1:16 y c) dilucion 1:126.	68
Figura 34 Micrograf3as de inmunofluorescencia para el recubrimiento HA/BT BM sin tratamiento LIPUS vs marcadores espec3ficos. Tiempo de incubaci3n 7 dias.	70
Figura 35 Micrograf3as de inmunofluorescencia para el recubrimiento HA/BT BM con tratamiento LIPUS vs marcadores espec3ficos. Tiempo de incubaci3n 7 dias.	71
Figura 36 Comparativo de patrones de difracci3n de mezcla de polvos precursores de recubrimiento vs materia prima.	72
Figura 37 Comparativo de patrones de difracci3n de recubrimientos vs materia prima. .	73
Figura 38 Micrograf3as MEB obtenidas por electrones retrodispersados; a) y b) se muestra la secci3n superficial y transversal para el recubrimiento HA30BT, c) y d) se muestra la secci3n superficial y transversal para el recubrimiento HA30BTnAg.....	74
Figura 39 Comportamiento de adherencia nominal para recubrimientos HA30BT y HA30BTnAg.....	75

Figura 40 Analisis de falla en seccion superficial de las fixturas recubiertas para los recubrimientos a) HA30BT y b) HA30BTnAg.	76
Figura 41 Curvas representativas de esfuerzo desplazamiento para los recubrimientos HA30BT y HA30BTnAg.	77
Figura 42 Comparativo de comportamiento citotóxico de muestras para las diferentes diluciones; a) se muestra la dilución 1/2, b) se muestra la dilución 1/16 y c) se muestra el comportamiento de la dilución 1/128.	78
Figura 43 Micrografías obtenidas por ensayo de inmunofluorescencia para los recubrimientos HA30BT con y sin nAg; en color azul la tinción del núcleo (DAPI), en verde la tinción de OCN (FITC), en rojo la tinción de citoesqueleto (Rodamina), por último el condensado de las tres señales.	79
Figura 44 Micrografías obtenidas por ensayo de inmunofluorescencia para los recubrimientos HA30BTnAg con y sin aplicación de ultrasonido pulsado (LIPUS): En color azul la tinción del núcleo (DAPI), en verde la tinción de OCN (FITC), en rojo la tinción de citoesqueleto (Rodamina), por último el condensado de las tres señales.	80
Figura 45 Comparativo de crecimiento bacteriano para control, sustrato de titanio y recubrimiento base HA30BTnAg.	81
Figura 46 Esquema sintetizado del desarrollo de un biorecubrimiento multifuncional base HA30BTnAg.	88

Índice de Tablas

Tabla 1 Compuestos de fosfato de calcio, su relación Ca/P y constante de solubilidad...	13
Tabla 2 Técnicas aplicadas para recubrimientos base HA; ventajas y desventajas	15
Tabla 3 Composición elemental para las aleaciones Ti6Al4V grado 23 y grado 5	18
Tabla 4 Parámetros de proyección térmica por plasma	20
Tabla 5 Metodología para el desarrollo del recubrimiento, nomenclatura y respectivas composiciones para los recubrimientos	23
Tabla 6 Relación % en peso de polvos utilizada para formación de recubrimiento	24
Tabla 7 Concentración iónica de plasma sanguíneo humano vs solución SBF de Kokubo [87].....	28
Tabla 8 Materiales utilizados en el diseño de la celda.....	29
Tabla 9 Parámetros utilizados para proyección de recubrimiento HA30BTnAg mediante APS	33
Tabla 10 Valores de adherencia y comportamiento de falla para los recubrimientos tipo III, IV y V.	47
Tabla 11 Composición semicuantitativa obtenida mediante análisis EDS y radio molar de Ca/P para los respectivos recubrimientos.	58
Tabla 12 Valores de adherencia nominal y porcentaje de comportamiento de falla para las respectivas muestras.....	60
Tabla 13 Propiedades mecánicas obtenidas mediante ensayos de nanoindentación para los recubrimientos base HA/BT BM	62
Tabla 14 Valores obtenidos de constante piezoeléctrica mediante AFM módulo DART	64
Tabla 15 Valores obtenidos mediante análisis RP para las diferentes muestras.....	65
Tabla 16 Valores de adherencia de los recubrimientos y comportamiento de falla	76
Tabla 17 Valores de propiedades mecánicas obtenidas mediante nanoindentación.....	77
Tabla 18 Valores de actividad antimicrobiana (R) y eficiencia antibacterial para el recubrimiento HA30BTnAg vs Sustrato de Ti para la cepa E. coli.....	82
Tabla 19 Valores de actividad antimicrobiana (R) y eficiencia antibacterial para el recubrimiento HA30BTnAg vs Sustrato de Ti para la cepa S. aureus.....	82
Tabla 20 Valores de actividad antimicrobiana (R) y eficiencia antibacterial para el recubrimiento HA30BTnAg vs Sustrato de Ti para la cepa P. aeruginosa.....	82

1 INTRODUCCION

Actualmente los defectos óseos generados por las lesiones ocurridas durante las actividades cotidianas y/o por las enfermedades oseódegenerativas, son problemas que se presentan frecuentemente tanto en personas jóvenes y adultas; motivo por el cual se utilizan distintas técnicas quirúrgicas junto con la aplicación de una amplia gama de materiales para la fabricación de prótesis ortopédicas de sustitución ósea [1-2]. En las últimas décadas, uno de los principales problemas que se ha observado en los biomateriales implantados de sustitución ósea ha sido el encapsulamiento por tejido fibroso; el cual se debe a una nula interacción entre el implante y el tejido circundante, ocasionando lo que se le conoce como un aflojamiento aséptico [1], [3-5].

Algunas alternativas para promover la actividad en prótesis metálicas ha sido el uso de técnicas de modificación superficial a base de aplicación de recubrimientos osteoconductores [4-15], funcionalización de superficie por carga y el uso de cementos óseos que promuevan la fijación del implante hacia el tejido circundante. Sin embargo, la aplicación de estas alternativas desencadena una serie de efectos secundarios, tal es el caso de la osteólisis periprotésica (mejor conocida como enfermedad de las partículas), la cual es originada principalmente por las partículas de desgaste del implante. En el caso de los recubrimientos, una baja propiedad en la adherencia puede desencadenar una posible falla debido a la liberación de partículas en el cuerpo biológico [14], [17-20].

Otro problema que se presenta en las prótesis ortopédicas de sustitución ósea es la incidencia por infección periprotésica [21-29], la cual se origina por la infección de bacterias durante el proceso intraoperatorio o postoperatorio. Algunas de las alternativas para mitigar los riesgos de infección son: el uso de antibióticos suministrados por ingesta o la aplicación de antibióticos directamente en la prótesis, el uso de cementos funcionalizados y el uso de agentes antimicrobianos inorgánicos como nanopartículas de plata [27-40]

Actualmente el desarrollo de nuevos biomateriales multifuncionales aplicados en la regeneración ósea tiene como principal objetivo simular las propiedades del tejido óseo, tal es el caso de la piezorespuesta [41-46]. Esta tiene como principal objetivo mejorar las

propiedades de osteoconducción reduciendo los tiempos de cicatrización, dando lugar a una recuperación del paciente en periodos de tiempo más cortos. Hoy en día, algunas técnicas utilizadas como tratamiento de rehabilitación en pacientes con enfermedades osteodegenerativas así como lesiones óseas son: (i) el uso de impulsos eléctricos localizados, (ii) el uso de radiofrecuencia y (iii) el uso de ultrasonido pulsado de baja intensidad, siendo esta última la técnica menos invasiva y con mejores resultados [41], [44], [47-52].

En base a lo antes mencionado, en el presente estudio se desarrolló un recubrimiento que promueve la regeneración ósea mediante el uso de biomateriales osteointegradores base HA, además mediante la modificación de la matriz con la adición de BT se pretende promover propiedades de piezorespuesta, las cuales con ayuda de técnicas de rehabilitación como ultrasonido pulsado de baja intensidad, promuevan un proceso de regeneración celular generando una osteointegración en tiempos más cortos. Por otra parte, mediante la adición de BT se pretende incrementar algunas propiedades mecánicas como la adherencia nominal para prevenir las fallas mencionadas por bajas propiedades de esta. Además con la adición de nAg a la matriz del recubrimiento, se plantea promover propiedades antibacteriales, para de esta manera disminuir el posible caso de infección periprotésica intraoperatoria y postoperatoria.

2 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con las fallas presentes en implantes ortopédicos originadas por la baja adherencia de los recubrimientos habitualmente desarrollados para aplicaciones ortopédicas así como infección causada por bacterias intraoperatoria y postoperatoria, ha surgido la necesidad de desarrollar un recubrimiento biomimético con propiedades biocidas y de piezorespuesta que ayude a mitigar los casos de infección así como mejorar las propiedades de osteoconducción y cicatrización en periodos más corto de tiempo a los comúnmente registrados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Desarrollar un recubrimiento compósito multifuncional con propiedades de piezorespuesta y antibacteriales, el cual permita mejorar las propiedades de osteoconducción y disminuir los tiempos de cicatrización de tejido óseo, además de prevenir fallas debidas a la infección ocasionada por bacterias.

3.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar y optimizar un recubrimiento base HA/BT/nAg
- Mediante difracción de rayos X y espectroscopia Raman evaluar la dispersión de fases y posible degradación de estas.
- Evaluar mediante el análisis de tensión uniaxial y nanoindentación el comportamiento mecánico de los recubrimientos, tales como adherencia total del recubrimiento, dureza, modulo elástico y rigidez del material.
- Empleando la técnica electroquímica de polarización lineal, evaluar el grado de protección del recubrimiento hacia el sustrato.
- Evaluar las propiedades de piezorespuesta de los recubrimientos mediante el uso de técnicas de microscopia de fuerza atómica.
- Mediante ensayos in vitro, evaluar la respuesta biológica, compatibilidad, citotoxicidad y actividad celular de los recubrimientos
- Mediante ensayos in vitro y la aplicación del ultrasonido pulsado de baja intensidad evaluar el posible efecto piezoeléctrico y su influencia en la respuesta biológica del material.

4 HIPÓTESIS

Al integrar nanopartículas de BaTiO₃ a un recubrimiento osteoconductor de HA-1%nAg se obtendrá una respuesta piezoeléctrica por parte del recubrimiento, lo cual, mediante la aplicación de ultrasonido pulsado de baja intensidad se promoverá una mayor osteoconducción en cortos períodos de tiempo a los comúnmente registrados, así como un efecto positivo en la actividad celular ósea.

5 ANTECEDENTES

En esta sección se muestran los antecedentes principales utilizados para el desarrollo de la presente investigación

5.1 *Recubrimientos base HA*

C. Capuccini et al. (2008) [52] proponen la modificación de un recubrimiento de HA mediante el dopaje con estroncio para incrementar la actividad celular. En los resultados muestran que la presencia de Sr en el recubrimiento mejora la actividad celular en osteoblastos y su diferenciación, teniendo un aumento significativo en la expresión de los valores de fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN), y osteopontina (OPG). Mediante las técnicas de tinción por inmunofluorescencia se corrobora dicha actividad en osteoblastos, adicionalmente se observa una mayor proliferación celular. Por otra parte, en estos mismos ensayos los autores demuestran que el contenido de estroncio afecta la producción de osteoclastos, disminuyendo su actividad de proliferación. De acuerdo con los resultados presentados, los autores sugieren que la presencia de estroncio en recubrimientos de HA puede mejorar las propiedades de osteointegración y regeneración ósea, y previene la reabsorción ósea indeseable.

D. Kumar et. al. (2010) [52], proponen un pretratamiento de polarización a las prótesis o andamios fabricados en HA; los ensayos in- vitro muestran un efecto positivo al polarizar los sustratos de Hidroxiapatita, donde se obtiene una mayor actividad celular en muestras polarizadas que en muestras no polarizadas, por lo que tratamientos o modificaciones superficiales por polarización podrían inducir un efecto positivo en los tiempos de recuperación del tejido óseo.

Los recubrimientos de HA depositados sobre PEEK mediante la técnica de proyección térmica de baja temperatura desarrollados por Hupe J. et al. (2013) [12], muestran una buena conservación de fase HA así como una actividad de osteointegración y citotoxicidad nula; el modelo utilizado para los ensayos in vivo en conejos, así como en los ensayos in vitro para la línea celular mesenquimal de medula ósea humana, fueron realizados mediante la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y en el ensayo MTT para

evaluar la citotoxicidad se realizó por expresión de –Formazan . Para la microtomografía computarizada y el análisis histológico reportaron que en un periodo de cuatro semanas el implante con el recubrimiento no mostró un cambio significativo en el tejido óseo adherido a la prótesis con apenas un 23% de cobertura de prótesis; sin embargo, los valores de adherencia muestran valores significativamente altos para una prótesis recubierta y el sustrato desnudo, alcanzando hasta 90 N/mm de adherencia mediante un ensayo de tensión para extracción de prótesis. Para los ensayos in vitro por expresión de ALP a siete días de contacto celular, el sustrato con recubrimiento mostró una mayor actividad que el sustrato desnudo presentando un incremento del 100% de actividad celular; el mismo comportamiento se observa a 21 días de exposición a carga celular.

El estudio desarrollado por Levingstone, T. et al. (2017) [53], demuestran el impacto que tienen algunas variables durante el proceso de deposición por proyección térmica por plasma para un recubrimiento base HA. Dentro de los parámetros de prueba, se encuentra la inyección de los polvos, la corriente del sistema, distancia de proyección y la presión del gas de acarreo. En el estudio se observa una optimización del recubrimiento así como algunas evaluaciones a nivel in vitro por expresión de proteínas específicas como lo es la osteocalcina (OC), sin embargo, la actividad descrita por los autores es por debajo de la muestra control de Ti6Al4V.

5.2 Efecto piezoeléctrico de la HA y caracterización de piezorespuesta

C. Halperin et al.[41], realizaron un estudio de piezorespuesta en tibia humana, el cual se llevó a cabo bajo dos condiciones: hueso fresco y hueso seco; ambas mostraron una respuesta piezoeléctrica positiva; dicho fenómeno es atribuido al arreglo de la estructura del colágeno y no a la hidroxiapatita. La respuesta tanto en hueso seco como en hueso fresco presenta el mismo comportamiento de piezorespuesta, mostrando una respuesta lineal de incremento conforme a la polarización del hueso

Y. Utsun et al. (2008) [47], desarrollaron un estudio del efecto del ultrasonido de baja intensidad en la osteointegración de implantes estructurales en un modelo in vivo; el implante utilizado es una aleación de Ti6Al7Nb en la que fue evaluado el torque necesario para desprender el tornillo del tejido óseo regenerado. Los resultados a los

pocos días no mostraron un efecto significativo de adherencia hacia el sustrato, sin embargo, posterior a las cuatro semanas de exposición se observó una adherencia de un 8.5% mayor al control. En el análisis morfológico se muestran una mayor densidad del tejido óseo formado, el cual es provocado por la aplicación de ultrasonido.

De acuerdo con S. Bodhak et al. (2010) [54], en su estudio del efecto de la polarización para pretratamiento de un recubrimiento de HA en ensayos in vitro, observaron resultados significativos, principalmente para los que sufrieron una polarización negativa, mostrando una mayor actividad celular, lo cual, indica ser un pretratamiento prometedor para la aceleración de regeneración ósea.

5.3 Biomateriales piezoeléctricos de BaTiO₃ y HA-BaTiO₃; caracterización, ensayos in vitro e in vivo.

Zhiguo X. et al. (2014) [55], realizaron el estudio del efecto piezoeléctrico de un recubrimiento por proyección térmica por plasma de BaTiO₃, donde se observó que dichos recubrimientos se ven afectados en cierta proporción debido a la proyección térmica; la disminución de propiedades piezoeléctricas está dada principalmente por la degradación de fases de BaTiO₃ a TiO y BaO. Sin embargo, a pesar de esta degradación, los recubrimientos muestran una respuesta piezoeléctrica. Por otra parte, en los ensayos de tensión del material se observó que la adherencia nominal para el recubrimiento BaTiO₃ arrojaba valores de 42 MPa.

F. Jianqing et. al.[31], desarrollaron la síntesis de un biocerámico con propiedades piezoeléctricas “HA-BT” (hidroxiapatita-titanato de bario) mediante prensado isostático, seguida de un proceso de sinterizado y polarización para aplicación de regeneración de tejido óseo. Los resultados obtenidos por caracterización DRX mostraron que no estuvo presente alguna degradación ni aparición de fases secundarias propias del proceso de sinterizado. El análisis histológico para los ensayos in vivo en un modelo implantado sobre mandíbulas en caninos mostró una actividad de osteconducción favorable principalmente en la dirección de la polarización del material.

Los estudios de bioactividad realizados por D. Zhang et al. en biocompositos desarrollados a partir de HA y BaTiO₃, así como el efecto de influencia de porosidad (40,

50, 60% de porosidad) y el tratamiento de polarización de sustratos mediante ensayos in-vitro con línea celular MG-63 correspondiente a osteosarcoma humano (fibroblastos), demostraron una influencia considerable en la actividad celular debido a la porosidad del sustrato. La expresión de fosfatasa alcalina máxima alcanzada fue de 5.7 ng/ml a tiempo máximo de 14 días correspondiente para la muestra de 50% de porosidad, sin embargo, no se muestra un efecto significativo de actividad celular debida a la polarización.

6 MARCO TEORICO

En este capítulo se hace una definición de los principales conceptos en los cuales se basa la presente investigación para el desarrollo de un biorecubrimiento osteoconductor para su aplicación en prótesis ortopédicas óseas

6.1.1 Tejido Óseo

La composición del tejido óseo, en promedio, está constituida por un 25% de fase acuosa, 45% de materia inorgánica y el 35% de materia orgánica. La materia inorgánica está conformada principalmente de hidroxiapatita (HA) y otras fases secundarias en menor proporción como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaO , CaCO_3 , $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ y NaCaPO_4 [56-57]. Por otra, dentro de los constituyentes de la materia orgánica se encuentra principalmente el colágeno tipo 1, cerca del 95%, el cual se encuentra en forma de fibrillas mientras que el resto lo conforman las proteínas no colágenas como las proteínas especializadas.

El hueso es un tejido conjuntivo especializado cuya composición y organización brinda soporte al cuerpo, que además, de acuerdo con su dinámica química interviene en procesos de homeostasis mineral al ser la reserva principal de minerales en el organismo e interviene en procesos de regulación endocrina por la secreción de proteínas especializadas [56-59].

6.1.2 Proteínas óseas especializadas

El hueso no solo juega un papel importante como tejido estructural en el cuerpo biológico, sino también importantes primordial en la regulación endocrina mediante la secreción de algunas proteínas especializadas como lo es la osteocalcina (OC) [58-60]. La OC también conocida como proteína Gla, es la proteína no colágena más abundante en tejido óseo. A nivel estructural la OC es una proteína de bajo peso molecular y cuenta con una cadena de 46 aminoácidos dentro de su estructura; contiene tres residuos del aminoácido ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) que en presencia de calcio promueve la unión a la HA para su posterior acumulación en la matriz ósea.

La OC es sintetizada y secretada principalmente por osteoblastos maduros y osteocitos, los cuales son células responsables de la síntesis y mineralización de la matriz ósea durante el desarrollo del esqueleto y su regeneración periódica a lo largo de la vida.

Además de jugar un papel importante en la regeneración y procesos de mineralización ósea, la OC también interviene en otros procesos como la secreción de insulina de células B pancreáticas y promoción de la sensibilidad a la insulina en órganos diana. De acuerdo con Conigrave *et al.* (2015) [59] la osteocalcina también puede desempeñar un papel en la producción de testosterona y fertilidad masculina.

6.1.2.1 Propiedades del hueso

El tejido óseo es un material complejo y dinámico debido a que está constantemente regenerándose y sufriendo cambios de remodelado. Dentro de sus propiedades se encuentra la respuesta piezoeléctrica; dicha propiedad se le ha atribuido al remodelado óseo. Los valores de piezorespuesta del hueso oscilan entre los 0.7 a los 2.3 pC/N [41-45], [61-62].

En la industria médica se han desarrollado diferentes técnicas para inducir la piezorespuesta y promover una regeneración del tejido afectado; dentro de estas técnicas se encuentra la inducción por impulsos eléctricos, radiofrecuencia monopolar y ultrasonido pulsado de baja intensidad (de 1 a 3 MHz), siendo esta última la que presentan los mejores resultados al inducir un efecto más localizado [44], [47-5], [64-66]. La función del ultrasonido pulsado es que por medio de ondas de sonido se genera un estrés mecánico sobre el tejido óseo, y de esta manera se induce el efecto piezoeléctrico, ayudando a estimular el tejido óseo a nivel celular y promoviendo la regeneración del tejido dañado.

6.2 Biomateriales

De acuerdo con la literatura, se puede identificar a los biomateriales como aquellos materiales capaces de interactuar con un tejido biológico sin generar una respuesta negativa [1-2], [67].

De acuerdo con la literatura, se puede identificar a los biomateriales como aquellos materiales capaces de interactuar con un tejido biológico sin generar una respuesta negativa [1-2], [67].

Los biomateriales cuentan con propiedades especiales que marcan una línea estricta que los diferencia ante cualquier material para su aplicación. Dentro de estas propiedades se destacan las siguientes [1-2], [67]:

- **Biocompatibilidad:** Es aquella cualidad de los materiales que tienen una respuesta positiva en el tejido huésped sin generar un rechazo por el medio biológico, modificar el tejido o promover la muerte celular.
- **Citotoxicidad nula:** Es el tipo de respuesta que debe tener un biomaterial al entrar en contacto con el tejido orgánico, es decir, que no deben generar una reacción alérgica, toxica o promover la modificación y muerte celular
- **Propiedades mecánicas adecuadas:** Los materiales dentro de un cuerpo biológico (sobre todo los que están destinados al sistema locomotor) son expuestos a grandes esfuerzos mecánicos, por lo que la selección del material adecuado será primordial para efectos de la vida útil del biomaterial. Por tanto, se deben tomar en cuenta las siguientes cualidades:
 - Resistencia a la fatiga aplicada por una tensión.
 - Elasticidad y rigidez del material para soportar cargas sin deformación.
 - Elongación del material por tensión.
 - Tenacidad a la fractura alta para evitar la propagación de grietas y posible fractura por soportar una carga o tensión.
- **Estabilidad química:** Siempre que se habla sobre un biomaterial se espera que sean inertes, es decir, que no presenten alguna reacción con el tejido y que a su vez puedan soportar el ambiente agresivo del cuerpo. Los fluidos corporales son ricos en electrolitos los cuales generan un ambiente agresivo para los materiales metálicos y poliméricos ocasionando una desestabilidad química y por ende una degradación de los materiales, cambiando la estructura e incluso la biocompatibilidad de los materiales. Sin embargo, en la actualidad algunos materiales están diseñados para interactuar con el sistema biológico, por lo que su estabilidad química implica a que solo se lleve a cabo una reacción específica.
- **Resistencia a procesos de esterilización:** Algunas técnicas de esterilización llegan a ser poco adecuadas en algunos materiales, por tanto llegan a ocasionar una transformación y/o degradación en su estructura química o cristalina.

- Diseño y arquitectura perfecta: El diseño y modelación del implante debe ser adecuado, incluso perfecto para que este pueda desempeñar la función del tejido, articulación o parte del cuerpo el cual sustituirá.

6.3 Evaluación de biomateriales

En la industria de biomateriales la experimentación a nivel in vitro es una de las etapas más importantes durante su caracterización, pues dichos ensayos ayudan a predecir el comportamiento, eficiencia, compatibilidad, citotoxicidad y propiedades específicas que puedan tener los biomateriales. La importancia de la experimentación in vitro radica en que es la primera etapa en la fase biológica que deben cumplir antes de proseguir a las demás etapas para su desarrollo [68-69]. La Figura 1 muestra los principales etapas que conlleva el desarrollo de un biomaterial.

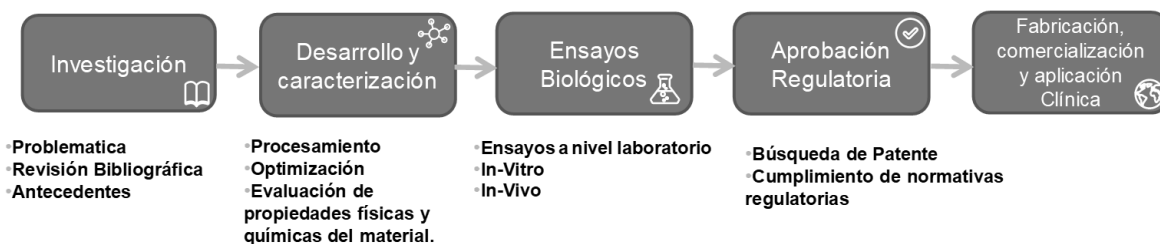


Figura 1 Esquema representativo de etapas para el desarrollo de un biomaterial.

6.4 Biomateriales para regeneración ósea

Históricamente la experimentación con biomateriales osteoconductores se remonta desde los años 20's, donde F.H Albee y H. Morrison realizaron estudios para el desarrollo de materiales que fueran capaces de generar una restauración ósea en base a polvos cerámicos de fosfato tricálcico en solución acuosa. Lo que catapultó a Albee y H. Morrison como los pioneros en la investigación de biomateriales dedicados a la regeneración ósea, teniendo resultados satisfactorios para la aplicación de estos materiales [70].

En la actualidad existen una gran variedad de materiales cerámicos que han sido utilizados como biomateriales osteoconductores; estos cerámicos están compuestos principalmente de fosfatos de calcio, destacando la hidroxiapatita (HA), los fosfatos tricálcicos (α -TCP y β -TCP), el fosfato dicálcico di hidratado (DCPD), el fosfato dicálcico anhidro (DCPA) y el

fosfato tetracálcico (TTCP). Dichos compuestos presentan una relación Ca/P cercana a la del tejido óseo, la cual representa un factor importante en la bioactividad ya que permite un intercambio iónico en el cuerpo, favoreciendo la remineralización y osteoconducción [1-2, 71-72].

Otro factor importante que influye en la bioactividad de los materiales osteoconductores es la cinética de biodegradación o biorreabsorción, la cual no debe ser tan rápida, ya que al tener una absorción acelerada ésta no permite la colonización por células óseas, repercutiendo en la estabilidad del implante, su anclaje y en la regeneración del hueso. En la tabla 1 se muestra los diferentes fosfatos de calcio, así como su relación molar Ca/P y constante de solubilidad [71-73].

Tabla 1 Compuestos de fosfato de calcio, su relación Ca/P y constante de solubilidad.

Nombre	Abreviatura	Formula Química	Relación Ca/P	Solubilidad Ksp 25°C
Hueso Humano	--	--	1.6-1.71	
Fosfato Tetracálcico	TTCP	Ca ₄ O(PO ₄) ₂	2.0	38
Hidroxiapatita	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.67	60
Hidroxiapatita deficiente en calcio	DCHA	Ca ₉ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.5	58
Fosfato tricálcico (α y β)	TCP	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.5	25-28
Fosfato dicálcico anhidro	DCPA	CaHPO ₄	1.0	6.9
Fosfato dicálcico di hidratado	DCPD	CaHPO ₄ *2 H ₂ O	1.0	6.59
Fosfato monocálcico anhidro	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.5	Altamente solubles
Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.5	

6.4.1 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] al ser un biomaterial presente tanto en la naturaleza como en los cuerpos biológicos, se ha posicionado como uno de los principales objetos de estudio debido a sus propiedades y su relación molar Ca/P similar a la del hueso. Empleándola como un biomaterial para promover la regeneración de tejido óseo [71-73]. A diferencia de los otros compuestos a base de fosfatos de calcio, la HA presenta una baja solubilidad ante los fluidos corporales, lo que la vuelve útil en el desarrollo de dispositivos osteointegradores, ya sea para estar presente en una matriz polimérica y cerámica (andamios

osteoconductores), cementos óseos, y/o en forma de recubrimiento para implantes metálicos [10-14], [73-74].

6.5 Modificación superficial en materiales

Dentro de las principales desventajas para el uso materiales metálicos en el desarrollo de implantes ortopédicos, destacan su baja biocompatibilidad y baja estabilidad química que muestran ante un medio biológico. Debido a estas deficiencias, los materiales metálicos a lo largo del tiempo tienden a la formación de un tejido fibroso (encapsulamiento), el cual muestra bajas propiedades de adherencia en la interfase implante-tejido y aumenta el riesgo de falla de este. El avance en la tecnología para la funcionalización de superficies mediante la aplicación de recubrimientos ha permitido el desarrollo de biomateriales multifuncionales, los cuales tienen como principal objetivo promover la interacción con el tejido adyacente evitando la formación de un tejido fibroso y evitando el encapsulamiento de la prótesis [4-15].

En los últimos años se han reportado diferentes técnicas de modificación superficial para la aplicación de recubrimientos a base de HA en implantes ortopédicos óseos, destacando las técnicas de dip coating, ablación por láser, prensado isostático, electroforesis, ion beam, sol-gel y proyección térmica; siendo esta ultima la técnica más aceptada comercialmente. En la Tabla 2, se muestran las diferentes técnicas utilizadas para la aplicación de recubrimientos a base de HA con sus principales ventajas y desventajas.

Tabla 2 Técnicas aplicadas para recubrimientos base HA; ventajas y desventajas.

Técnica	Ventajas	Desventajas
Dip-Coating Sun et al. (2001) [75] Mucalo (2015) [5]	Espesor $\sim 2 \mu\text{m}$ –0.5 mm <ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Recubrimiento de superficies complejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Altas temperaturas de sinterizado • Degradación térmica
Sol-Gel Narayanan et al.(2008) [76]	Espesor $< 1\mu$ <ul style="list-style-type: none"> • Bajas temperaturas de procesamiento • Recubrimiento de superficies complejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Atmosferas controladas para el procesamiento • Alto costo
Electroforesis Sun et al. (2001) [75]	Espesor ~ 0.1 .-2.0 mm <ul style="list-style-type: none"> • Espesores uniformes • Elevadas velocidades de deposición • Recubrimiento de superficies complejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de fallas superficiales • Altas temperaturas de procesamiento • Espesores no uniformes
Prensado isostático Sun et al. (2001) [75] Surmenev et al (2012) [6]	Espesor ~ 0.2 .-2.0 mm <ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos densos 	<ul style="list-style-type: none"> • Ineficiente en recubrimiento de superficies complejas • Esfuerzos residuales debido a la expansión térmica • Propiedades mecánicas irregulares
Ion beam Yang Y. et al (2005) [77] Surmenev et al. (2012) [6]	Espesor ~ 0.03 - $4\mu\text{m}$ <ul style="list-style-type: none"> • Espesores uniformes • Recubrimientos libres de poros • Alta adherencia interfacial ($\sim 70 \text{ MPa}$) 	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos de baja cristalinidad • Alto costo

Ablación laser Surmenev et al (2012) [6] Narayanan et al. (2008) [76]	Espesor ~ 0.05- 10µm <ul style="list-style-type: none"> • Presencia de Fase amorfa y fasee cristalina • Recubrimientos densos y porosos • Buena adherencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo • Altas temperaturas de calentamiento son requeridas en el proceso para alcanzar una buena cristalinidad
Proyección térmica Surmenev et al (2012) [6] Narayanan et al. (2008) [76] Sun et al. (2001) [75] Mucalo (2015) [5]	Espesor ~ 30- 300µm <ul style="list-style-type: none"> • Altas velocidades de deposición • Bajo costo 	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de los componentes debido a las altas temperaturas • Cantidad significativa de variables en el proceso

6.5.1 Proyección térmica por plasma

Esta técnica tiene la versatilidad de desarrollar recubrimientos cerámicos, metálicos e incluso composites [5], [6], [76], [78-79]. A diferencia de otras técnicas la proyección térmica por plasma genera recubrimientos con una mejor adherencia, porosidad o rugosidad lo que puede ayudar a tener un bajo nivel de desgaste del material y promover la adherencia celular sobre la superficie. Otra de las principales ventajas de este sistema, es su actual aplicación a nivel industrial para generación de recubrimientos a base de HA, la cual es una de las pocas técnicas avaladas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (“Food And Droug Administration” FDA) , quien es la agencia reguladora de Estados Unidos para la comercialización de alimentos, medicamentos, cosméticos, equipos médicos, aparatos médicos, y productos biológicos tanto para aplicación animal como en humanos [5], [76], [78-79].

7 MATERIALES Y METODOS

En la presente sección se mencionan los materiales utilizados para el desarrollo de los recubrimientos, así mismo, se describen de manera breve cada una de las técnicas utilizadas para la caracterización, así como los parámetros utilizados en de estas. En la Figura 2 se muestra un esquema representativo en la cual está dividida la metodología experimental.

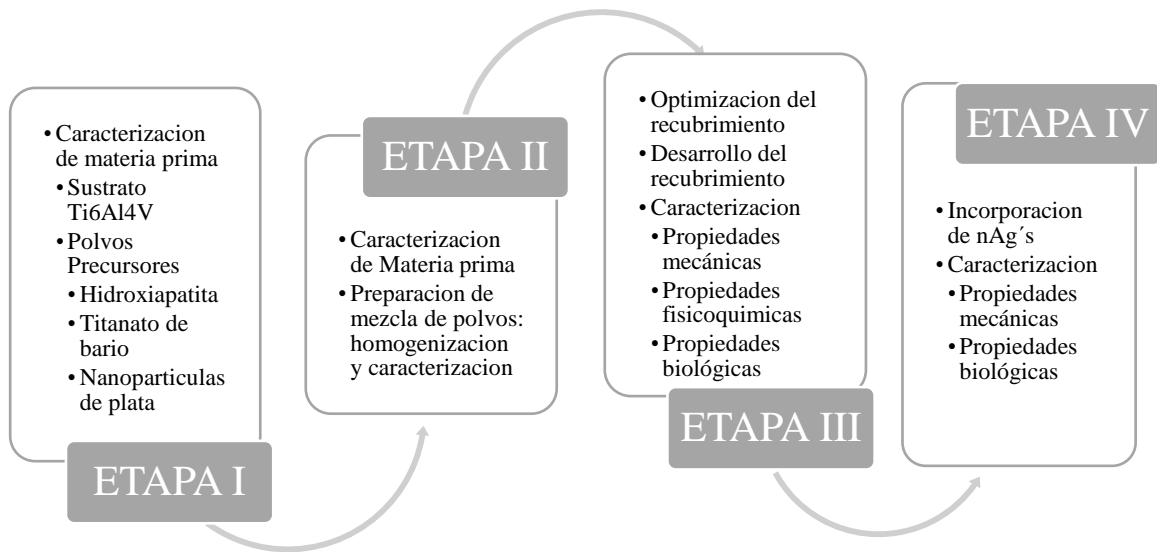


Figura 2 Esquema, división de etapas de metodología experimental.

7.1 Etapa I: Caracterización de materia prima

En esta etapa se llevó a cabo la caracterización de polvos precursores del recubrimiento, así como el sustrato utilizado para la aplicación del recubrimiento.

7.1.1 Materiales

El sustrato utilizado para la presente investigación consiste en una aleación de titanio *alfa-beta* grado 23 (UNS R56401) o Ti6Al4V-ELI (Extra-Low Intersticial), que a diferencia de la aleación *alfa-beta* grado 5, esta aleación presenta una estructura más compacta, lo que disminuye la cantidad de algunos elementos intersticiales (O, N, C)

promoviendo una mayor resistencia a la corrosión y alta tenacidad; lo que lo hace un material estable en medios corrosivos y al someterlo a cargas cíclicas. Actualmente debido a estas propiedades, la aleación grado 23 es utilizada principalmente para aplicaciones médicas en la fabricación de implantes ortopédicos estructurales, logrando sustituir ampliamente a las otras aleaciones metálicas utilizadas. En la tabla 3 se muestra la composición de la aleación de Ti, la grado 23 y su casi homóloga grado 5.

Tabla 3 Composición elemental para las aleaciones Ti6Al4V grado 23 y grado 5.

PORCENTAJE EN PESO (%P/P)								
ALEACIÓN	C máx.	Fe máx.	H máx.	N máx.	O máx.	V máx.	Al máx.	Ti
GRADO 23	0.08	0.25	0.0125	0.03	0.13	3.5-4.5	5.5-6.5	Balance
GRADO 5	0.1	0.4	0.015	0.05	0.2	3.5-4.5	5.5-7.6	Balance

Para el desarrollo del recubrimiento se utilizó una matriz de partículas de Hidroxiapatita con un diámetro $\approx 45 \mu\text{m}$ (HA, CaP Biomaterials, LCC), la cual brindara las propiedades de osteoconducción al recubrimiento; por otra parte, la adición de nanopartículas de Titanato de Bario con un tamaño de partícula de $\approx 200 \text{ nm}$ (BT, US Research Nanomaterials, Inc.), dicho material presenta propiedades piezoeléctricas.

7.1.1.1 Homogenización de mezcla de polvos

Para la homogenización, las mezclas de polvos precursores de recubrimiento fueron sometidas a un tratamiento de molienda mecánica en un molino de alta energía (SPEX 8000M). El medio de molienda utilizado fue mediante bolas de zirconia estabilizada con itria (YSZ 8%mol), los diámetros del medio de molienda fueron de 1 cm y 0.5 cm a una relación masa-bola de 2:1, la molienda se realizó durante 25 min con 0.2 mL de alcohol como agente de control.

7.1.1.2 Preparación de muestras para proyección térmica

Previo a la proyección del recubrimiento, las muestras fueron sometidas a un tratamiento superficial para mejorar el perfil de anclaje. Este tratamiento se realizó por medio de un proceso de granallado superficial (Shot Blasting) mediante partículas de corindón con un tamaño de grano No. 20 (Tamaño de partícula $\approx 1.3 \text{ mm}$ de diámetro). Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una limpieza con ultrasonido durante un tiempo total de 30 min en una solución de alcohol de alta pureza (99.9%),

7.1.2 Caracterización de materia prima

7.1.2.1 Difracción de rayos X

Para la obtención del patrón de difracción de rayos X (DRX) se utilizó una geometría de tipo Bragg-Brentano, los ensayos fueron realizados en un difractómetro Bruker (D8 Advance). El barrido se llevó a cabo desde 20° hasta 60° en 2 θ , a un paso de 0.05° en 2 θ por cada 60 segundos. La máscara utilizada durante el análisis fue de 15 mm. Este análisis se llevó a cabo para el sustrato y cada una de las muestras en polvo, polvos iniciales y diferentes mezclas. Para el análisis fue requerido el uso del software Match Crystal Impact (versión 1.11) [1]

7.1.2.2 Espectroscopia Raman

Para el análisis, fue utilizado un barrido desde 100cm⁻¹ hasta 1400cm⁻¹ en Raman shift, el ensayo fue realizado mediante un espectrofotómetro Raman HORIBA (LabRam HR, Vis-633nm). Debido a la naturaleza de las muestras, este ensayo solo fue realizado a los polvos precursores de recubrimiento, polvos iniciales, así como para la mezcla de polvos.

7.1.2.3 Microscopia electrónica de barrido

Para observar la morfología inicial de los polvos precursores de recubrimiento y el impacto de la molienda mecánica se empleó la técnica de microscopia electrónica de barrido (MEB) HITACHI (SU3500). Para el análisis, las muestras en polvo fueron soportadas en una lámina de silicio; para ello, los polvos fueron resuspendidas en una solución de etanol de alta pureza mediante un baño ultrasónico, posteriormente se tomó una alícuota de la solución y se colocó sobre una lámina de silicio, se dejó secar a 100°C durante 1 hora para proceder al análisis.

7.2 Etapa II: Desarrollo de los recubrimientos HABT

En esta etapa se describe la metodología empleada para el desarrollo de los recubrimientos, desde la preparación del sustrato y parámetros utilizados para el desarrollo de los recubrimientos mediante la técnica de proyección térmica por plasma.

7.2.1 Preparación de muestras para proyección térmica

Previo a la proyección del recubrimiento, los sustratos de Ti grado 23 fueron sometidos a un tratamiento superficial de granallado o “shot blasting” para mejorar el perfil de anclaje. El tratamiento se realizó por medio de partículas de corindón con tamaño de grano No. 20 (Tamaño de partícula \approx 1.3mm de diámetro), las cuales son proyectadas sobre la superficie del sustrato con aire a presión de 110 Psi. Posteriormente, las muestras

fueron sometidas a una limpieza con ultrasonido durante un tiempo total de 30 min en una solución de alcohol de alta pureza (99.9%),

7.2.2 Proyección Térmica por Plasma

Para la proyección del recubrimiento fue utilizado el equipo de proyección térmica por plasma PRAXAIR Surface Technologies (SG100). Los parámetros de proyección térmica utilizados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Parámetros de proyección térmica por plasma.

Parámetros	
Gas primario Ar (psi)	50
Gas Secundario He (psi)	110
Gas de Acarreo Ar (psi)	55-60
Voltaje (V)	32
Corriente (A)	650
Inyección de polvos (lb/hr)	2

7.3 Etapa III: Caracterización de los recubrimientos

En esta etapa se describe la metodología empleada para la optimización y desarrollo de los recubrimientos base HA/BT.

7.3.1 Optimización del recubrimiento

En esta sección se describen las metodologías utilizadas para la optimización y desarrollo de los recubrimientos. Para la selección de la metodología de recubrimiento se consideraron algunos criterios de inclusión y exclusión. Únicamente para esta sección fueron utilizadas las nanopartículas de zirconia estabilizada con itria (YSZ 8% mol, Inframat Advanced Materials) para el desarrollo de algunos recubrimientos. A continuación, se muestran los criterios de inclusión-exclusión para la optimización del recubrimiento.

7.3.1.1 Criterios de inclusión

- Distribución de fases: una de las principales características de un material compuesto es una buena distribución de fases en la matriz del material, la cual puede brindar un comportamiento homogéneo en cuanto a sus propiedades. La mala distribución puede generar un comportamiento heterogéneo en cuanto a propiedades e incluso promover la falla de este.
- Adherencia visual: a través de microscopía electrónica de barrido en sección transversal se analizó la interfase del recubrimiento y sustrato. Ya que las fallas

presentes en esta región podrían incidir en una mala adherencia del recubrimiento hacia el sustrato.

- Con base a la norma ASTM C633-08 [80] y los criterios establecidos por la FDA basados en la norma ISO13799-4 [81] para el desarrollo de recubrimientos comerciales a base de HA, la adherencia mínima para el desarrollo de un recubrimiento debe ser superior a 15 MPa.

7.3.1.2 Criterios de exclusión

- Mala distribución de fases en el recubrimiento: como se mencionó en el criterio de inclusión, la mala distribución del material puede mostrar un comportamiento heterogéneo en cuanto a las propiedades deseadas del material, e incluso la presencia de puntos de falla de este; por lo que un exceso de aglomeraciones en la fase del recubrimiento juega un papel importante como criterio de exclusión.
- Exceso de fallas del recubrimiento: el exceso de estos defectos puede llegar a impactar en la integridad del recubrimiento, por tanto, es uno de los criterios de exclusión para el desarrollo del recubrimiento.
- Adherencia nominal por debajo del límite permisible de acuerdo con la norma ISO 13799-4[81]. Como se mencionó en el punto tres de los criterios de inclusión, la adherencia nominal de los recubrimientos deberá ser superior a los 15 MPa, de lo contrario la metodología de recubrimiento será descartada.

7.3.1.3 Caracterización de acuerdo con los criterios de inclusión-exclusión

En esta etapa de optimización se dividió en dos subetapas para evaluar los recubrimientos.

La primera subetapa consistió en el análisis visual del recubrimiento, tanto en sección superficial como en sección transversal empleando el microscopio electrónico de barrido HITACHI (SU3500), se implementó la técnica de electrones retrodispersados para observar la dispersión de fases del recubrimiento con el fin de evaluar el primer criterio

de inclusión. Así como también la integridad del recubrimiento, la cual corresponde al segundo criterio de inclusión.

La segunda subetapa consta de la evaluación de adherencia nominal con base a la norma ASTM C633-08 [80]; únicamente los recubrimientos que pasen los criterios de inclusión en la primera subetapa serán evaluados.

Para la determinación de la adherencia nominal y clasificación de la falla cohesiva/adhesiva, se utilizó la metodología descrita en la norma ASTM C-633[2]. Para el ensayo de tensión, se fabricaron fixturas de 1 pulgada de diámetro de la aleación de Ti grado 23. Subsiguientemente las fixturas fueron preparadas de acuerdo con la metodología descrita en la sección 5.2.1.

Para el ensayo de adherencia fue necesario el armado de las fixturas de tensión. Para este armado, se aplicó sobre la superficie de la fixtura recubierta un adhesivo epóxico (Armstrong Epoxi Adhesives A12, ARMSTRONG PRODUCTS CO.), posteriormente, se le colocó el dado superior sin recubrimiento y finalmente se realizó el proceso de curado del epóxico a 97°C durante 1 hora en horno de secado BINDER (FD260).

Para el ensayo de adherencia, las probetas se colocaron en la maquina universal INSTROM (modelo 3282, 10 Ton) sometiénolas a una tensión uniaxial de 0.013 mm/min hasta el punto de fallo. Para el análisis visual se utilizó el software image J [82].

7.3.1.4 Metodologías de recubrimiento

En la tabla 5 se muestran las diferentes metodologías utilizadas para la optimización y desarrollo del recubrimiento base HA-BT

Para las configuraciones tipo I, IV y V se utilizó una configuración de recubrimiento primario, y únicamente el recubrimiento tipo I mostró una composición de tres fases en la matriz del recubrimiento, siendo HA-BT-YSZ

Para las configuraciones tipo II y III fue utilizada una configuración de recubrimiento primario base HA con 10% de nanopartículas de zirconia. Posteriormente, se realizó la deposición del recubrimiento secundario a base de HA-BT. Únicamente para el recubrimiento tipo III fue utilizado un tratamiento térmico previo a la deposición del recubrimiento secundario.

Tabla 5 Metodología para el desarrollo del recubrimiento, nomenclatura y respectivas composiciones para los recubrimientos.

Metodología	Homogenización	Descripción	Composición			Nomenclatura
			HA	BT	YSZ	
Tipo I	Molienda	Recubrimiento	81.9	10	8.1	HA8.1Z10BT
	Mecánica	primario	41.9	50	8.1	HA8.1Z50BT
Tipo II	Molienda	Recubrimiento	90	-	10	HA10BT-S
	Mecánica	primario				
	Agitación	Recubrimiento secundario	90	10	-	
	Molienda	Recubrimiento	90	-	10	HA50BT-S
	Mecánica	primario				
Agitación	Recubrimiento Secundario	50	50	-		
Tipo III	Molienda	Recubrimiento	90	-	10	HA10BT-S450
	Mecánica	primario				
	Agitación	Recubrimiento secundario + tratamiento 450°C	90	10	-	
	Molienda	Recubrimiento	90	-	10	HA50BT-S450
Mecánica	primario					
Agitación	Recubrimiento Secundario + tratamiento 450°C	50	50	-		
Tipo IV	Agitación	Recubrimiento	90	10	-	HA10BT-A
		Primario	50	50	-	HA50BT-A
Tipo V	Molienda	Recubrimiento	90	10	-	HA10BT-M
	Mecánica	primario	50	50	-	HA50BT-M

7.3.2 Caracterización Física y Fisicoquímica: Recubrimiento Optimizado HA-BT

Para esta etapa se utilizaron tres diferentes concentraciones de HA-BT para evaluar el impacto de BT sobre la matriz del recubrimiento. En la tabla 6 se muestran la nomenclatura utilizada para los recubrimientos y las diferentes relaciones %P/P.

Tabla 6 Relación % en peso de polvos utilizada para formación de recubrimiento.

Nomenclatura	Relación % P/P	
	HA	BT
BT	0	100
HA	100	--
90H10BT	90	10
70H30BT	70	30
50H50BT	50	50

7.3.2.1 *Microscopia electrónica de barrido*

Debido a la naturaleza de los recubrimientos, el análisis se realizó por MEB de presión variable HITACHI (SU3500) en modo de bajo vacío (60-80Pa).

Los recubrimientos se analizaron en sección superficial y sección transversal, utilizando las técnicas de electrones secundarios (SE, por sus siglas en inglés) para observar la morfología, electrones retrodispersados (BSE, por sus siglas en inglés) para obtener imágenes de contraste y finalmente, con la dispersión de energía de rayos X (EDS, por sus siglas en inglés) se realizó el análisis semicuantitativo de las muestras.

Las muestras en sección transversal fueron cortadas con una cortadora de baja revolución BEUHLER (ISOMET), se prosiguió a limpiarlas en ultrasonido en una solución de etanol (99.9%), a continuación las muestras fueron soportadas en baquelita, se realizó el desbaste y pulido hasta acabado espejo.

7.3.2.2 *Análisis de fases y estructura cristalina*

El análisis de fases y estructura cristalina se llevó a cabo por medio de las técnicas de DRX y espectroscopia Raman, esto con el fin de elucidar las fases cristalinas presentes en el recubrimiento, así como los posibles cambios dados a la degradación térmica que pudiesen presentarse durante el proceso de proyección térmica.

Para le análisis DRX de los recubrimientos se utilizó una geometría de tipo Bragg-Brentano en un difractorómetro Bruker (D8 ADVANCE). El barrido se llevó a cabo desde 20° hasta 60° en 2 θ , a un paso de 0.05° en 2 θ por cada 60 segundos y una máscara 15 mm. El análisis de los patrones de difracción fue utilizado del software Match Crystal Impact (versión 1.11) [83].

Para el estudio por espectroscopia Raman se utilizó un barrido desde 100cm^{-1} hasta 1400cm^{-1} en Raman shift, el ensayo fue realizado mediante un espectrofotómetro Raman HORIBA (LabRam HR, Vis-633nm).

7.3.2.3 Adherencia del recubrimiento

Para la determinación de la adherencia nominal y clasificación de la falla cohesiva/adhesiva, se utilizó la metodología descrita en la norma ASTM C-633[81] para la evaluación de recubrimientos por proyección térmica por plasma.

Para el ensayo de tensión, se fabricaron dados de 1 pulgada de diámetro de la aleación de Ti grado 23. Posteriormente, los dados fueron sometidos al proceso de *shot blasting* en la cara transversal del dado, seguido de la limpieza y aplicación del recubrimiento con los parámetros previamente descritos.

Para el ensayo de adherencia fue necesario el armado de las fixturas de tensión. Para el armado se aplicó sobre la superficie de la fixtura recubierto un adhesivo epóxico (Armstrong Epoxy Adhesives A12, ARMSTRONG PRODUCTS CO.), subsecuentemente se colocó el dado superior sin recubrimiento y se curó a 97°C durante 1 hora en horno de secado BINDER (FD260).

Para el ensayo de adherencia, las probetas se colocaron en la maquina universal INSTROM (modelo 3282, 10 Ton) se sometieron a una tensión uniaxial de 0.013 mm/min hasta el punto de fallo, como blanco de referencia fue utilizado probetas con epóxico sin recubrimiento. En la Figura 3 se muestra un esquema de la probeta para el ensayo de adherencia del recubrimiento por tensión uniaxial en base a la norma ASTM C633 [81].

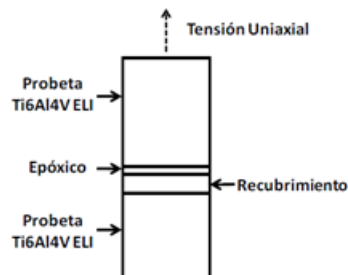


Figura 3 Esquema representativo de probeta para ensayo de adherencia del recubrimiento empleando tensión uniaxial.

7.3.2.4 *Propiedades mecánicas: nanoindentación*

Las propiedades nano mecánicas como rigidez (S), módulo de elasticidad (E) y dureza (H) se evaluaron mediante nanoindentación, utilizando un nanoindentador (Agilent Technologies modelo G200, Arizona, EE. UU.) Acoplado con un cabezal DCM. En el análisis de la curva de carga-desplazamiento de nanoindentación (P-h) se estableció con base en la teoría del contacto elástico dada por Sneddon [84-86]. La rigidez se determinó mediante las ecuaciones de Sneddon, en la cual:

$$S = 2\beta \sqrt{\frac{A}{\pi}} E_r \quad (1)$$

Donde β es una constante que depende de la geometría del indentador ($\beta = 1.034$ para un indentador de Berkovich), E_r es el módulo de elasticidad reducido, lo que explica el hecho de que la deformación elástica ocurre tanto en la muestra como en el indentador, y A es el área de contacto que es función de la profundidad de penetración o del desplazamiento (h) [84]. El módulo elástico, E, se puede calcular considerando la conformidad de la muestra y la punta del penetrador combinados en serie;

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu}{E} + \frac{1-\nu_i}{E_i} \quad (2)$$

Donde E_i , E y ν_i , ν son el módulo elástico y la relación de Poisson entre el penetrador de diamante y la muestra, respectivamente. Para el penetrador de diamante se utilizan $E_i = 1140$ GPa y $\nu_i = 0,07$ (manual de Agilent G200, tecnología Agilent EE. UU.). La dureza (H) se calculó usando la ecuación:

$$H = \frac{P_{max}}{A(h)} \quad (3)$$

Donde la dureza (H) está dada por la carga aplicada sobre la muestra (P_{max}) entre la profundidad de la huella de indentación, la cual está dada por el área de penetración (A) y la altura.

7.3.2.5 *Respuesta piezoeléctrica*

Para el ensayo piezorespuesta fue utilizado el microscopio de fuerza atómica (AFM) Oxford Instruments (Asylum Research MFP-3D Infinity) empleando el módulo PFM-DART. La medición de piezorespuesta se realizó tanto en sección superficial como

transversal del recubrimiento. Para la obtención del coeficiente de piezorespuesta (d_{33}) se realizó la lectura de amplitud vs polarización, para esto, la muestra fue polarizada en un rango de -60V a 60V, la polarización se llevó a cabo por 4 ciclos con una resolución de 0.1Hz.

7.3.2.6 Estabilidad del recubrimiento: Velocidad de corrosión

Para el cálculo de la velocidad de corrosión se utilizó la técnica de resistencia a la polarización (RP), la cual es un método basado en conceptos electroquímicos que permite determinar la velocidad de corrosión y densidad de corriente de intercambio en un medio específico por medio de ensayos, conocido como electrolito. Este modelo fue establecido por Stern-Geary (5), en donde estipula que una ventana de polarización cercana a la E_{corr} permite asemejar el comportamiento electroquímico a un modelo lineal.

El modelo matemático establece una relación entre la densidad de corriente de corrosión y la resistencia de polarización, asemejando el modelo a la ecuación conocida como ley de ohm (4).

$$I = \frac{V}{R} \quad (4)$$

$$I_{corr} = \frac{B}{R_p} \quad (5)$$

La constante B cuyas unidades están dadas en V, representa una relación existente entre las pendientes de Tafel y el modelo lineal propuesto, por lo que es indispensable que el comportamiento del material a analizar presente un comportamiento tafeliano, es decir que presente una pendiente anódica y una pendiente catódica. La ecuación que describe la constante B es la siguiente:

$$B = \frac{B_a B_c}{2.303 * (B_a + B_c)} \quad (6)$$

Donde B_a y B_c son las pendientes de la rama anódica y catódica correspondientemente.

Una vez conocida la i_{corr} y la R_p , la velocidad de corrosión (corrosion rate (CR), por sus siglas en inglés) puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$CR = 3.27 * 10^{-3} \frac{i_{corr} EW}{\rho} \quad (7)$$

Donde EW (por sus siglas en inglés) es el peso equivalente y ρ es la densidad, ambos valores propios del material a análisis.

Para el ensayo de RP las muestras tanto sustrato como recubrimientos fueron colocados en una celda de picado con sistema de calentamiento por glicol, como electrolito se utilizó la solución simuladora de fluido corporal (SBF sus siglas en inglés) desarrollada por Kokubo, la cual presenta una carga electrolítica similar al plasma sanguíneo humano [87]. El uso de la solución SBF permitirá evaluar el desempeño de un material en las condiciones más cercanas a las de su aplicación. En la tabla 7 se muestra la composición de la solución SBF.

Tabla 7 Concentración iónica de plasma sanguíneo humano vs solución SBF de Kokubo [87].

	Concentración iónica (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo Humano	142	5.0	1.5	2.5	103	27.0	1.0	0.5
SBF	142	5.0	1.5	2.5	103	4.2	1.0	0.5

Para el análisis RP se realizó por medio de un potenciostato/galvanostato Autolab (METROHM) con un arreglo de tres electrodos; se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl saturado, un electrodo de Pt como auxiliar y como electrodo de trabajo la muestra de análisis. Las condiciones de análisis que se implementaron fueron las siguientes: una temperatura de trabajo de 36.5°C para simular la temperatura corporal humana; un tiempo de estabilización del sistema por 1200 segundos con medición de potencial de circuito abierto; una ventana de potencial de ± 30 mV vs E_{corr} con una velocidad de escaneo de 10 mV/min. Para el análisis y cálculo de la velocidad de corrosión se utilizó el programa Ivium Soft (IVIUM TECHNOLOGIES) [88].

7.3.3 Caracterización *in vitro*: Ensayos biológicos

Para los ensayos *in vitro* se utilizó la línea celular de osteosarcoma humano (Human Osteosarcoma HOS (ATCC CRL-1543)), la cual tiene la característica de ser células de tipo adherente manteniendo una morfología de tipo fibroblastoide. Dicha línea celular permitirá evaluar la biocompatibilidad, citotoxicidad y actividad celular relacionada a la osteointegración promovida por los recubrimientos.

Para el cultivo celular, se utilizó el medio RPMI-1640 (Rswell Park Memorial Institute, modificación McCoy's 5A) (Sigma Aldrich), el medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Corning) y 1% de penicilina estreptomina (Sigma Aldrich). Para la incubación se utilizó la incubadora HERACELL (VIOS 160i) con atmosfera de CO₂ grado medico a una concentración de 5%, la temperatura de incubación fue de 36.5 ± 0.5°C.

Para los ensayos realizados por inmunofluorescencia y microscopia MEB fue utilizada la celda "lab on a Chip", la cual fue diseñada específicamente para evaluar la influencia de piezorespuesta del material en un modelo *in vitro* mediante la aplicación de LIPUS.

Los tratamientos se sonicaron en el ultrasonido IBRAMED con una potencia de 100mW/cm² y una frecuencia de pulso de 40Hz; los cuales se realizaron después de 24hr de incubación y una periodicidad de 48 horas, el tiempo de tratamiento de ultrasonido se realizó durante 20 segundos.

Para el diseño de la celda se utilizaron diferentes biomateriales, los cuales se muestran en la tabla 8, en la Figura 4 se muestra la celda de cultivo "lab on a chip".

Tabla 8 Materiales utilizados en el diseño de la celda.

Material	Nomenclatura	Formula Química
Policarbonato	PC	(O-(C ₆ H ₄)-C(CH ₃) ₂ -(C ₆ H ₄)-CO) _n
Polimetilmetacrilato	PMMA	(C ₅ O ₂ H ₈) _n
Polidimetilsiloxano	PDMS	(C ₂ H ₆ OSi) _n
Politetrafluoroetileno	PTFE	(C ₂ F ₄) _n

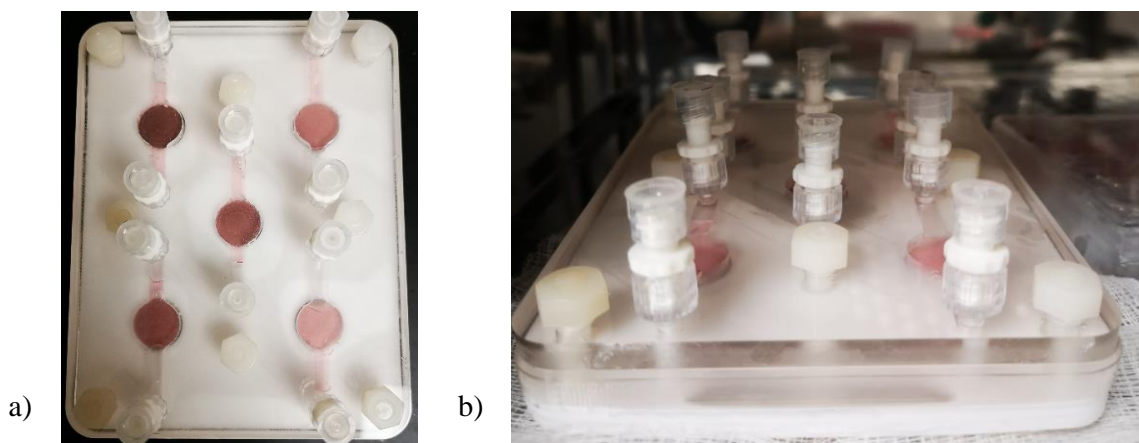


Figura 4 Celda de cultivo "lab on a chip"; en la imagen a) se observan las muestras sometidas a los tratamientos, en la imagen b) se logra observar los puertos de entrada y salida para la adición de medio de cultivo.

7.3.3.1 Citotoxicidad y actividad celular por ensayo MTT

La citotoxicidad celular es definida como una alteración de las funciones celulares básicas causadas por un agente citotóxico, cuya interacción conlleva a que se produzca un daño celular irreversible. Este daño puede ser detectado por medio de marcadores específicos de viabilidad celular. Uno de los marcadores comúnmente utilizado para evaluar la citotoxicidad, es el ensayo por reducción del MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico) a nitro azul de tetrazolio (NBT) o Formazan.

Para la ruta de acción el MTT es captado por las células viables y reducido a Formazan por la acción enzimática de la succínica deshidrogenasa mitocondrial; la capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, la cual es interpretada como una medida de la viabilidad celular y una relación directa en citotoxicidad al compuesto que se evalúa.

La determinación de la citotoxicidad se realizó por contacto indirecto, para esto, las muestras fueron sometidas a un proceso de liberación de iones, los cuales pudiesen tener un comportamiento citotóxico al contacto con las células. Para la liberación de iones, las muestras fueron colocadas en inmersión en 4 mL de medio RPMI-1640 a 37°C por un tiempo de 1, 3, 7 y 21 días. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante para posteriormente ser almacenado a 5°C. El ensayo fue realizado por triplicado para cada uno de los recubrimientos

La actividad celular y/o citotoxicidad a altas y bajas concentraciones de sobrenadante se realizaron diferentes diluciones seriadas, las cuales fueron; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128. Para el ensayo se colocó en la caja de 96 pozos, 50 µL de medio RPMI suplementado a una densidad de 2.5×10^4 células/pozo para cada una de las diluciones a evaluar; las células fueron incubadas por un periodo de 24 horas, posterior a la incubación se agregó 50 µL de cada dilución y se incubó por 24 horas. Una vez transcurrida la incubación, se agregó 20µL de solución MTT y se incubó a $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, por último, los cristales de formazan fueron disueltos con solución de dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma Aldrich) y se procedió a la lectura mediante un espectrofotómetro de placas multiscan (iMark Microplate Reader) a una $\lambda = 595$.

El ensayo se realizó por cuadruplicado para cada una de las muestras y quintuplicado para el blanco control. En la Figura 5 se muestra un esquema representativo de la placa para ensayo MTT.

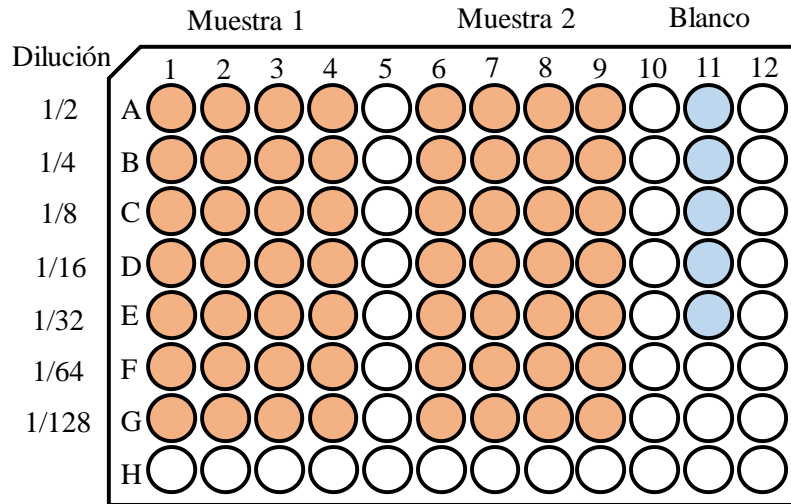


Figura 5 Esquema representativo de placa de 96 pozos para ensayo por MTT.

El cálculo del porcentaje de citotoxicidad de las muestras se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación.

$$Citotoxicidad(\%) = \frac{DO_C - DO_M}{DO_C} * 100 \quad (8)$$

Donde DO_C y DO_M son las absorbancias o densidades ópticas medidas mediante el espectrofotómetro UV-Vis para el control y la muestra con tratamiento respectivamente. Por otra parte se calculó de actividad celular, la cual se llevó a mediante la siguiente ecuación.

$$Viabilidad(\%) = \frac{DO_M}{DO_C} * 100 \quad (9)$$

7.3.3.2 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que permite el análisis mediante la aplicación de inmunomarcadores específicos, tales como los anticuerpos que se encuentran conjugados con marcadores fluorescentes específicos (fluorocromos); los cuales permiten la emisión de fluorescencia que indicaran las regiones donde se expresa el anticuerpo conjugado.

Las muestras fueron colocadas en la celda “lab on a chip” desarrollada previamente, después se le agrego una carga celular de 1.5×10^4 células. Las muestras y controles fueron incubadas durante 3 y 7 días, durante este tiempo se monitoreo su incubación y se realizó el cambio de medio correspondiente.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron fijadas durante 1 hora a 37°C mediante la solución de glutaraldehido a 2.5% en solución de cacodilatos de sodio a 0.1 M, posteriormente se realizaron lavados con solución PBS 1X para eliminar residuos de la solución de fijación. Para neutralizar la fluorescencia del glutaraldehido en las células fijadas, se adicionó borohidruro de sodio al 0.2% P/P. A continuación, las células fueron permeabilizadas por una solución de tritón 100X a 2% V/V en solución de PBS durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de lavados con solución de PBS; y se procedió al bloqueo durante 1 hora a 37°C mediante solución de PBST (PBS Tween 20 0.05%) mas 10% P/P de leche, y finalmente, luego de la exposición se procedió a realizar lavados con solución PBS.

Para la adición de los anticuerpos, éstos fueron diluidos en solución PBST + 1% P/P leche, a una relación en volumen 1:5000 para el anticuerpo primario de Osteocalcina policlonal (OCN, Human-Rabbit/IgG Invitrogen)) y 1:2000 para el marcador secundario (FITC policlonal Goat-AntiRabbit/IgG Invitrogen)). Los anticuerpos fueron adicionados por separado bajo condiciones de incubación por 1 hora a 37°C seguido a lavados con PBS. Después como marcador de citoesqueleto se adicionó la faloidina rodaminada (Abcam) previamente preparada en solución PBST+1% leche a una concentración de 1:1000, se dejó en contacto durante 30 min a 37°C , finalmente se agregó la solución de montaje con marcador de núcleo, solución DAPI (Abcam), se colocó un cubreobjetos en la muestra y se selló con esmalte para su visualización en el microscopio confocal de fluorescencia (Carl Zeiss LSM T-PTM) . El procesamiento de imágenes se realizó mediante el software ZEN-Blue Edition versión 3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) [89].

7.4 Etapa IV: Incorporación de nanopartículas de plata a recubrimiento HA-BT

7.4.1 Desarrollo del recubrimiento

En esta etapa se utilizó la matriz HA-BT con mejor desempeño para la incorporación de nAg-EN, para esto fue utilizada la matriz HA30BT homogenizada mediante el proceso de molienda mecánica.

Para la incorporación de nAg-EN a la matriz HA30BT, se pesaron los polvos de nAgEN al equivalente al 1% P/P de la matriz de HA30BT, después se adicionó a la mezcla en polvos y se sometió a una homogenización por agitación mecánica durante 1 hora a una velocidad de rotación de 50 rpm.

Una vez homogenizada la matriz se procedió a la proyección térmica usando el equipo de proyección térmica PRAXAIR Surface Technologies (SG100), los parámetros de proyección utilizados se muestran en la tabla 9

Tabla 9 Parámetros utilizados para proyección de recubrimiento HA30BTnAg mediante APS.

Parámetros	
Gas primario Ar (psi)	50
Gas Secundario He (psi)	110
Gas de Acarreo Ar (psi)	75
Voltaje (V)	32
Corriente (A)	650
Inyección de polvos (lb/hr)	2.2

7.4.2 Caracterización

Al igual que los recubrimientos HA/BT optimizados, el recubrimiento fue sometido a las diferentes técnicas de caracterización antes mencionadas, esto con el fin de observar el impacto que tienen las nAgEN en la matriz del recubrimiento base HA30BT.

7.4.2.1 Análisis de fases: DRX y espectroscopia Raman

La estructura de nAgEN y la identificación de alguna posible fase secundaria que pudiera presentarse durante el proceso de homogenización y de proyección para formación del recubrimiento, se realizó un análisis estructural usándolas técnicas de DRX y espectroscopia Raman, tanto polvos iniciales, mezcla de polvos precursores y recubrimiento.

En el análisis de DRX se utilizó una geometría Bragg-Brentano, la obtención del espectro fue de 20° a 60° en 2 θ , a un paso de 0.05° en 2 θ por cada 60 segundos. La máscara utilizada durante el análisis fue de 15 mm. El análisis se llevó a cabo por el difractómetro (D8 ADVANCE)

El análisis por espectroscopia Raman se realizó un barrido desde 100cm⁻¹ hasta 1400cm⁻¹ en Raman shift. Éste fue realizado mediante un espectrofotómetro Raman HORIBA (LabRam HR, Vis-633nm)

7.4.2.2 MEB

Para la caracterización se utilizó el microscopio MEB Hitachi (SU3500) de presión variable; se observó la morfología empleando electrones secundarios, y se observó la distribución de fases utilizando electrones retrodispersados y espectroscopia EDS para visualizar la distribución elemental en el recubrimiento.

7.4.2.3 Adherencia

Para evaluar el impacto en las propiedades mecánicas de adherencia, el recubrimiento fue sometido al ensayo por tensión uniaxial con base a la norma ASTM C633 [2], en la maquina universal INSTRON. Para realizar el ensayo, fue necesario el armado de las probetas de tensión de acuerdo con la metodología mencionada en la sección 3.3.1.3. El ensayo se llevó a cabo bajo una tensión uniaxial de 0.013 mm/min hasta el punto de fallo, posteriormente se hizo un registro fotográfico para su posterior análisis de falla mediante software ImageJ [82].

7.4.2.4 Citotoxicidad

Se montaron ensayos de citotoxicidad por triplicado, se colocó los recubrimientos en proceso de liberación de iones en medio de cultivo RPMI-1640 a $36.5^{\circ}\text{C} \pm 5$ a los diferentes tiempos de exposición; 1, 3, 7 y 21 días. Posteriormente se hizo la extracción de sobrenadante para preparar las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128 para proceder al ensayo.

En la caja de 96 pozos se colocó 50 μL de medio RPMI suplementado con una carga de 2.5×10^4 células/pozo y se incubó durante 24 horas. Después fueron adicionadas las diluciones previamente preparadas y se incubaron nuevamente durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la adición de MTT; se dejó en contacto durante 3 horas y posteriormente se llevó a cabo la dilución de cristales de formazan mediante 100 μL de DMSO para proceder a la lectura usando el espectrofotómetro de placa multiscan (iMark Microplate Reader) a una $\lambda=595$. Este ensayo se realizó por cuadruplicado.

7.4.2.5 Inmunofluorescencia

Para el ensayo de inmunofluorescencia se utilizó la celda “lab on a chip”, las muestras y controles fueron incubadas en medio RPMI suplementado durante 3 y 7 días con una de 1.5×10^4 células. Después las células fueron fijadas durante 1 hora en solución de glutaraldehído al 2.5% V/V en solución de cacodilatos de sodio 0.1 M, posteriormente se

adicionó borohidruro de sodio al 0.2% P/P para eliminar la fluorescencia. Una vez fijadas se realizó la permeabilización de las células mediante solución de Tritón 100X al 2% V/V en solución de PBS durante 30 min, seguido a esto, se procedió al bloqueo durante 1 hora a 37°C con solución de PBST (PBS Tween 20 0.05%) más 10% P/P de proteína láctica.

Luego se procedió a la adición del anticuerpo primario Osteocalcina policlonal (OCN, Human-Rabbit/IgG Invitrogen)) a una concentración de 1:5000, posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario policlonal (FITC Goat-AntiRabbit/IgG Invitrogen)) a una concentración de 1:2000, los tiempos de incubación para ambos anticuerpos fueron de 1 hora a 37 °C, después, se adicionó la faloidina rodaminada (Abcam) a una concentración de 1:1000 durante 30 min, los anticuerpos y el marcador de faloidina fueron preparados en solución PBST + 1% P/P de proteína láctica.

Por último las muestras fueron montadas en medio DAPI, se colocó un cubreobjetos en la muestra y se selló con esmalte para su visualización en el microscopio confocal de fluorescencia (Carl Zeiss LSM T-PTM). El procesamiento de imágenes se utilizó el software ZEN Blue Edition versión 3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) [89].

7.4.2.6 Eficiencia antibacterial

Para la determinación de la eficiencia antibacterial se utilizaron las cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 4157), *Staphilococcus aureus* (ATCC 24213) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27833). El cultivo de las cepas bacterianas se llevó a cabo en agar de soya tripcaseina y caldo de cultivo soya tripcaseina. Para el ensayo, las muestras estuvieron en contacto directo con una carga bacteriana de 2.5×10^5 UFC/mL, posteriormente, se incubaron durante 24 y se recuperó el sobrenadante. En análisis del crecimiento bacteriano se realizó una dilución de 1×10^{-6} partes para cada sobrenadante, después se tomó una alícuota de 50µL y se plaqueó en una caja Petri con cultivo de agar de soya tripcaseina. Las cajas inoculadas fueron incubadas durante 24 horas para el análisis de eficiencia antibacterial.

El cálculo de la eficiencia antibacterial se llevó a cabo de acuerdo con la norma JIS Z2801: 2001 mediante la ecuación:

$$R = \log\left(\frac{B}{C}\right) \quad (10)$$

Donde R es el valor de actividad microbiana, B y C es la cantidad de bacterias viables [unidades formadoras de colonias (UFC)] para el control y bacterias viables (UFC) sometidas en contacto con las muestras problema (Ti y recubrimiento HA30BTnAg). De acuerdo con la norma JIS Z2801 el valor mínimo permisible de R , debe ser ≥ 2 , con el cual se garantiza una eficiencia antibacterial de 99% en un tiempo de 24 horas de incubación.

El cálculo de eficiencia antibacterial se determinó con la siguiente ecuación:

$$Eficiencia\ antibacterial = \left(\frac{B-C}{B} \right) * 100 \quad (11)$$

Donde B y C son las bacterias viables (UFC) para el control y bacterias en contacto con las muestras problema

8 RESULTADOS

8.1 Etapa II: Caracterización de materia prima

8.1.1 Difracción de Rayos X

En la Figura 6 se muestran los patrones característicos de los polvos primarios para la fabricación de los recubrimientos base HA/BT. Para ambos materiales se logra observar la presencia únicamente de la fase cristalina de HA, de acuerdo con la carta cristalográfica 00-074-0556 la cual corresponde a una estructura hexagonal; mientras que para BT la carta cristalográfica 00-081-2204 muestra una estructura tetragonal

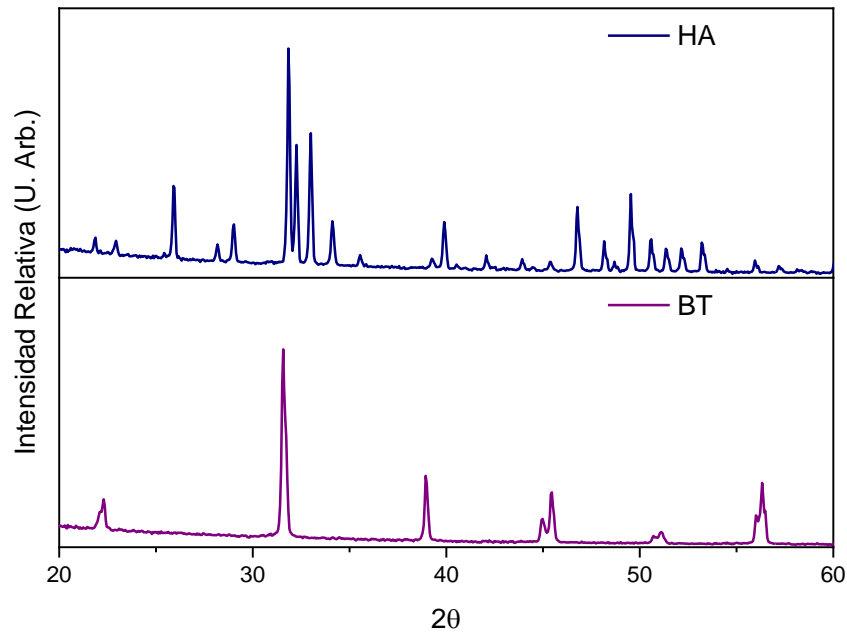


Figura 6 Patrones de difracción obtenidos para polvos primarios: HA y BT.

8.1.2 Espectroscopia Raman

Como una técnica complementaria para identificación de fases, se observan los espectros Raman característicos para las estructuras cristalinas de HA y BT. En la Figura 7, para el espectro de la HA, se pueden observar las bandas más intensas a 419, 590, 980 y

1090 cm^{-1} , las cuales son típicas de la fase cristalina hexagonal. Para el espectro obtenido de las nanopartículas del BT se pueden observar las bandas más intensas a 237, 302, 516, 717 cm^{-1} en Raman shift, siendo la banda de 302 cm^{-1} la señal característica de la fase tetragonal, la cual, es originada debido al momento dipolar entre los átomos Ti-O de la red cristalina

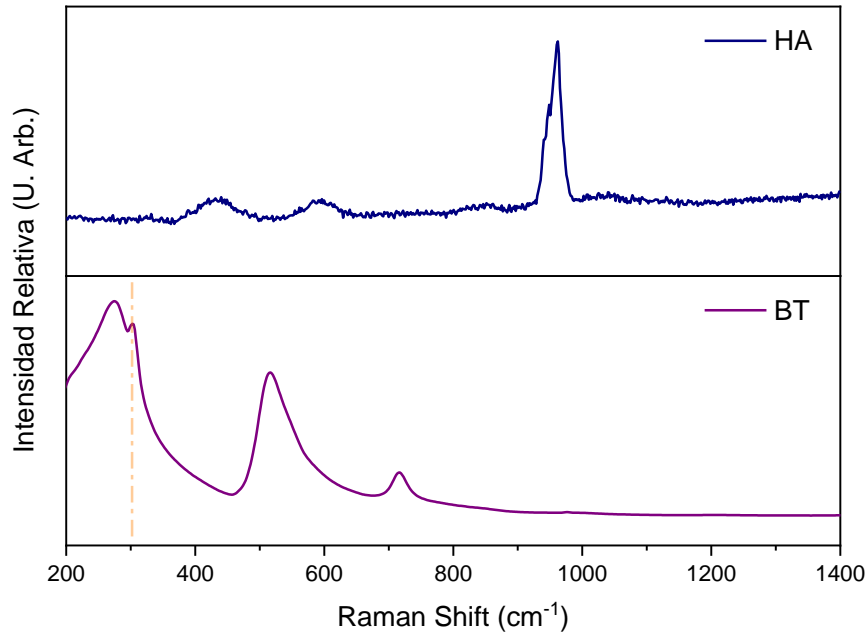


Figura 7 Espectros Raman característicos para polvos primarios: HA y BT, en línea punteada se muestra la banda característica de la fase tetragonal del BT.

8.1.3 Morfología: Microscopia electrónica de barrido

En la Figura 8, se muestran las micrografías de los polvos primarios obtenidos mediante microscopia electrónica de barrido en modo de electrones secundarios con sus respectivos histogramas. En los incisos a) y b) se muestran la micrografía para las partículas de HA y BT respectivamente, donde se puede observar una morfología esférica para la HA mientras que las nanopartículas de BT muestran una morfología subredondeada. Para el análisis del tamaño de partícula se empleó el software ImageJ, la medición se realizó en al menos 5 micrografías y 300 partículas. Para la generación del histograma, los datos de medición de partículas fueron analizados mediante el software Origin Pro Versión 8.5 del [90]; se realizó una curva de ajuste LogNormal usando el método de iteración de Levenberg–Marquardt para determinar el tamaño de partícula

medio de los polvos. Los histogramas obtenidos muestran que los tamaños medios de las partículas de los polvos comerciales son en promedio de $47\mu\text{m}$ para la HA y 201.6 nm para el BT.

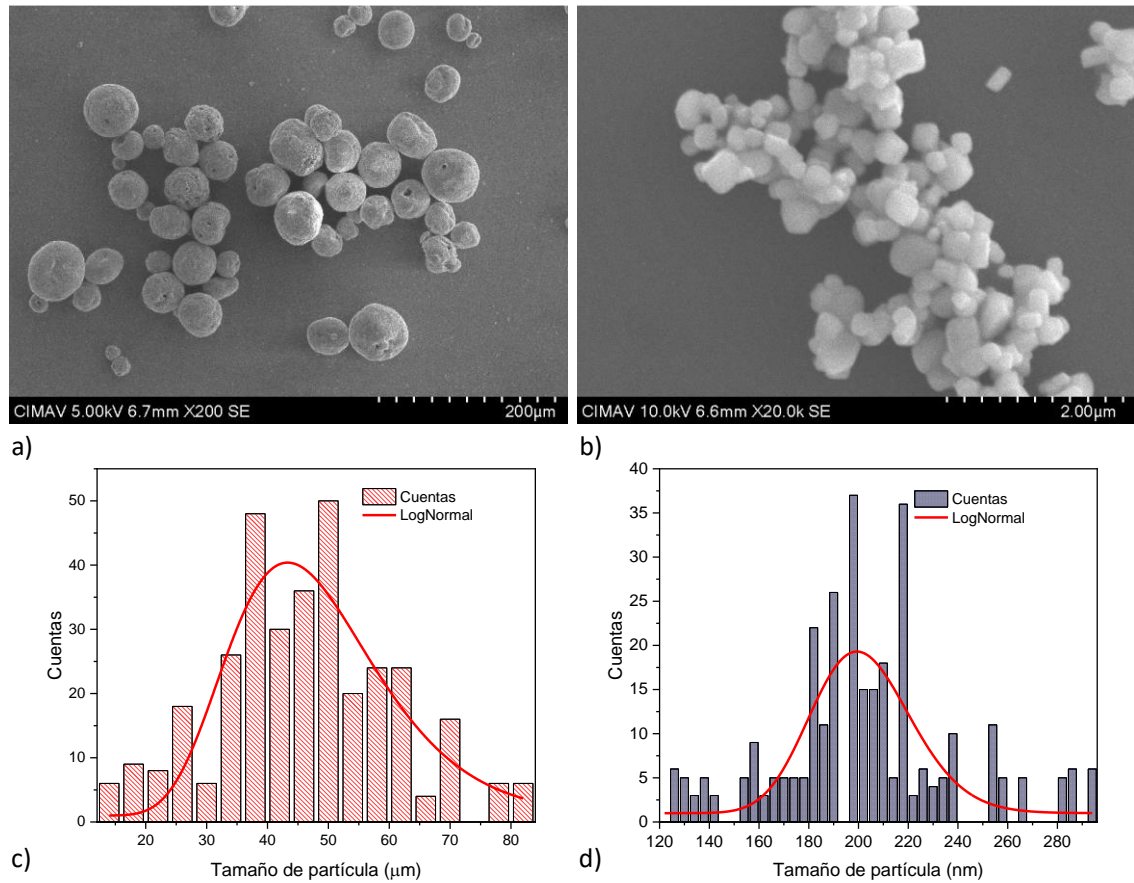


Figura 8 Micrografías MEB obtenidos para los polvos primarios y sus respectivos histogramas generados para el tamaño de partícula: a) y c) corresponden a la HA, b) y d) corresponden a el BT.

8.2 Etapa III: Caracterización de recubrimientos

8.2.1 Optimización

En la Figura 9 y Figura 10 se observan las micrografías obtenidas mediante MEB en modo de electrones retrodispersados de los diversos recubrimientos desarrollados en la presente tesis. De acuerdo con los criterios de inclusión-exclusión, el análisis visual para determinar la distribución de fases es un criterio primordial para la selección de la metodología para el desarrollo de los recubrimientos. En la Figura 9 incisos a) y b), se muestran las micrografías para los recubrimientos desarrollados mediante la metodología tipo I (recubrimiento base HA, BT y YSZ) tanto a bajas como altas concentraciones de

BT respectivamente. Se puede observar en ambas micrografías la presencia de fracturas sobre la superficie del recubrimiento típicas de los recubrimientos cerámicos desarrollados mediante proyección térmica; en los recubrimientos con altas concentraciones de BT (Figura 9 b) se observa una mayor incidencia en la aglomeración de fases, las cuales corresponden a las regiones brillantes del recubrimiento. En las micrografías c) y d) (Figura 9) se muestran los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo II (recubrimiento primario HA/YSZ + recubrimiento secundario HA/BT). Se puede observar a bajas concentraciones (Figura c) una menor incidencia en aglomeraciones que su homólogo desarrollado por la metodología tipo I, posiblemente originado por la ausencia de la tercera fase en la matriz del recubrimiento. Sin embargo, en la Figura 9 d) a diferencia que su homólogo desarrollado por la metodología tipo I con altas concentraciones de BT, se puede apreciar una mayor incidencia de aglomeración de fases, posiblemente debido al método de homogenización, lo cual establece que el tratamiento de los polvos con molienda mecánica permitió una mayor dispersión de fases posterior a su proyección térmica por plasma.

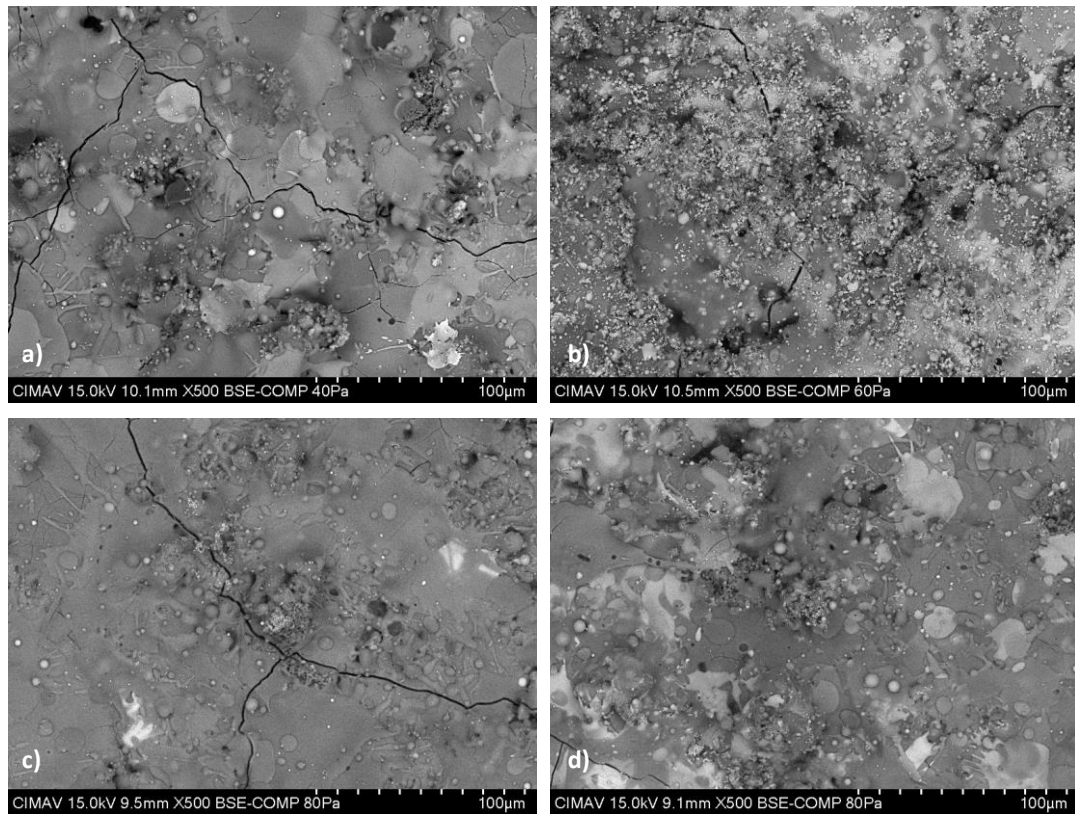


Figura 9 Micrografías MEB en sección superficial para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías descritas: a) y b) metodología tipo I, recubrimientos HA8.1Z10BT y HA8.1Z50BT respectivamente, c) y d) metodología tipo II, recubrimientos HA10BT-S y HA50BT-S respectivamente.

En la Figura 10 a) y b), se muestran las micrografías para la metodología tipo III, que a diferencia de la metodología tipo II, este recubrimiento presenta un pretratamiento térmico a 450°C de la muestra previo a la deposición del recubrimiento secundario. En dicha figura se puede observar un comportamiento similar a su homólogo de la metodología tipo II para ambas concentraciones de BT, teniendo un aumento en la incidencia de aglomeración de fases a medida que aumenta el BT en la matriz del recubrimiento. La Figura 10 c) y d) muestran las micrografías de los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo IV, en la cual se presenta un recubrimiento primario desarrollado a base de polvos homogenizados por agitación, en ella se puede observar un comportamiento similar a las previas metodologías (tipo II y tipo III) en las cuales existe la presencia de aglomerados, los cuales aumentan conforme se incrementa las concentraciones de BT en la matriz. Por último, en la Figura 10 e) y f) se muestran los recubrimientos desarrollados a partir de polvos homogenizados mediante molienda mecánica (metodología tipo V), en donde se puede observar que tanto a bajas como a altas concentraciones de BT y polvos homogenizados por molienda mecánica tiene un impacto positivo en la dispersión de fases, observándose que el tamaño de aglomerados es inferior al tamaño de los observados en las metodologías tipo II, tipo III y tipo IV con altas concentraciones de BT.

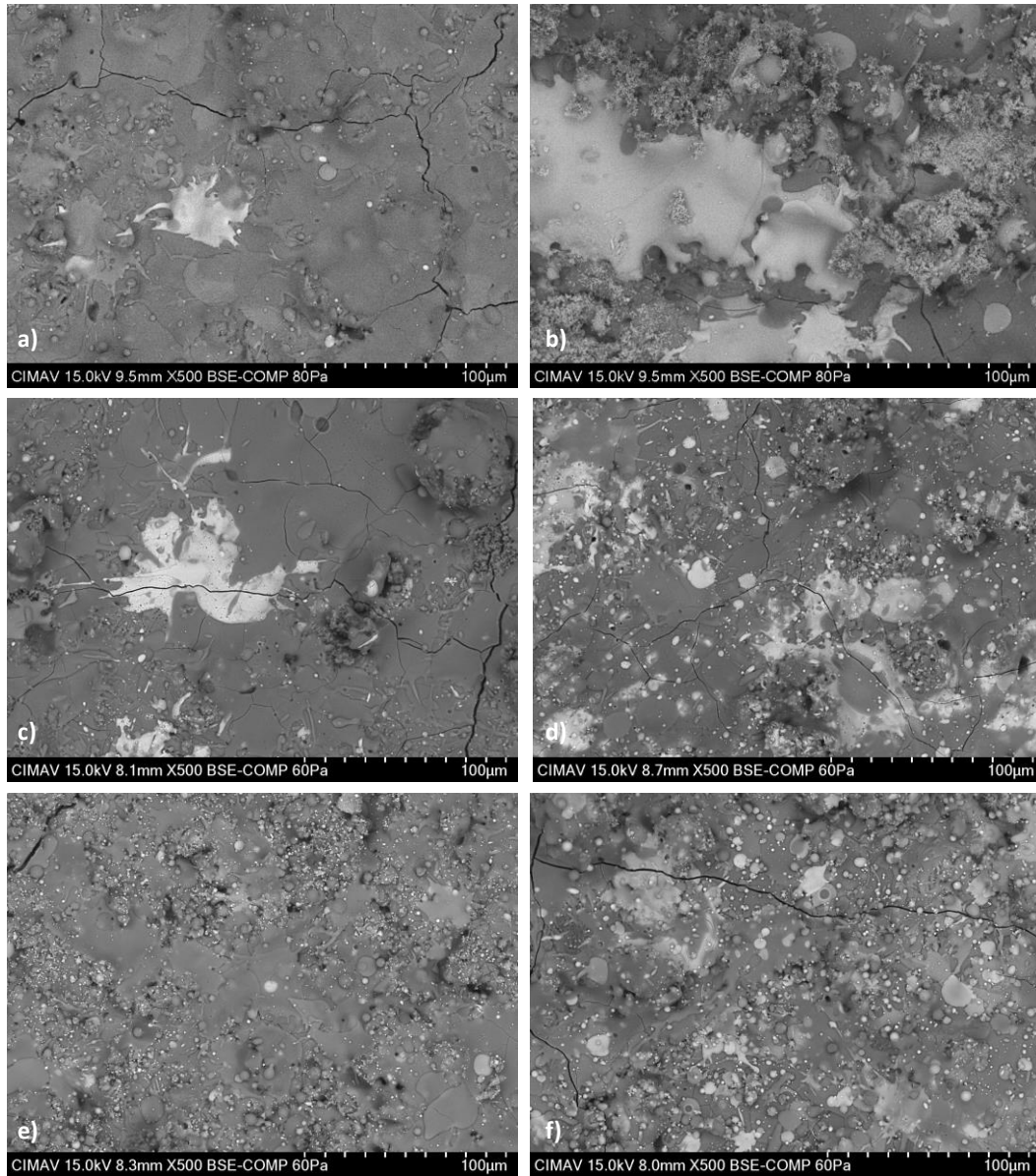


Figura 10 Micrografías MEB en sección superficial para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías: a) y b) metodología tipo III, recubrimientos HA10BT-S450 y HA50BT-S450 respectivamente, c) y d) metodología tipo IV, recubrimientos HA10BT-A y HA50BT-A respectivamente, e) y f) metodología tipo V, recubrimientos HA10BT-M y HA50BT-M respectivamente.

En las Figuras 11 y 12, se muestran las micrografías en sección transversal para los recubrimientos desarrollados mediante las diferentes metodologías de deposición. En la Figura 11 a) y b) se muestran los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo I, mientras que en c) y d) se muestran los recubrimientos desarrollados mediante la metodología tipo II. Se puede observar para ambos métodos la presencia de fracturas en la región del recubrimiento (zonas marcadas en flecha azul), tanto a altas como bajas concentraciones de BT; a su vez, en la interfase recubrimiento-sustrato se puede observar las fracturas críticas en dicha región (zonas marcadas en flecha naranja). Para los

recubrimientos desarrollados por la metodología tipo I, la falla persistente en la interfase se debe principalmente a una adsorción física entre el recubrimiento y el sustrato. Por otra parte, para el caso de los recubrimientos desarrollados mediante la metodología tipo II, la falla en la interfase es debida a la fractura del recubrimiento primario, la cual es originada debido al choque térmico propiciado durante la deposición del recubrimiento secundario.

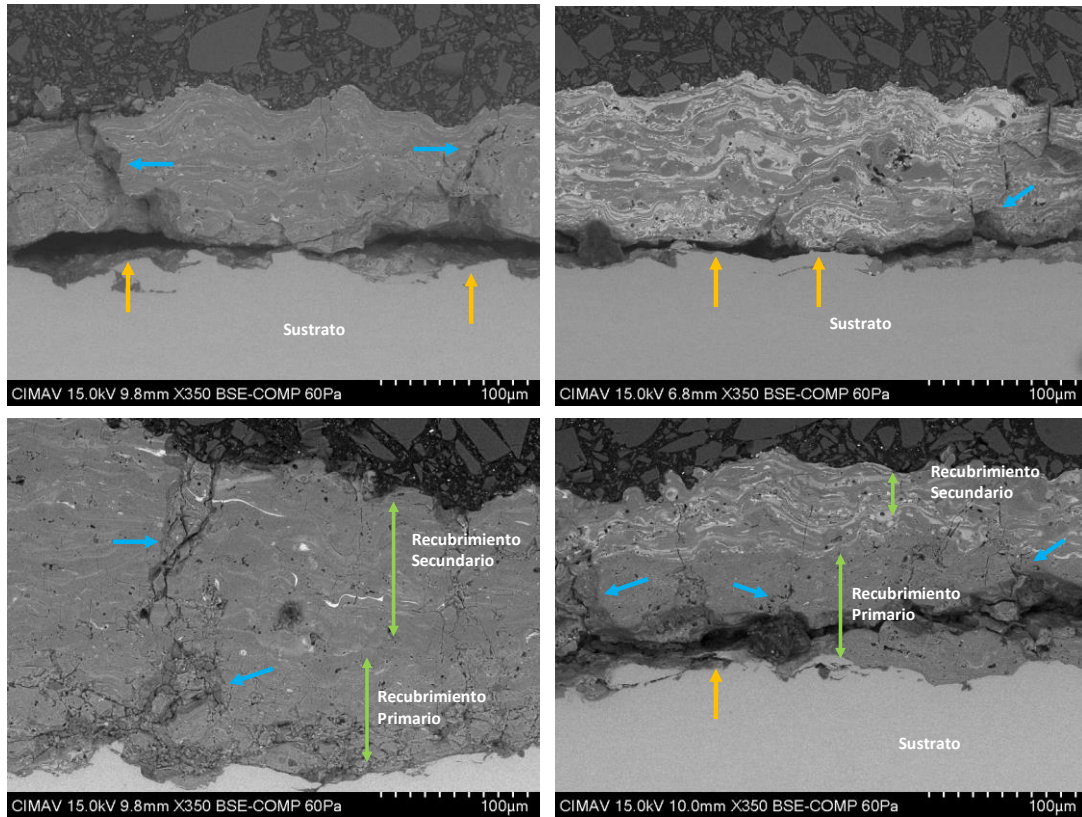


Figura 11 Micrografías MEB en sección transversal para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías descritas: a) y b) metodología tipo I, recubrimientos HA8.1Z10BT y HA8.1Z50BT respectivamente, c) y d) metodología tipo II, recubrimientos HA10BT-Sy HA50BT-S respectivamente.

En la Figura 12 a) y b) se muestran los recubrimientos desarrollados por las metodología tipo III, que a diferencia de los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo II, se puede observar que el tratamiento térmico previo a la deposición del recubrimiento secundario tiene un cambio positivo en cuanto a las falla ocurrida en la interfase sustrato-recubrimiento, sin embargo con altas concentraciones de BT se puede observar la presencia de fracturas profundas (zona marcada con flecha azul), las cuales se encuentran en la región del recubrimiento. Por otra parte, en la Figura 12 c) y d) se muestran las micrografías para los recubrimientos desarrollados mediante la metodología tipo IV, donde se puede observar que para esta metodología los recubrimientos muestran un buen

comportamiento en cuanto a la integridad del recubrimiento así como una interacción favorable en la interface del recubrimiento-sustrato, sin embargo, debido a la metodología de homogenización, se puede apreciar el exceso de aglomeraciones de la fase de BT en la matriz del recubrimiento. Por último, en los incisos e) y f) se muestran los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo V, los cuales muestran un buen comportamiento tanto en integridad del recubrimiento, así como la interacción entre sustrato-recubrimiento. A diferencia de la metodología tipo III y tipo IV, la metodología tipo V muestra una mayor dispersión de fases a bajas y altas concentraciones de BT, lo cual, puede ser debido principalmente al proceso de homogenización por molienda mecánica.

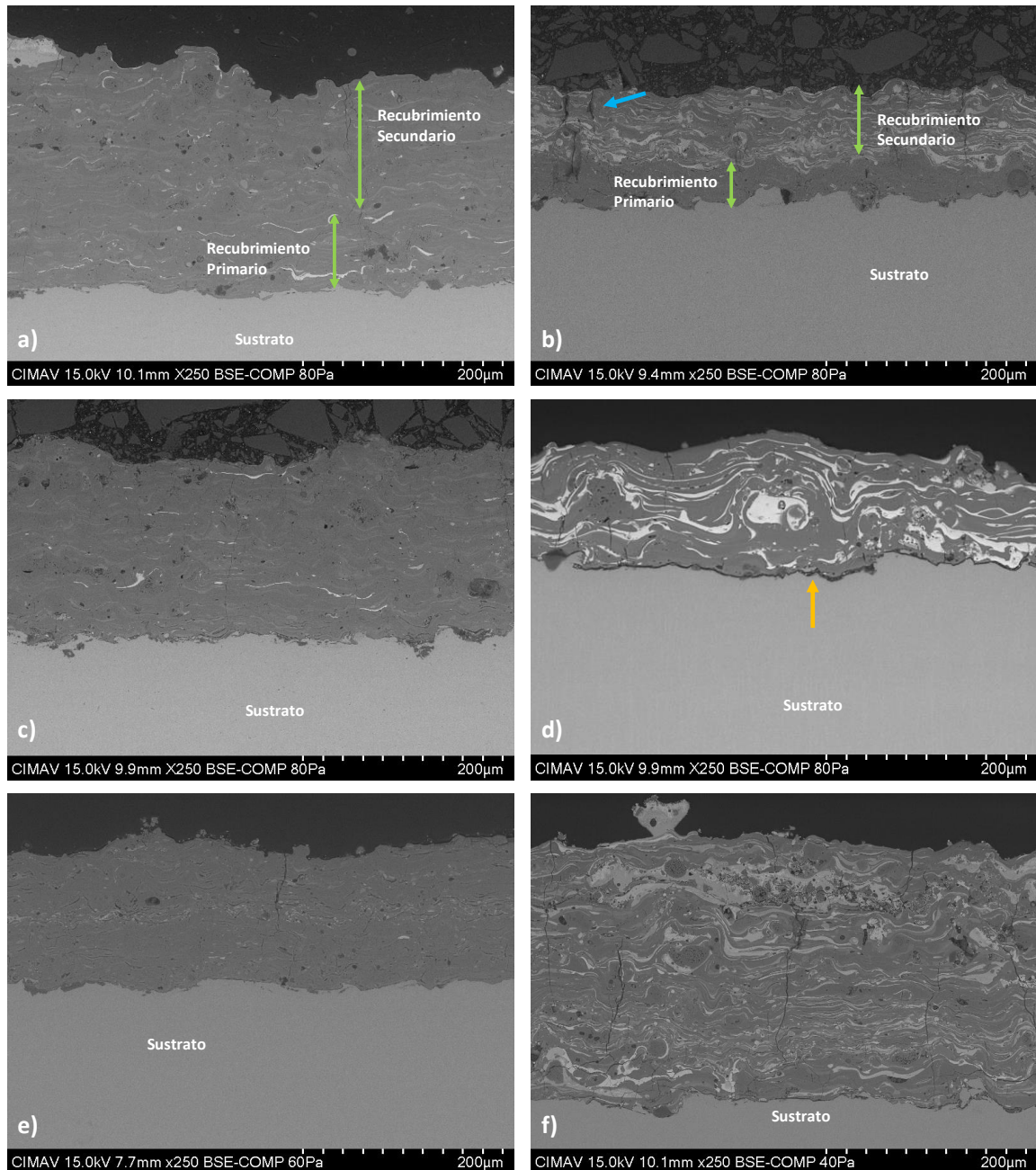


Figura 12 Micrografías MEB en sección transversal para los recubrimientos desarrollados de acuerdo con las metodologías: a) y b) metodología tipo III, recubrimientos HA10BT-S450 y HA50BT-S450 respectivamente, c) y d) metodología tipo IV, recubrimientos HA10BT-A y HA50BT-A respectivamente, e) y f) metodología tipo V, recubrimientos HA10BT-M y HA50BT-M respectivamente.

De acuerdo con los criterios de inclusión-exclusión, únicamente los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo III, tipo IV y tipo V fueron evaluados para la obtención de la adherencia nominal en base al ensayo de tensión de acuerdo con la norma ASTM C633 [81]. En la Figura 13 y Tabla 10, se muestra los valores de adherencia para las diferentes metodologías, donde se puede observar que los recubrimientos HA10BT-M

y HA50BT-M, los cuales fueron desarrollados por la metodología tipo V, muestran un mejor comportamiento en cuanto a propiedades de adherencia, siendo los valores de adherencia superior a los mínimos establecidos por la norma ISO para el desarrollo de recubrimientos de fosfatos de calcio para prótesis ortopédicas. Por otra parte, los recubrimientos HA10BT-A y HA50BT-A, los cuales fueron desarrollados mediante la metodología tipo IV, secundan a los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo V, teniendo un comportamiento superior a los 15 MPa. Por último, se observan los recubrimientos desarrollados mediante la metodología tipo III, los cuales al ser un sistema complejo (recubrimientos primarios + recubrimiento secundario), presentaron una adherencia inferior a los desarrollados por la metodología tipo IV y V, además se puede observar un decaimiento en dicha propiedad al incrementar la concentración de BT en la matriz, teniendo valores ligeramente por encima a los establecidos por la norma ISO 13799-4 [80].

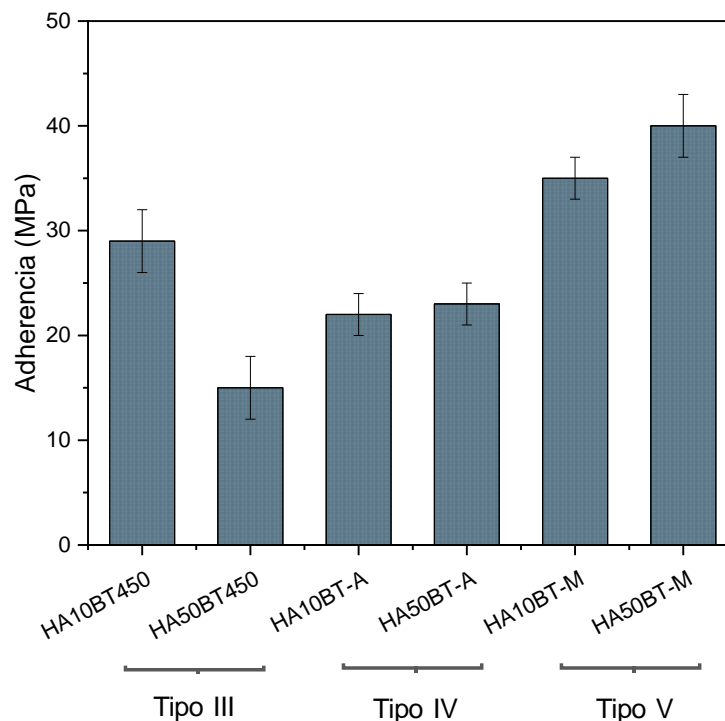


Figura 13 Valores de adherencia nominal alcanzados por los recubrimientos tipo III, IV y V respectivamente.

En la Figura 14, se muestran en sección superficial las fixturas posteriores al ensayo de tensión; en la tabla 10, se muestran los valores obtenidos de adherencia nominal así como el tipo de falla porcentualmente calculado mediante el software ImageJ de acuerdo con el

análisis visual establecido por la norma ASTM C633[81]. Se puede observar que los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo III y tipo IV muestran un comportamiento de falla de tipo adherente (comportamiento superior al 50%), el cual se observa la falla directamente en la interfase del sustrato-recubrimiento; dicha falla es más predominante al incrementar la concentración de BT en la matriz. En contraste, se puede observar que los recubrimientos desarrollados por la metodología tipo V muestran un comportamiento de falla de tipo cohesivo, presentándose dicha falla en la interfase del adhesivo epóxico-recubrimiento, brindando una mayor protección al sustrato en situación de falla.

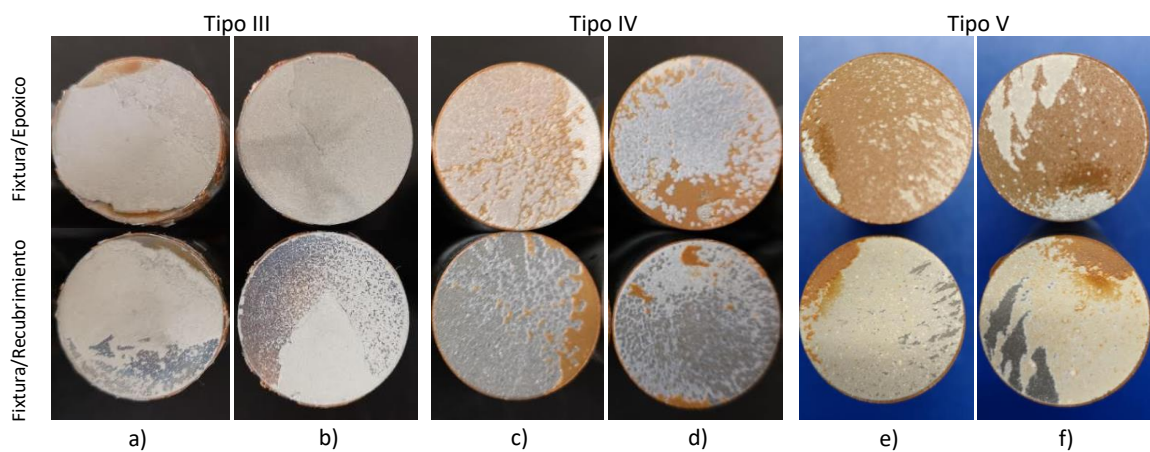


Figura 14 Fixturas en sección superficial para análisis de falla de los recubrimientos tipo III, IV y V, con base a la norma ASTM C633.

Tabla 10 Valores de adherencia y comportamiento de falla para los recubrimientos tipo III, IV y V.

Recubrimiento	Metodología	Comportamiento (%)		
		Adherencia (MPa)	Cohesivo	Adherente
HA10BT450	TIPO III	29 ± 3	53 ± 9	47 ± 9
HA50BT450		15 ± 3	19 ± 8	81 ± 8
HA10BT-A	TIPO IV	22 ± 2	14 ± 7	86 ± 7
HA50BT-A		23 ± 2	25 ± 5	75 ± 5
HA10BT-M	TIPO V	35 ± 2	85 ± 4	15 ± 4
HA50BT -M		40 ± 3	81 ± 4	19 ± 4

8.2.2 *Caracterización Física y Fisicoquímica: Recubrimiento Optimizado*

En la presente sección de acuerdo con los criterios de inclusión-exclusión para la optimización del recubrimiento obtenido mediante la metodología tipo V para el desarrollo de los recubrimientos base HA/BT

8.2.2.1 *Análisis de fases y estructura cristalina*

En la Figura 15 a) se muestra los patrones de difracción característicos de los polvos iniciales vs los patrones obtenidos para cada una de las mezclas en polvo a las diferentes concentraciones de HA/BT. Se puede observar que el procesamiento por molienda mecánica no influye en alguna posible reacción entre la HA y el BT, así como una transformación en la fase cristalina de la HA. Para la indexación de las estructuras se utilizó la carta cristalográfica 00-074-0556 correspondiente a la HA y la carta cristalográfica 00-081-2204 correspondiente para el BT, mostrando que las estructuras cristalinas mantienen la fase hexagonal y fase tetragonal respectivamente.

En la Figura 15 b) se muestran los patrones característicos de los recubrimientos desarrollados de acuerdo con la metodología tipo V a las diferentes relaciones % P/P de HA/BT vs los polvos iniciales. Se puede observar que para las diferentes relaciones HA/BT, se mantienen las reflexiones típicas para la fase de la HA (carta cristalográfica 00-074-0556) y el BT (carta cristalográfica 00-081-2204), sin embargo, los patrones muestran la aparición de fases secundarias para todos los recubrimientos. En los patrones se logra apreciar la aparición de la señal correspondiente a los planos (013) y (040), el cual está relacionado con la fase TTCP (⌘ carta cristalográfica 00-070-1379), además el plano (015) asociado a la fase TCP (● carta cristalográfica 00-032-0176). Finalmente, se observan los planos (111), (200) y (220) los cuales corresponden a la fase de CaO (○ carta cristalográfica 01-082-1690). De acuerdo con Gadow, R. et al. (2010) [14], Kotian et al. (2019) [46] y Heimann et al. (2013) [13], dichas fases secundarias corresponden a la degradación típica de la hidroxiapatita debido a las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de proyección térmica por plasma. De acuerdo con esto, como consecuencia de la degradación ocurrida para la HA, los recubrimientos con una relación de masa del 50% quedan descartados para la posible aplicación para prótesis ortopédicas, de acuerdo

con los criterios establecidos por la norma ISO 13799-2 [92], en la que establece que la concentración mínima de HA presente debe ser de 50% en la matriz del recubrimiento

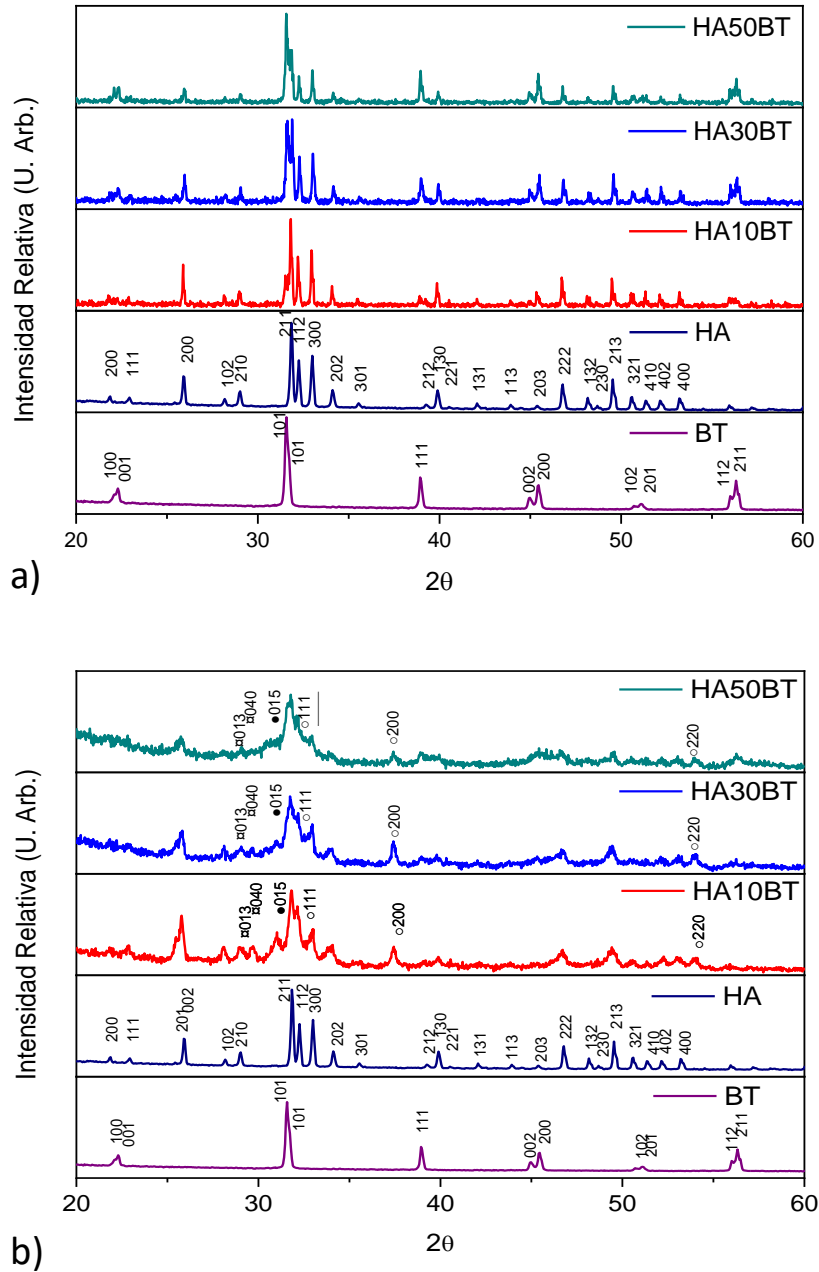


Figura 15 Comparativo de difractogramas: a) polvos primarios y mezcla de polvos precursores para recubrimiento, b) polvos primarios y recubrimientos a diferentes concentraciones HA/BT.

En la Figura 16 se muestran los espectros Raman característicos para los polvos iniciales vs las matrices de polvos precursores de recubrimiento HA/BT sometidos al proceso de homogenizado por molienda mecánica. Se puede observar para las diferentes relaciones en peso las bandas características para la fase de BT (indicado con ●) a 277, 302, 517 y

718 cm^{-1} , en la cual alrededor de los 302 cm^{-1} , se aprecia la señal característica de la fase tetragonal, que es debida a la distorsión de la estructura, como se puede observar en la Figura 17), dicha distorsión de la estructura es provocada por el momento polar existente entre el Ti y el O de la estructura. Por otra parte, se pueden observar las señales características de la fase de HA (indicado con \circ), las cuales se observan en las regiones alrededor de los 436, 590, 845, 948, 961 y 1040 cm^{-1} que indican la estructura hexagonal (ver Figura ** b))

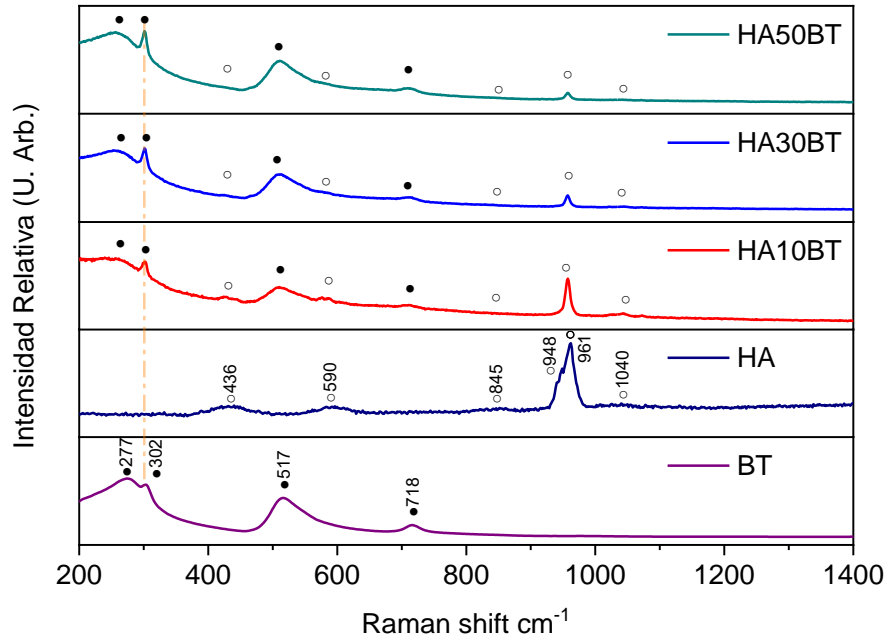


Figura 16 Comparativo espectros Raman para polvos primarios y mezcla de polvos precursores de recubrimiento HA/BT.

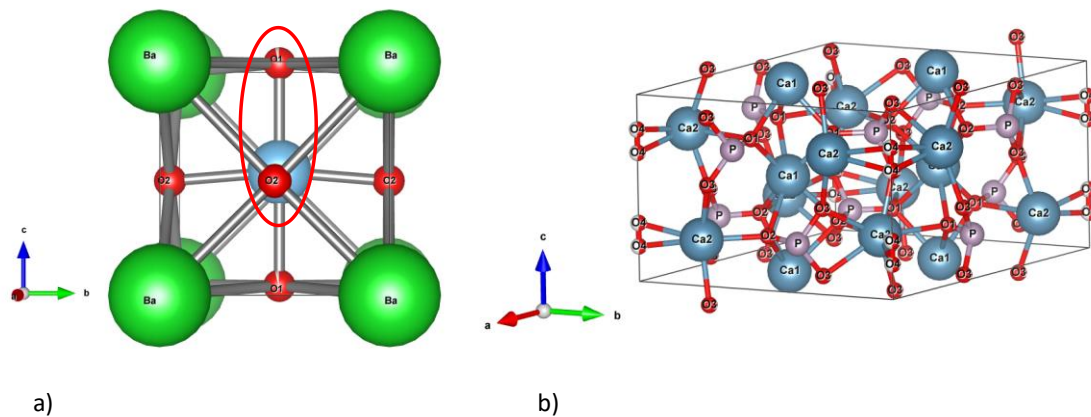


Figura 17 Estructuras cristalinas para: a) BT fase tetragonal y b) HA estructura hexagonal. En a) se muestra la distorsión de la estructura debida a la interacción entre Ti central y el O.

En la Figura 18 se muestran en el inciso a) los espectros Raman de los polvos iniciales de HA y BT respectivamente, en el inciso b) se muestran los espectros Raman obtenidos para los recubrimientos de HA/BT a las distintas concentraciones. A diferencia de DRX mediante Raman no fue posible la identificación de fases secundarias. Para ambos recubrimientos se muestran las bandas características de ambas fases

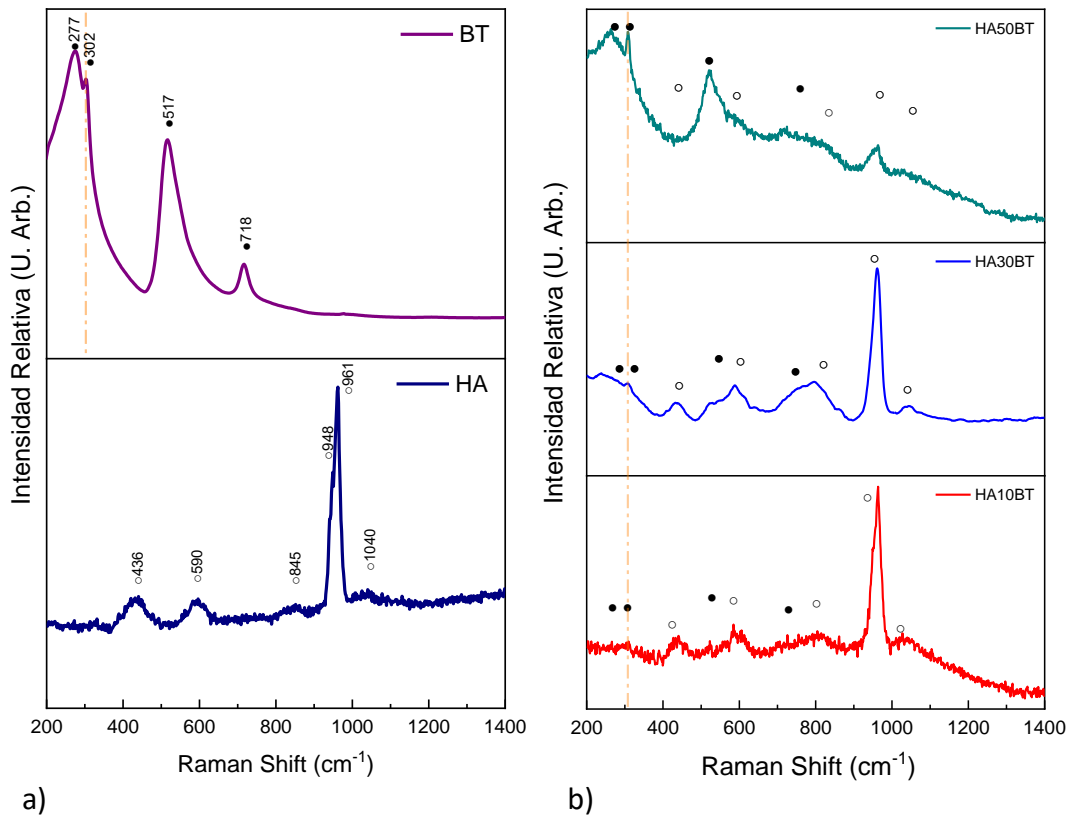


Figura 18 Espectros Raman característicos para: a) polvos primarios y b) recubrimientos HA/BT.

8.2.2.2 Microscopia electrónica de barrido

En la Figura 19 se muestran las micrografías en sección superficial de los recubrimientos optimizados a las diferentes concentraciones de BT. Se puede observar en los incisos a), c) y e) las micrografías representativas de los recubrimientos HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente en modo de morfología mediante electrones secundarios, mientras que en la Figura 19 incisos b), d) y f) se muestran las micrografías representativas de los recubrimientos HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente, en

modo de electrones retrodispersados para el análisis de dispersión de fase. En las imágenes de morfología mediante electrones secundarios, los recubrimientos muestran un similar comportamiento; se observa una alta rugosidad superficial del recubrimiento, la cual es típica debida al sistema de proyección térmica por plasma. Por otra parte, mediante el análisis por electrones retrodispersados se puede observar que para los recubrimientos HA10BT y HA30BT (ver micrografías b) y d) respectivamente) los recubrimientos muestran una buena dispersión de fases, teniendo una baja formación de aglomeración de la fase de BT, el cual, de acuerdo con el análisis de mapeo elemental dicha fase corresponde a las regiones brillantes (ver Figuras 21, 22 y 23 de mapeo elemental). En contraparte, para el recubrimiento HA50BT, al aumentar la concentración de BT en la matriz se puede observar una tendencia en la aglomeración de dicha fase, provocando una mayor incidencia en la aglomeración así como el incremento del tamaño de estas fases (ver regiones brillantes marcadas en flecha)

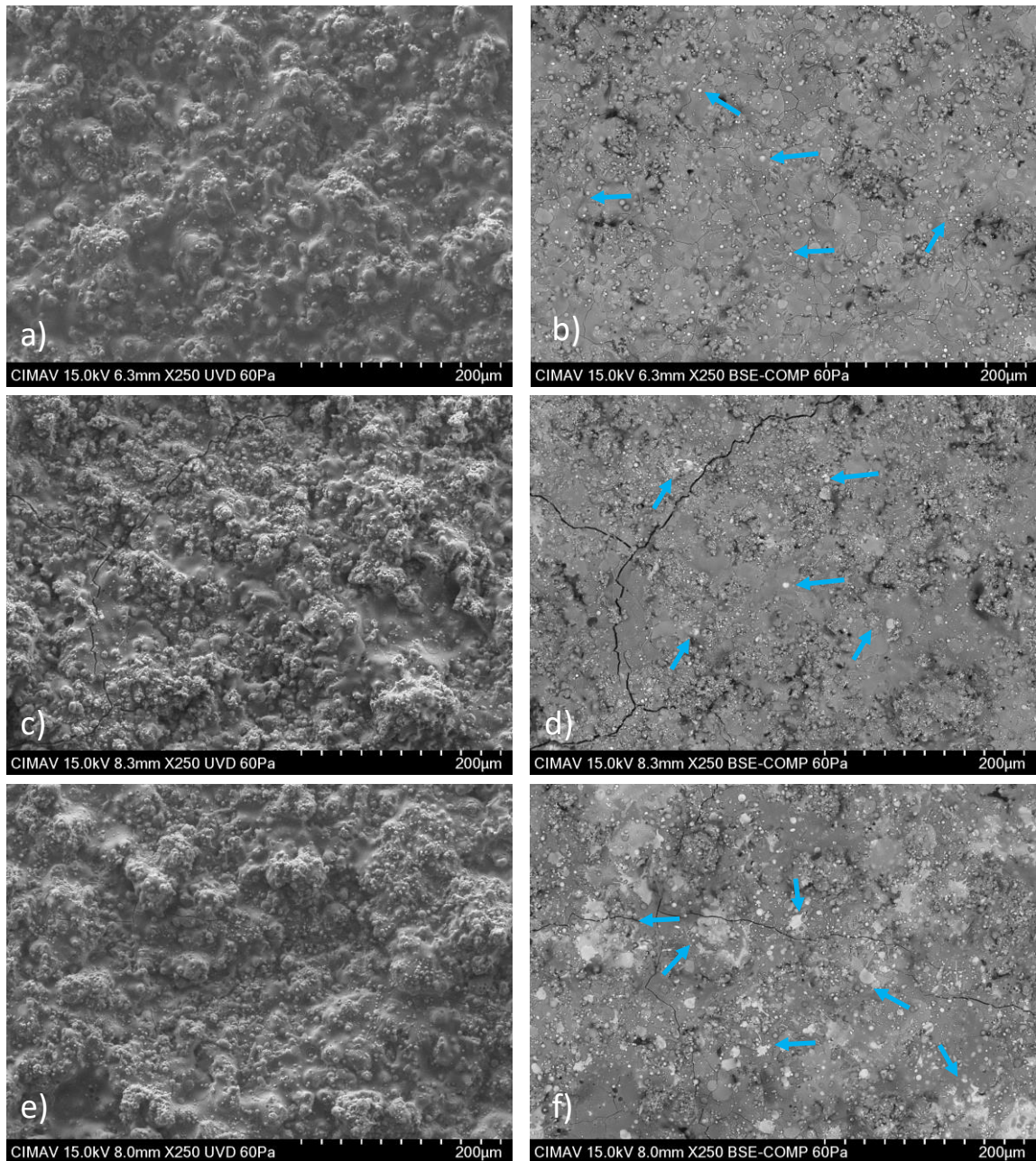


Figura 19 Micrografías MEB en sección superficial; a), c) y e) Análisis de morfología pseudo 3D en electrones secundarios para recubrimientos HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente. b), d) y e) Análisis de fases mediante electrones retrodispersados HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente.

En la Figura 20 se muestran las micrografías en sección transversal mediante MEB en modo de electrones retrodispersados de los recubrimientos HA/BT a 250X y 1000X. En las micrografías de los incisos a), c) y e) se observan los espesores de los recubrimientos a diferentes concentraciones, los cuales se encuentran en el rango de 50 a 200µm de espesor, rango que de acuerdo con la norma ISO 13779-3 [93] y ASTM-F1609-08 [94] permite garantizar una buena estabilidad a largo plazo en contacto con un medio biológico. En las micrografías de los incisos b), d) y f), se puede observar la presencia de

microfracturas en la región del recubrimiento (zonas indicadas en flecha azul), las cuales como se ha mencionado anteriormente, son producto del rápido enfriamiento que ocurre durante el proceso de deposición y la naturaleza cerámica del material. Además, se puede observar para las tres concentraciones, que los recubrimientos desarrollados muestran un buen comportamiento en cuanto a la adherencia visual, por lo cual, los recubrimientos muestran un buen anclaje en la interfase recubrimiento-sustrato.

Se puede observar, que al igual que las micrografías mostradas en sección superficial, a bajas concentraciones de BT en la matriz del recubrimiento HA10BT y HA30BT respectivamente (ver Figura 20 incisos b) y d)), se observa una buena dispersión de fases; sin embargo, la incidencia de aglomeración de fase aumenta al incrementar la concentración de BT en la matriz del recubrimiento (ver imagen f), como lo observado en el recubrimiento HA50BT.

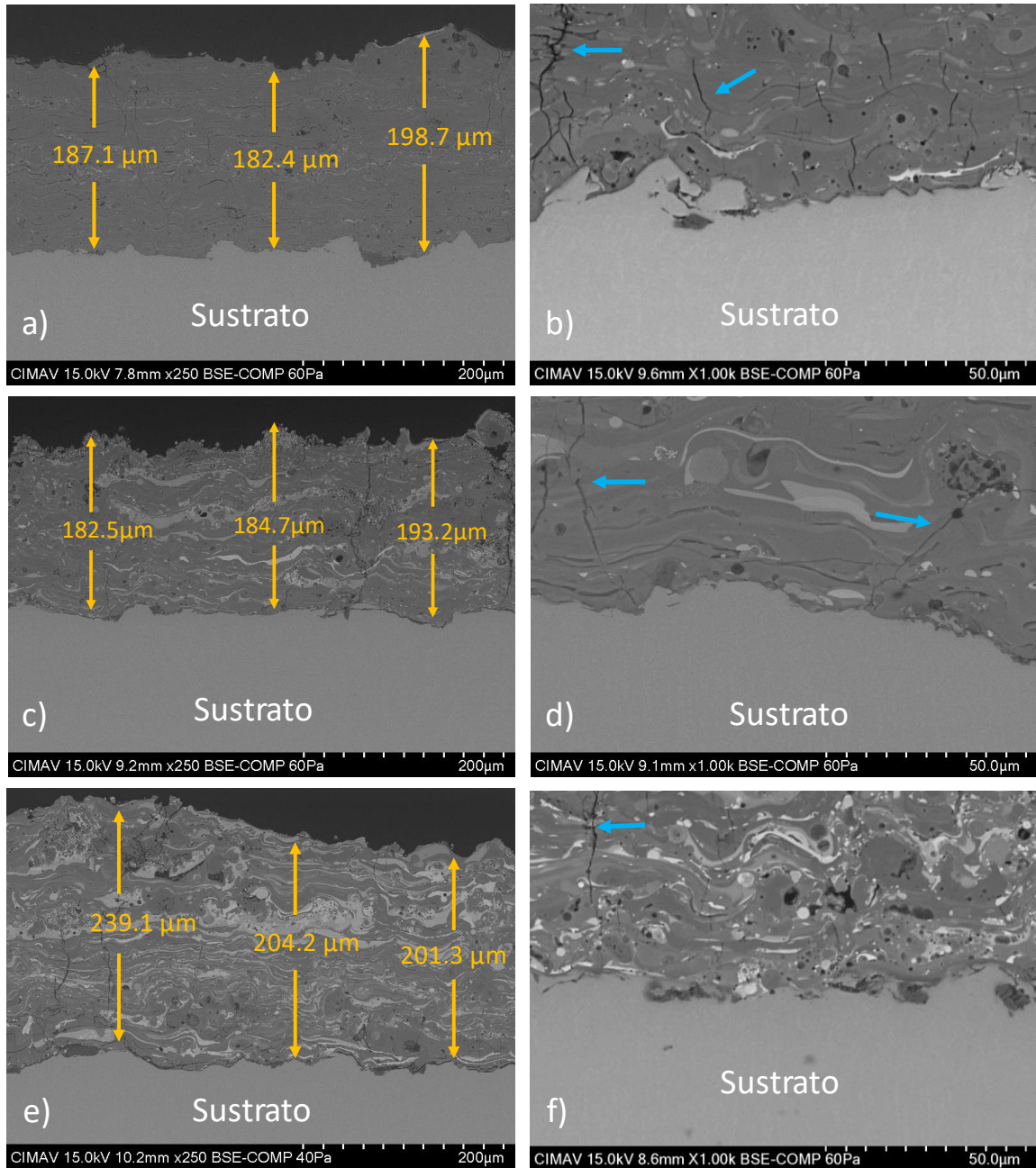


Figura 20 Micrografías MEB en transversal a 250X y 1000X; a) y c) recubrimiento HA10BT, c) y d) recubrimiento HA30BT, d) y e) recubrimiento HA50BT respectivamente. b), d) y e) Análisis de fase mediante electrones retrodispersados HA10BT, HA30BT y HA50BT respectivamente.

En las Figuras 21, 22 y 23 se muestran las micrografías en sección transversal por electrones retrodispersados acompañado de los mapeos elementales mediante energía dispersiva para Ca, P, O, Ti y Ba de los recubrimientos HA10BT, HA30BT y HA50BT. Se puede observar una distribución homogénea de los elementos, principalmente para los recubrimientos HA10BT y HA30BT (ver Figuras 21 y 22), mientras que para el

recubrimiento HA50BT (ver Figura 23), se observa una mayor aglomeración de fase de BT en la matriz

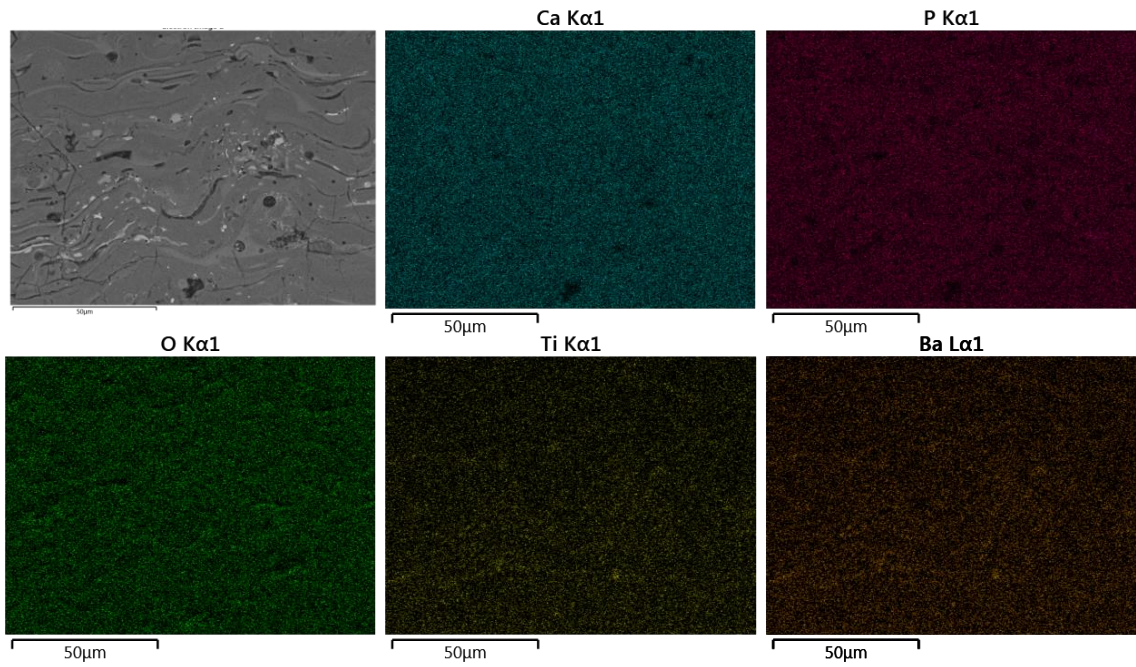


Figura 21 Mapeo elemental en seccion transversal de recubrimiento HA10BT.

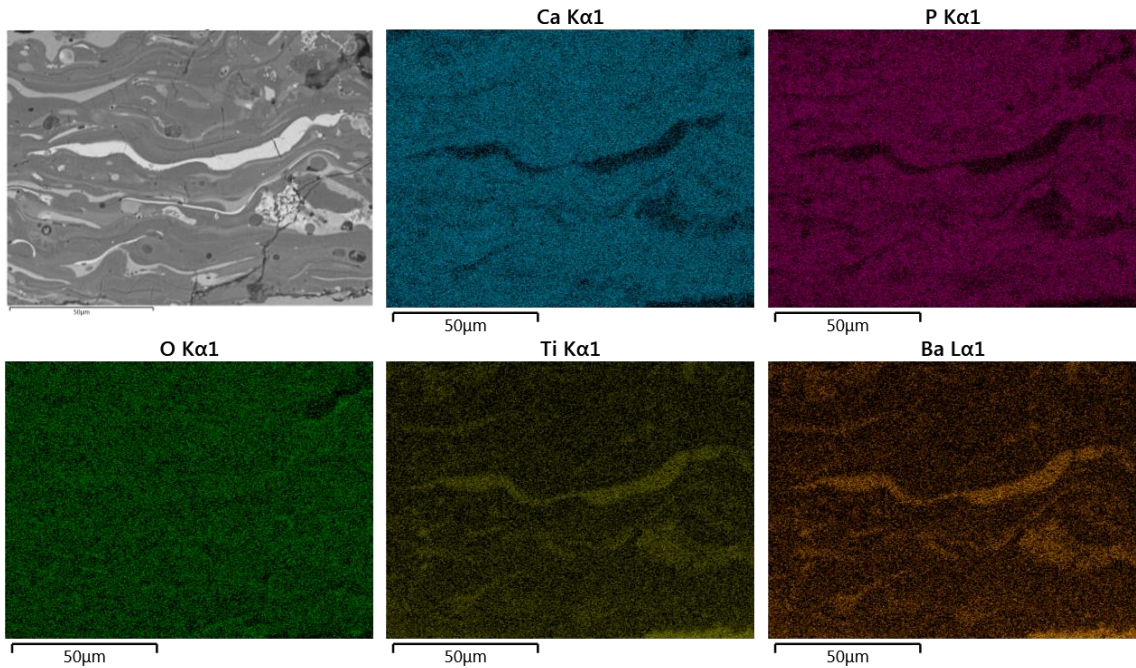


Figura 22 Mapeo elemental en seccion transversal de recubrimiento HA30BT.

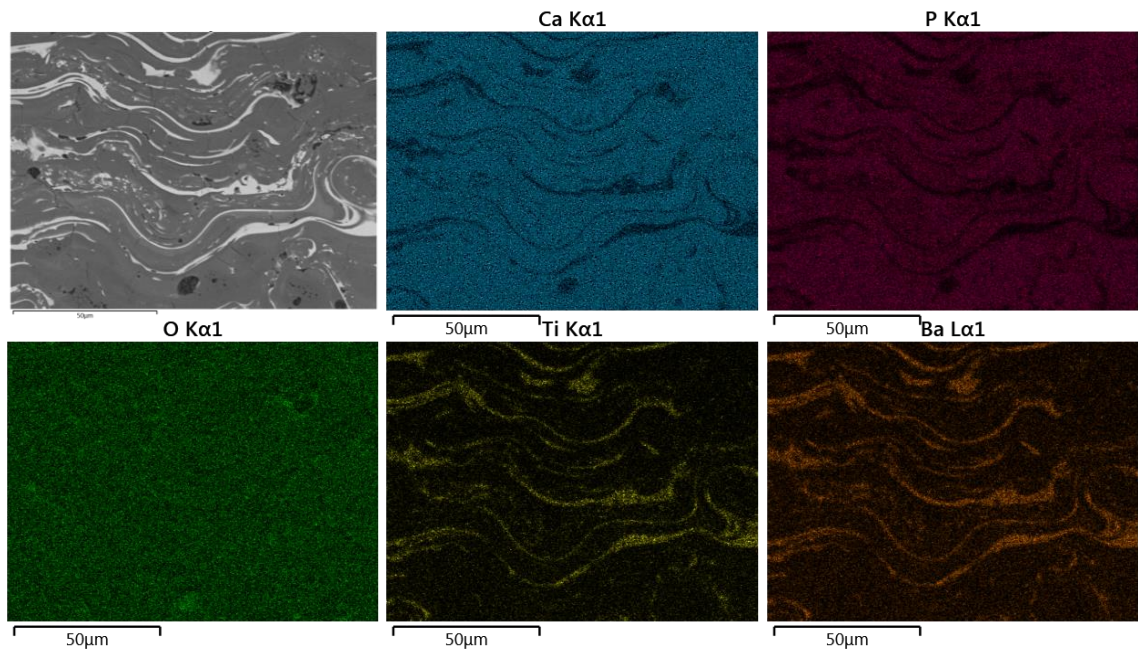


Figura 23 Mapeo elemental en sección transversal de recubrimiento HA50BT.

En la Figura 24 se muestran las micrográficas MEB en sección superficial y los espectros EDS representativos de cada uno de los recubrimientos base HA/BT. En la Tabla 11 se muestran los valores semicuantitativos de la distribución elemental así como el radio molar de Ca/P calculado a partir de la distribución obtenida por EDS. Se puede observar un incremento en el radio molar de Ca/P para todos los recubrimientos pasando de 1.67 a valores por encima de 2, lo cual indica que, de acuerdo con los resultados obtenidos por DRX, dicho incremento se debe a la degradación de la fase de HA a fases secundarias como TCP, TTCP, CaO así como la vaporización de P_2O_5 , siendo esta última la razón del incremento en el radio molar Ca/P debido a la pérdida de P en la matriz.

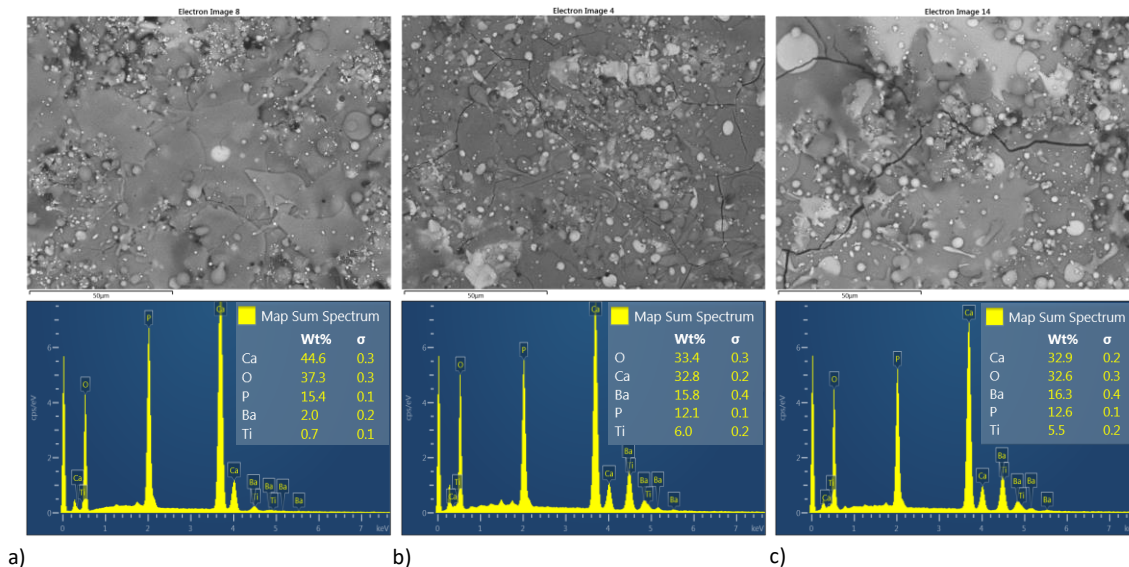


Figura 24 Micrografía MEB y espectro de EDS: a) recubrimiento HA10BT, b) recubrimiento HA30BT y c) recubrimiento HA50BT.

Tabla 11 Composición semicuantitativa obtenida mediante análisis EDS y radio molar de Ca/P para los respectivos recubrimientos.

Muestra	Ca(%at) ± 0.2	P(%at) ± 0.2	O(%at) ± 0.3	Ti(%at) ± 0.2	Ba(%at) ± 0.3	Radio molar Ca/P
HA (pura)	-	-	-	-	-	1.69
HA10BT BM	42	15	33	2	7	2.11 ± 0.2
HA30BT BM	35	12	34	6	14	2.08 ± 0.1
HA50BT BM	28	12	31	9	20	2.01 ± 0.1

8.2.2.3 Adherencia del recubrimiento

En la Figura 25 se muestran los valores obtenidos de adherencia nominal de los recubrimientos de HA/BT BM mediante el ensayo de tensión acorde a la norma ASTM C633 [81] para recubrimientos por proyección térmica por plasma. En contraste al recubrimiento de HA comercial, se pudo observar que los recubrimientos HA10BT, HA30BT y HA50BT muestran un mejor desempeño en cuanto a adherencia nominal, teniendo valores superiores al 68%, 106% y 87% con respecto a la adherencia del recubrimiento de HA comercial. De acuerdo con los criterios marcados por la FDA en base a la norma ISO 13779-2 [92], los recubrimientos desarrollados muestran valores por encima del límite permisible (15MPa). Por otra parte en referencia a los resultados obtenidos y los valores reportados por Zhiguo et al (2014) [55], se muestra que el

recubrimiento HA30BT muestra resultados prometedores, alcanzando valores de adherencia similares a los reportados para un recubrimiento base BT (42 MPa).

En la Figura 26 se muestran en sección superficial las fixturas posteriores al ensayo de tensión. En la tabla 12 se muestran los valores de adherencia nominal, así como los porcentajes de tipo de falla calculados mediante el análisis visual empleando el software ImageJ. Se puede observar que el recubrimiento HA30BT muestra el mejor desempeño en cuanto a adherencia nominal así como tipo de falla ocurrida durante el ensayo de tensión, teniendo un comportamiento de tipo cohesivo, donde la falla tiene lugar principalmente en la región de la interfase adhesivo epóxico-recubrimiento.

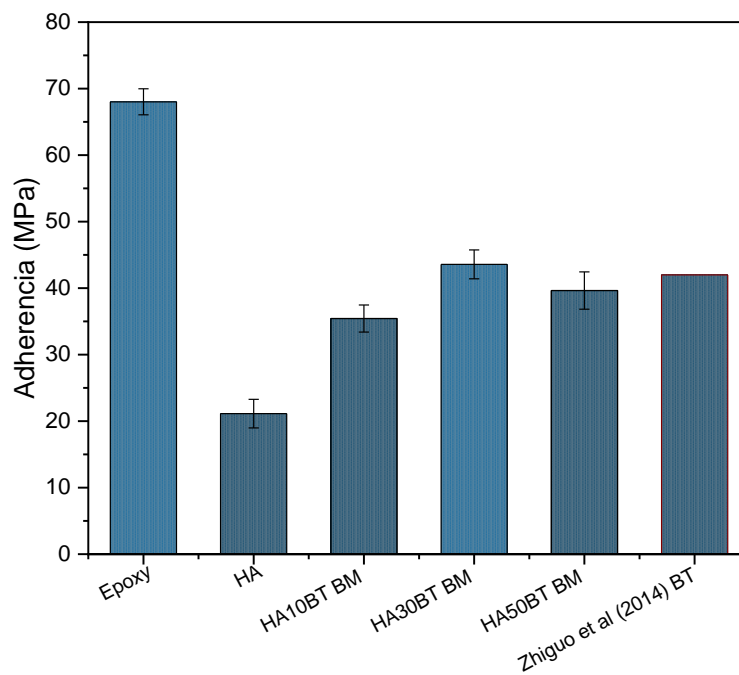


Figura 25 Cuadro comparativo de valores de adherencia nominal de los recubrimientos HA/BT BM mediante el ensayo por tensión en base a la norma ASTM C633.

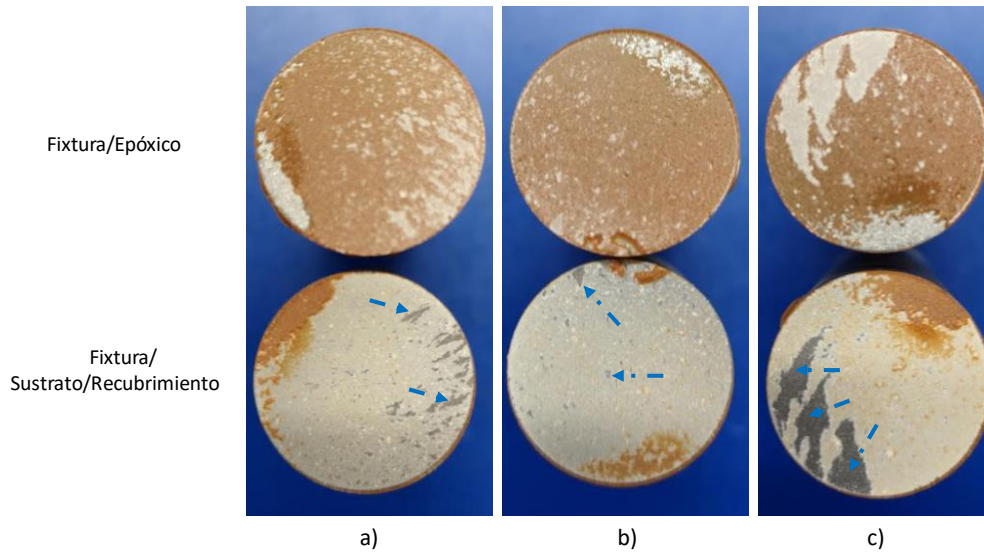


Figura 26 Comparativo visual del comportamiento de falla de los recubrimientos recubrimientos HA/BT BM posterior al ensayo de tensión. Las flechas en color azul indican las zonas de falla de tipo adherente.

Tabla 12 Valores de adherencia nominal y porcentaje de comportamiento de falla para las respectivas muestras.

Muestra	Adherencia	Comportamiento	
		Adhesivo	Cohesivo
HA	21 ± 2	84 ± 4	16 ± 4
HA10BT BM	35 ± 2	15 ± 4	85 ± 4
HA30BT BM	44 ± 2	11 ± 2	89 ± 2
HA50BT BM	40 ± 3	19 ± 4	81 ± 4
BT	42	-	-
Zhiguo et al [55]			

8.2.2.4 Propiedades mecánicas: nanoindentación

En la Figura 27, se muestran las curvas de esfuerzo-desplazamiento obtenidas mediante el ensayo por nanoindentación. En las curvas, se puede observar que a medida que aumenta la concentración de BT en la matriz del recubrimiento existe un incremento en las propiedades de dureza y rigidez del material, motivo por el cual existe un menor desplazamiento o penetración del indentador. En la tabla 13, se muestran los valores obtenidos de las propiedades mecánicas de rigidez, modulo elástico y dureza, así como el comparativo con los materiales en bulk obtenidos por Kumar et al. (2002) [95] para la HA, Gaillard et al. (2009) [96] para el BT y Zysset et al. (1999) [97] para el hueso humano en sección cortical y trabecular. De acuerdo con los valores consultados, se puede observar un efecto de reforzamiento en cuanto a las propiedades mecánicas de la

HA a medida que incrementa la concentración de BT en la matriz; sin embargo, considerando las propiedades mecánicas del tejido óseo, los valores se encuentran muy por encima de estos, pudiendo generar un problema de desgaste siempre y cuando exista un mal anclaje hacia el tejido biológico.

Para observar el impacto que tiene la concentración de BT en la matriz del recubrimiento, se realizó el estudio estadístico ANOVA de una sola vía, empleando el software Origin Pro 8.5 [91] con un factor de tolerancia de $p > 0.05$, donde se pudo observar mediante el comparativo entre las concentraciones de 10% con 30% y de 30% con 50%, no existir una diferencia significativa en cuanto a las propiedades mecánicas de los recubrimientos ($p > 0.05$) por lo tanto, la hipótesis nula es aceptada; sin embargo haciendo un comparativo entre las concentraciones de los extremos de 10% con 50%, se puede observar que existe una diferencia significativa en cuanto a propiedades mecánicas del material ($p < 0.05$) por lo tanto, la hipótesis nula es rechazada.

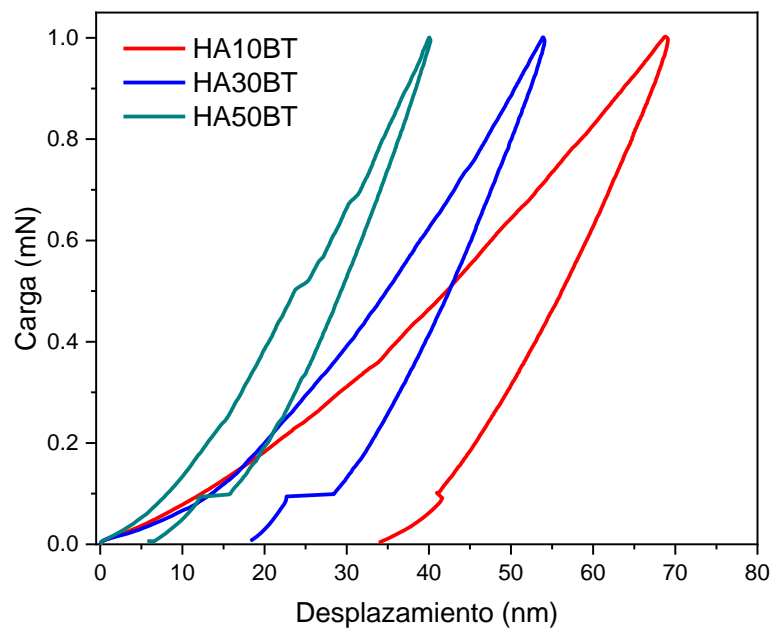


Figura 27 Comparativo curvas de esfuerzo desplazamiento para los recubrimientos base HA/BT BM.

Tabla 13 Propiedades mecánicas obtenidas mediante ensayos de nanoindentación para los recubrimientos base HA/BT BM.

Muestra	Rigidez, S(N/m)	Modulo Elástico, E(GPa)	Dureza, H(GPa)
Hueso Cortical [97]		15-25	0.760
Hueso Trabecular [97]			0.234
HA [95]	-	125	6.19
HA10BT-BM	44165 ± 55	105 ± 1	7.1 ± 0.2
HA30BT-BM	47149 ± 45	123 ± 2	9.1 ± 0.3
HA50BT-BM	47881 ± 44	136 ± 3	13.0 ± 0.5
BT [96]		190	15.0

8.2.2.5 Respuesta piezoeléctrica

Conforme a lo antes mencionado, los recubrimientos desarrollados en el presente trabajo tienen como principal objetivo simular algunas de las propiedades especiales que tiene el tejido óseo, la cual es su piezorespuesta. Para el análisis de piezorespuesta se identificaron las zonas de interés mediante MEB en modo de electrones retrodispersados, ver Figura 28. Posterior al análisis MEB se procedió a la medición puntual mediante AFM con el módulo de piezorespuesta en modo DART.

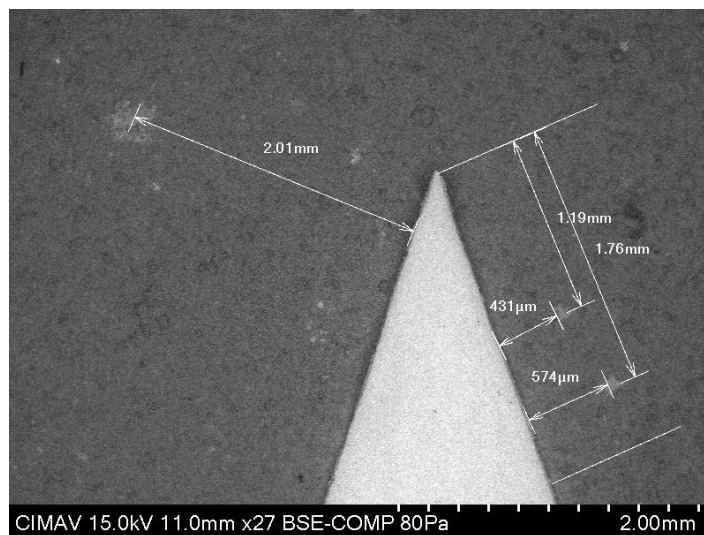


Figura 28 Micrografía MEB representativa para la identificación de zonas de interés para su posterior análisis de piezorespuesta mediante AFM módulo DART.

En la Figura 29, se muestran algunos espectros característicos de desplazamiento vs voltaje de polarización ($D - V$) (gráfica en línea negra), donde se puede observar las curvas típicas de ala de mariposa las cuales infieren en un comportamiento piezoeléctrico por parte de los recubrimientos HA/BT. A su vez utilizando las curvas ($D - V$) se

obtuvieron los datos del coeficiente piezoeléctrico vs voltaje ($d_{33} - V$) (grafica en línea azul), para la obtención de este grafico se calculó el d_{33} específico para cada punto empleando la siguiente ecuación (12).

$$d_{33} = \frac{D-D_1}{V-V_1} \quad (12)$$

Donde D es el valor medido de la deformación piezoeléctrica, V es el voltaje aplicado para cada punto de la curva $D-V$, D_1 y V_1 es el valor de la deformación piezoeléctrica y voltaje donde ocurre dicha deformación (zona de intersección de la curva $D-V$) [106].

Mediante esta técnica se pudo observar que los recubrimientos muestran un comportamiento similar al de un material piezoeléctrico, en el cual. Se observó que los valores de respuesta piezoeléctrica para los recubrimientos HA/BT BM se encuentran por encima de los valores obtenidos para el tejido óseo.

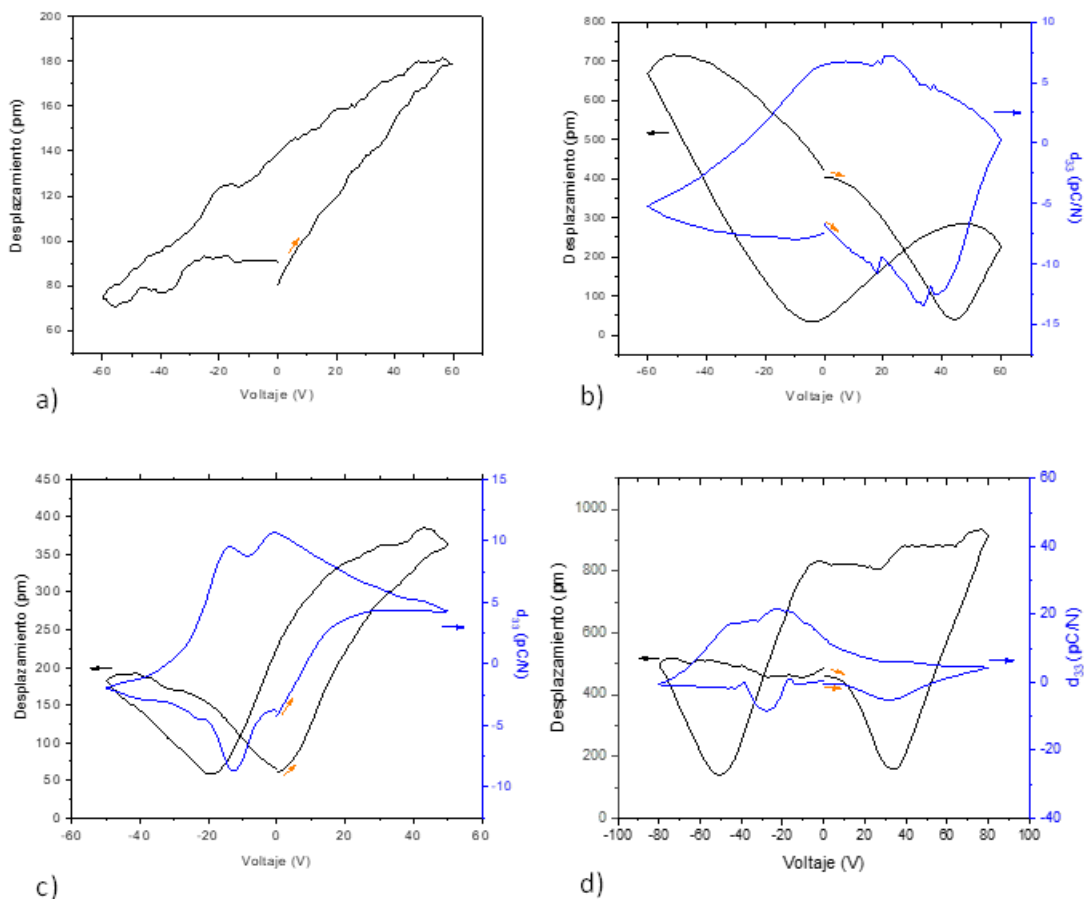


Figura 29 Curvas de polarización vs desplazamiento y polarización vs coeficiente piezoeléctrico para los recubrimientos; a) HA, b) HA10BT, c) HA30BT y d) HA50BT.

Tabla 14 Valores obtenidos de constante piezoeléctrica mediante AFM módulo DART.

Muestra	Coefficiente piezoeléctrico (d_{33}) $\rho C/N$
Hueso [61]	0.7 - 2.3
HA10BT	7.5 ± 4
HA30BT	12 ± 3
HA50BT	18 ± 5

8.2.2.6 Estabilidad del recubrimiento: Velocidad de corrosión

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis de la resistencia a la polarización; en el inciso a) se muestran las curvas de polarización propias para el sustrato y cada uno de los recubrimientos HA/BT BM, en ellas se logra observar un comportamiento anódico y catódico característico tras la aplicación de la ventana de potencial de ± 0.03 V vs E_{corr} (considerando el Log de I). En el inciso b) se puede observar el comportamiento de la velocidad de corrosión para cada uno de los recubrimientos HA/BT BM; En la tabla 15 se observan los valores E_{corr} , I_{corr} , Vel_{corr} y R_p obtenidos mediante el análisis de las curvas de resistencia a la polarización con el software IviumSoft [80].

Como se muestra en la Figura 30 a) y b), se observa un efecto de protección hacia el sustrato de Ti6Al4V ELI debido a la presencia de HA en la matriz del recubrimiento, ya que es un material altamente resistivo, viéndose reflejado en el desplazamiento de E_{corr} hacia valores positivos y por ende la disminución en la velocidad de corrosión del sustrato. Por otra parte, al analizar el efecto del contenido de BT en los recubrimientos de HA/BT BM, se puede observar un aumento en la velocidad de corrosión del sustrato conforme aumenta la concentración de BT en la matriz, ya que se observó un decremento en el E_{corr} del sistema, lo cual es debido principalmente al comportamiento ferroeléctrico del BT; por otra parte en los resultados mostrados en la tabla 15 se puede observar que en un recubrimiento de 100% BT existe un incremento 3 veces mayor en la corriente del sistema en comparación al obtenido para la aleación de Ti6Al4V, disminuyendo así la resistividad en el sistema y por ende un aumento en la velocidad de corrosión de dicho sustrato.

De acuerdo con lo mencionado, los recubrimientos tanto HA10BT como HA30BT muestran un mejor comportamiento en cuanto a la protección del sustrato, teniendo velocidades de corrosión por debajo a las de la aleación Ti6Al4V ELI.

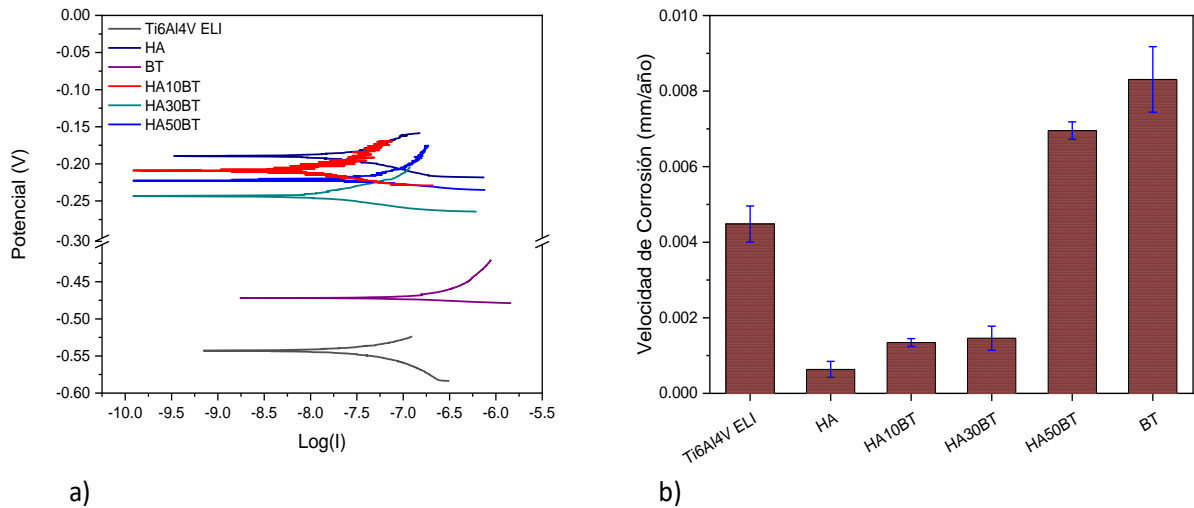


Figura 30 a) Curvas RP obtenidas para los recubrimientos base HA/BT, b) Velocidades de corrosión obtenidas para sustrato Ti6Al4V ELI, recubrimientos HA, BT y recubrimientos base HA/BT.

Tabla 15 Valores obtenidos mediante análisis RP para las diferentes muestras.

	E_{corr} (mV)	I_{corr} (A/cm ²)	Vel_{corr} (mm/año)	R_p (Ω)
Ti6Al4V	-502 ± 3.1E-02	3.83E-07 ± 1.8E-07	4.45E-03 ± 4.7E-04	7.06E+04
HA	-182 ± 4.5E-02	2.53E-07 ± 2.6E-07	3.35E-04 ± 2.1E-04	3.55E+05
HA10BT	-258 ± 4.3E-02	1.09E-07 ± 6.1E-08	1.35E-03 ± 1.1E-04	1.37E+05
HA30BT	-247 ± 2.3E-02	1.07E-07 ± 1.1E-07	1.46E-03 ± 3.2E-04	3.53E+05
HA50BT	-187 ± 1.8E-02	7.99E-07 ± 3.1E-07	6.96E-03 ± 2.3E-04	1.09E+05
BT	-310 ± 3.2E-02	9.40E-07 ± 3.6E-07	8.31E-03 ± 8.7E-04	2.57E+04

8.2.3 Caracterización in vitro: Ensayos biológicos

8.2.3.1 Citotoxicidad y actividad celular por ensayo MTT

De acuerdo al análisis de espectroscopia UV-Vis para la determinación de la absorbancia obtenida para cada una de los recubrimientos de HA/BT BM y el cálculo de porcentaje citotóxico; los recubrimientos de HA/BT BM mostraron un comportamiento citotóxico aceptable como se puede mostrar en la Figura 31, en donde se muestra el porcentaje de citotoxicidad para las diferentes diluciones y a los diferentes tiempos; de acuerdo a los

valores estipulados por las normas ISO 10993 [100] y ASTM F895 [101], los recubrimientos muestran un comportamiento de citotoxicidad aceptable, teniendo valores de citotoxicidad inferiores al 10%, por lo que tanto la HA así como el BT podrían ser considerados como biomateriales debido a este comportamiento.

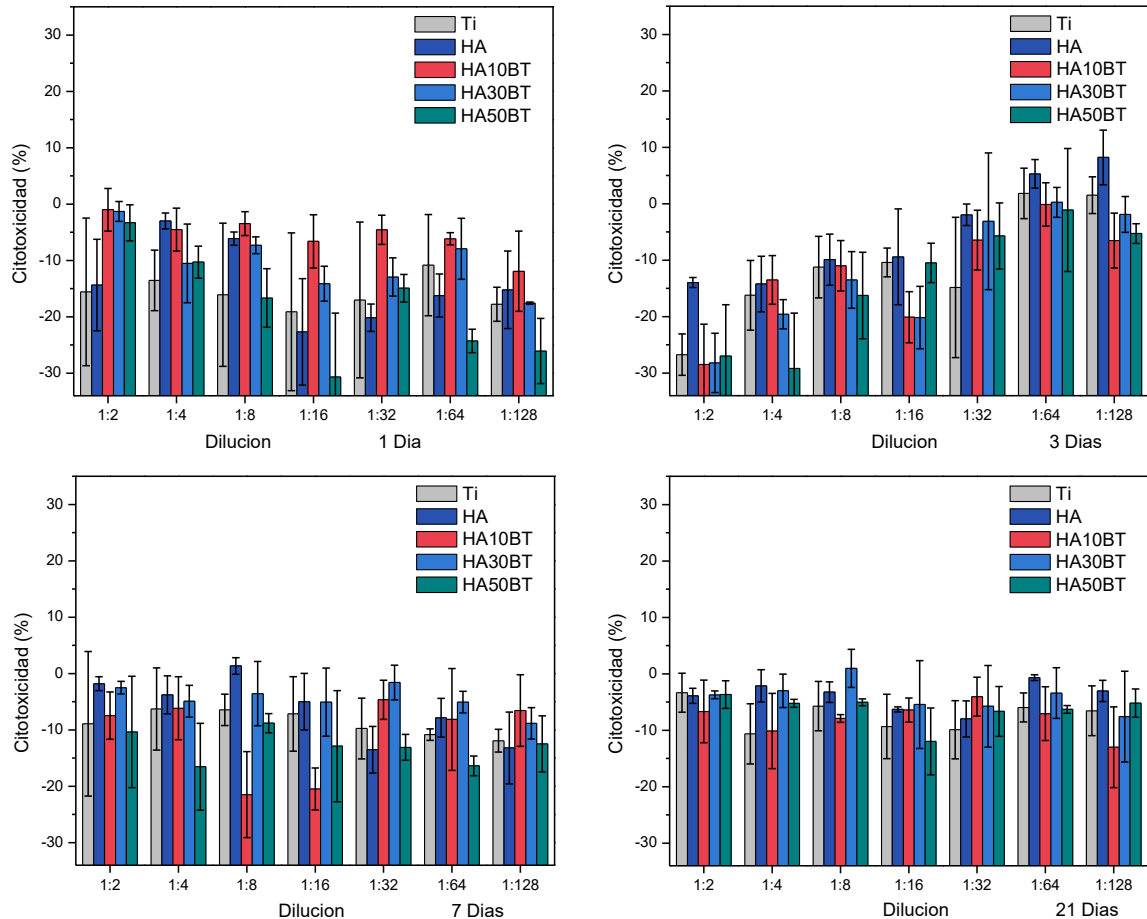


Figura 31 Comportamiento de citotoxicidad a diferentes tiempos de exposición, 1 día, 3 días, 7 días y 21 días.

Por otra parte, en las gráficas mostradas en la Figura 32, se observa que mediante el análisis de viabilidad celular por ensayo de actividad enzimática de reducción de MTT a formazan, se observó una tendencia positiva en los recubrimientos con un contenido de BT en la matriz, ya que el análisis a diferentes tiempos se observa que estos promueven una mayor actividad celular a las distintas diluciones, teniendo valores de actividad celular cercanas a los controles osteoconductores como lo son el Ti y el recubrimiento de HA; sin embargo un comportamiento aislado se observa a los 3 días, en el cual se observa que para las diluciones con mayor concentración de sobrenadante, existe una mayor actividad celular, sin embargo, esta actividad disminuye conforme aumenta el grado de

dilución; este mismo comportamiento se observó para todas los recubrimientos de HA/BT BM.

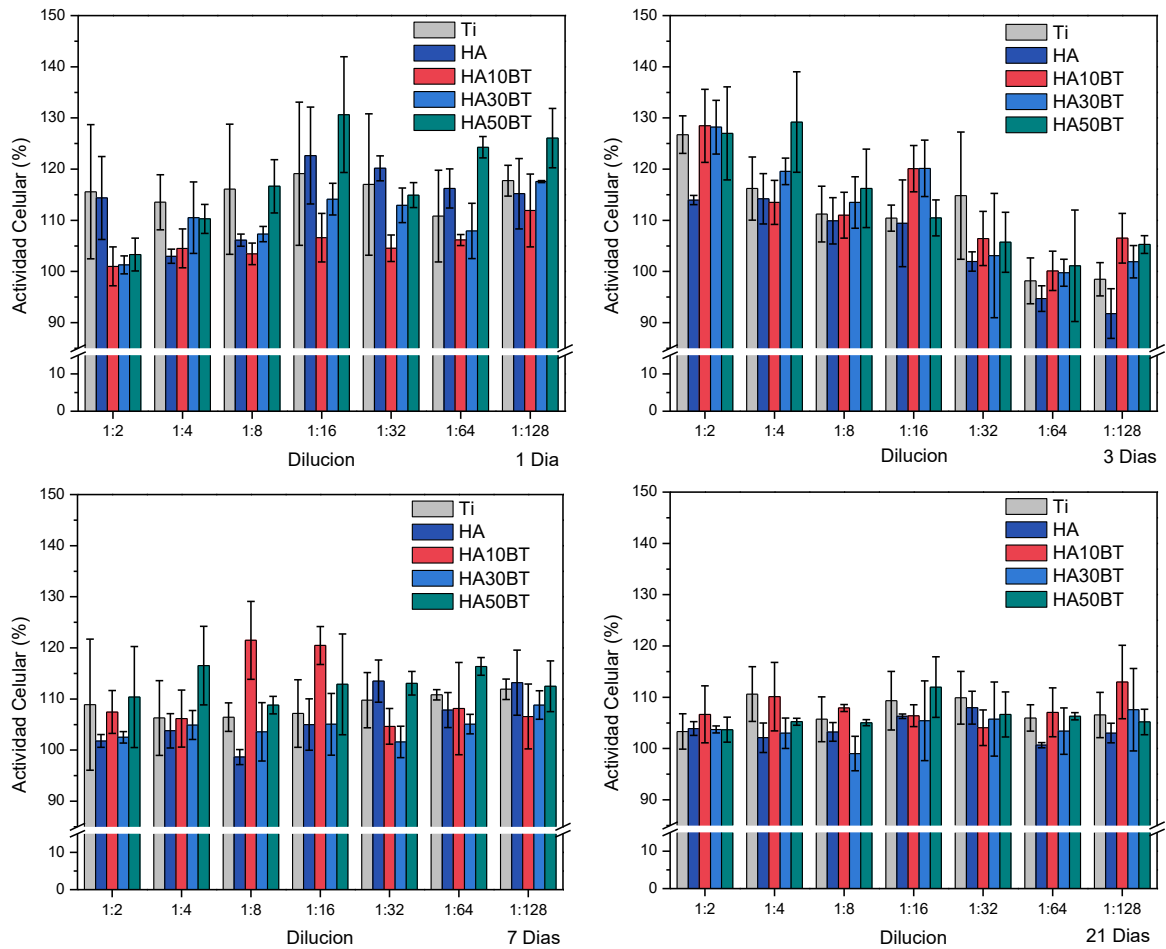


Figura 32 Comportamiento de actividad celular a diferentes tiempos de exposición, 1 día, 3 días, 7 días y 21 días.

De acuerdo con lo anterior, en la Figura 33 se muestra el análisis de viabilidad celular vs tiempo para tres diferentes diluciones, una dilución baja 1:2, una dilución intermedia 1:16 y una dilución alta 1:128. Se observa que para las dilución baja, que corresponde a la de mayor concentración de sobrenadante sometido a exposición directa a los recubrimientos, se observa una mayor actividad alcanzando valores de 130% de actividad en el periodo de 3 días para la mayoría de las muestras, teniendo una disminución de la actividad a tiempos prolongados de 7 días en adelante, lo anterior puede deberse a una posible liberación de iones que pudiesen influir en la actividad celular o bien una posible degradación de los nutrientes presentes en el medio de cultivo debido al tiempo prolongado de exposición. Por otra parte, el comportamiento para los sobrenadantes con mayor índice de dilución, 1:16 y 1:128, se observa que la mayor actividad se da a los

tiempos cortos de exposición, alcanzando valores de 130% y 125% de viabilidad para las diluciones 1:16 y 1:128 respectivamente, siendo el recubrimiento de HA50BT el cual tuvo mayor actividad. Al igual que la dilución menor se observó una disminución de la actividad a tiempos prolongados.

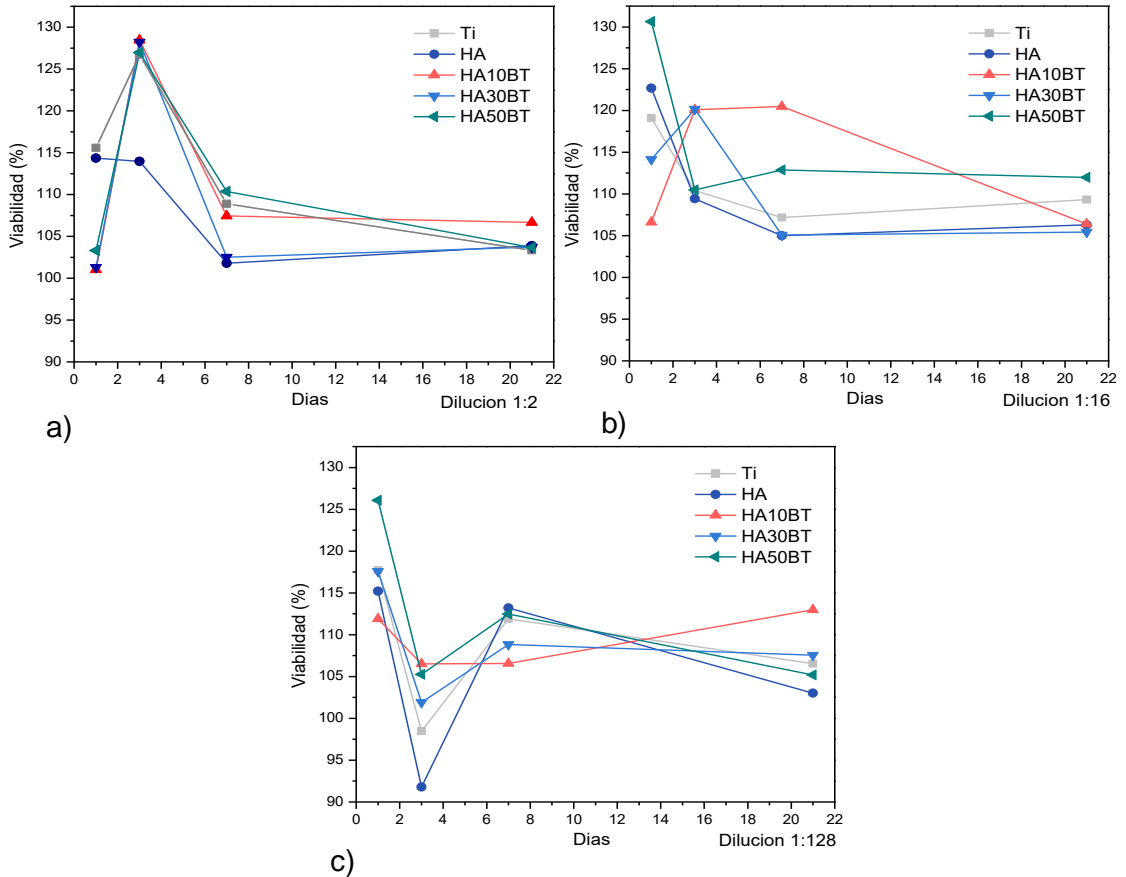


Figura 33 Viabilidad celular para los recubrimientos HA/BT BM a diferentes diluciones de sobrenadante: a) dilucion 1:2, b) dilucion 1:16 y c) dilucion 1:126.

8.2.3.2 Inmunofluorescencia

En las Figuras 34 y 35 se muestra las micrografías obtenidas mediante el ensayo de inmunofluorescencia mediante la tinción de anticuerpos específicos a los 7 días de incubación sin tratamiento y con tratamiento de ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS) respectivamente. Para el análisis de las micrografías, las imágenes fueron procesadas mediante el software ZEN Blue 3.0 [89]. Las micrografías en color azul muestran la tinción por el marcador DAPI, el cual, actúa fuertemente en regiones

proteicas enriquecidas con adenina y timina, las cuales se encuentran presentes en el núcleo celular. En las micrografías en color rojo se observa el marcador de faloidina rodaminada, el cual, actúa como marcador de proteína de F-actina, presente principalmente en la región del citoesqueleto celular, así como regiones del núcleo. Las micrografías en color verde muestran la tinción por el marcador de osteocalcina, la cual es una proteína asociada a procesos de actividad celular ósea, dicha proteína está involucrada en los procesos de crecimiento, reproducción y diferenciación celular, proceso mediante el cual el osteoblasto sufre una transformación de mineralización de su matriz celular, para de esta manera transformarse en un osteocito o célula ósea mineralizada.

A diferencia del sustrato de Ti6Al4V ELI, en la figura 34 se puede observar un cambio significativo en cuanto a actividad celular para los recubrimientos HA/BT BM, en los cuales se observa una mayor cantidad de células sobre la superficie de los recubrimientos. En base a esto y los resultados obtenidos mediante viabilidad celular podemos confirmar que los recubrimientos desarrollados base HA/BT son promotores de la actividad celular ósea.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante el tratamiento LIPUS, se puede observar en la Figura 35, a diferencia del sustrato y el recubrimiento base HA, que los recubrimientos base HA/BT muestran un cambio en cuanto a la morfología celular, lo cual se puede observar en un retraimiento de la membrana celular, mostrando una morfología más redondeada; dicho cambio se debe al estrés generado por la inducción de la respuesta piezoeléctrica mediante el tratamiento por LIPUS. De acuerdo con los parámetros utilizados, el estrés inducido está ligado directamente con la concentración de BT en la matriz del recubrimiento, lo cual, se puede observar que para concentraciones de 10 y 30%, no afecta en su totalidad a las células ya que se puede observar la expresión de OCN, que de acuerdo a lo antes descrito, representa un marcador de actividad celular específica para la replicación y diferenciación celular; sin embargo, al aumentar la concentración de BT a un 50% se puede observar una menor cantidad de células en la superficie del recubrimiento debido con un cambio significativo en su morfología originado por el estrés provocado por la piezorespuesta de la fase de BT.

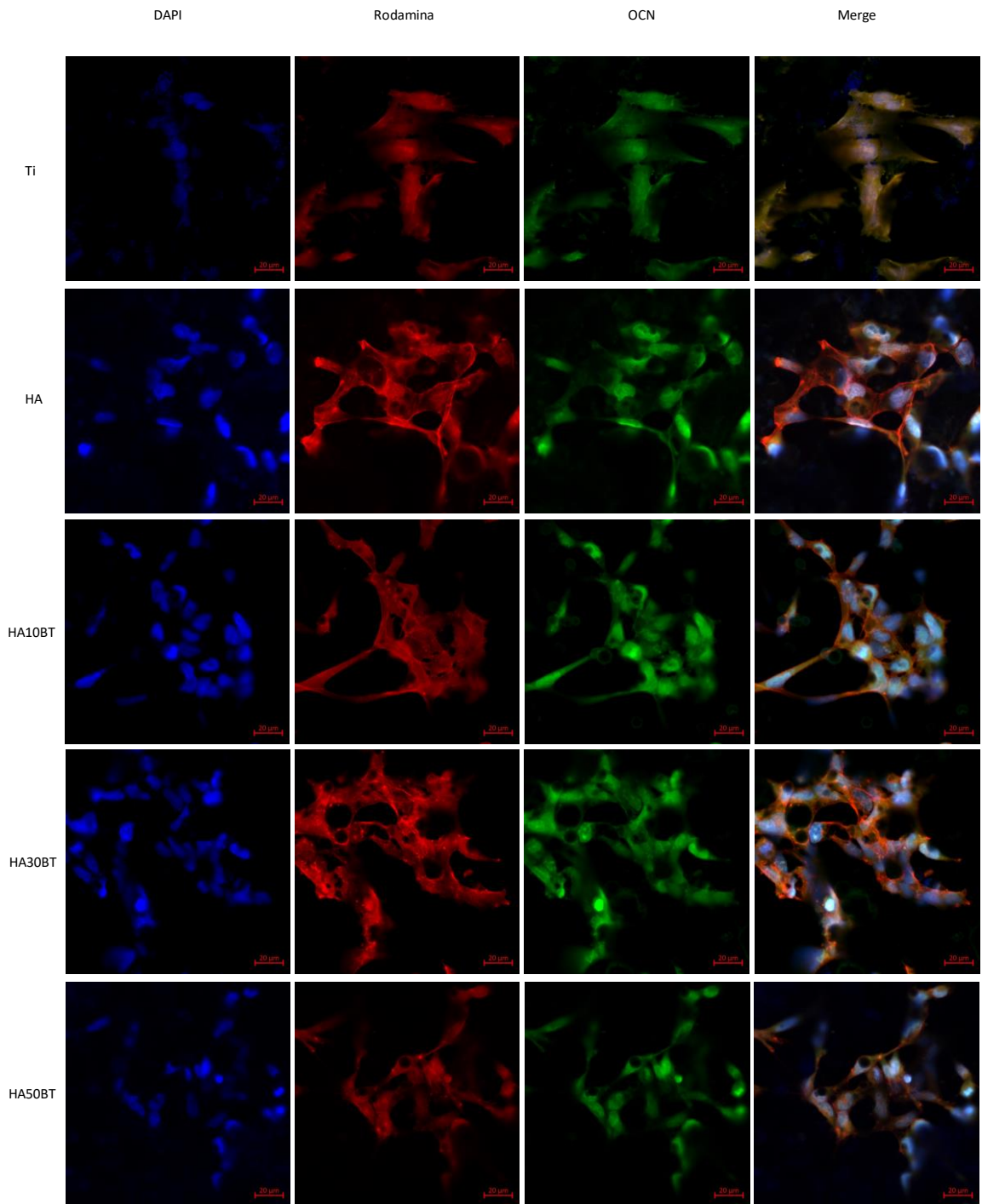


Figura 34 Micrografías de inmunofluorescencia para el recubrimiento HA/BT BM sin tratamiento LIPUS vs marcadores específicos. Tiempo de incubación 7 días.

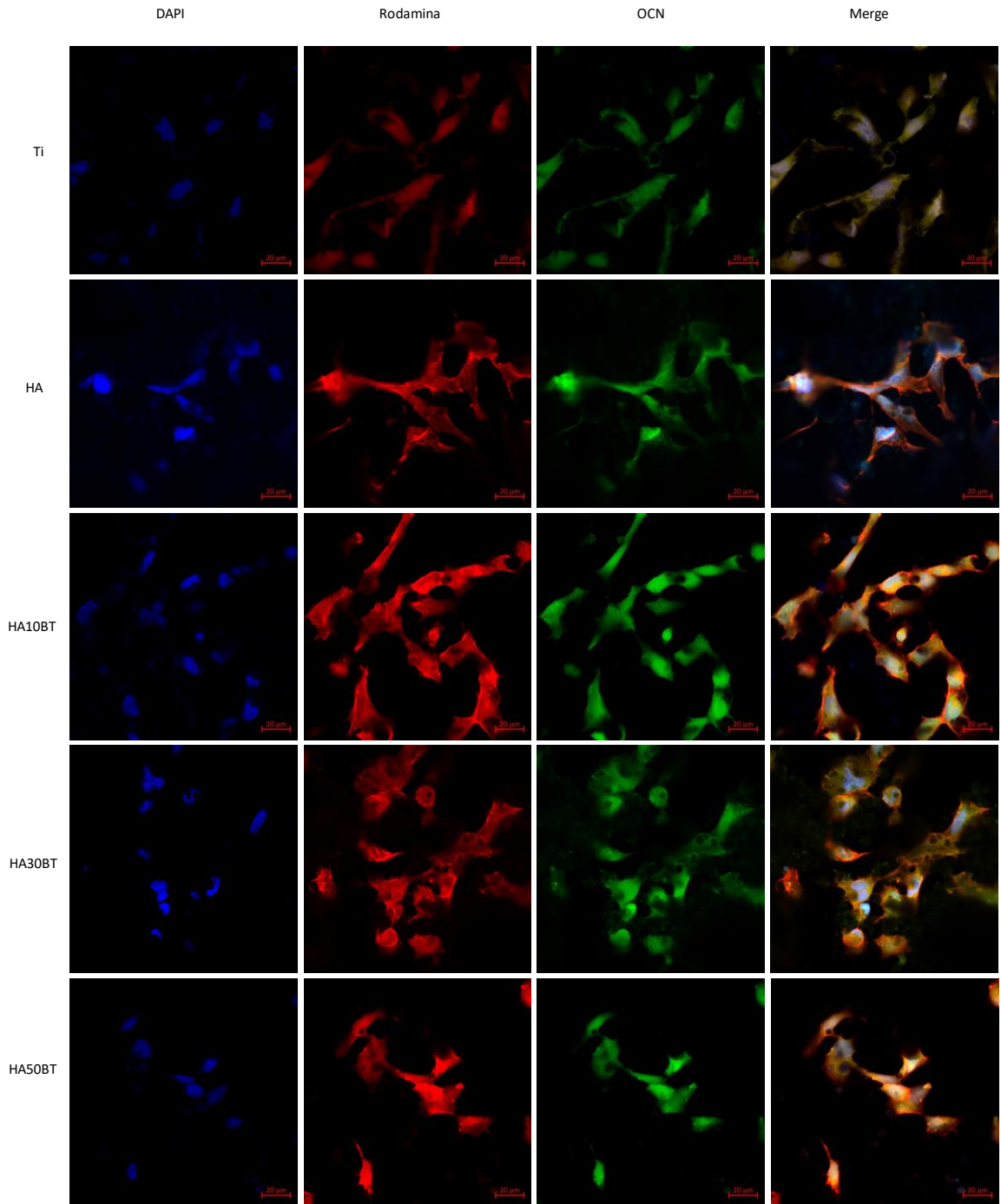


Figura 35 Micrografías de inmunofluorescencia para el recubrimiento HA/BT BM con tratamiento LIPUS vs marcadores específicos. Tiempo de incubación 7 días.

8.3 Etapa IV: Incorporación de nanopartículas de plata a recubrimiento HA-BT, caracterización del recubrimiento.

8.3.1 Caracterización

8.3.1.1 Análisis de fases: DRX y espectroscopia Raman

En la Figura 36 se muestran un comparativo de los patrones de difracción para los polvos HA30BTnAg vs polvos de HA30BT vs polvos iniciales (HA y BT). Comparando los espectros HA30BT vs HA30BTnAg, se puede observar la presencia de la fase de Ag en la matriz; dichas señales corresponden a los planos 110 a 44.5 grados en 2θ y el plano 200 a 65 grados en 2θ de la fase de Ag (identificado con símbolo ■), para la indexación de estos planos se utilizó el software Match! Crystal Impact (versión 1.11) [83]. La carta cristalográfica utilizada para la indexación fue la 00-004-0783, la cual corresponde a una estructura cúbica. Por otra parte, se pudo observar que la adición de nAg sobre la matriz no genera una fase secundaria durante el proceso de homogenización, por lo que, tanto la fase de BT y de HA mantienen su estructura. Para la identificación de fase de HA y BT se utilizaron las cartas cristalográficas con el número 00-074-0566 y 00-081-2204 respectivamente, las cuales corresponden a una estructura hexagonal para la HA y una estructura tetragonal para el BT.

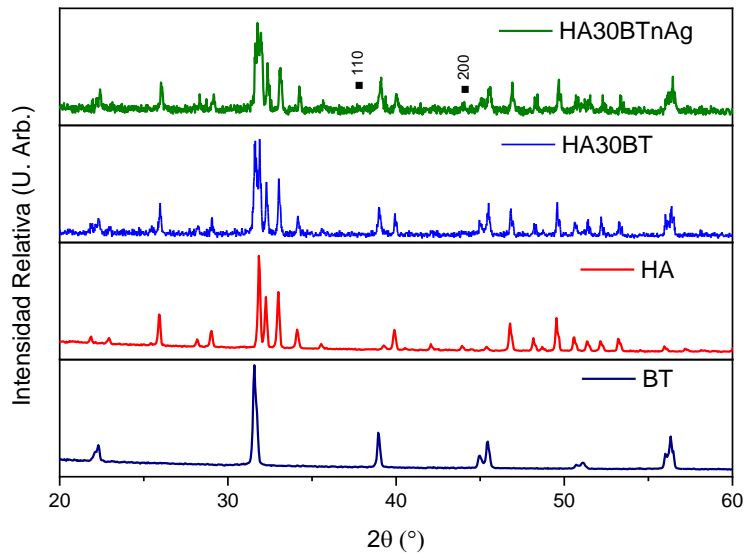


Figura 36 Comparativo de patrones de difracción de mezcla de polvos precursores de recubrimiento vs materia prima.

En la Figura 37 se muestran el comparativo de los polvos iniciales vs los recubrimientos fabricados a partir de ambas matrices (HA30BTnAg y HA30BT), en ambos recubrimientos se puede observar la aparición de fases secundarias, lo cual es debido a la degradación térmica de la HA durante el proceso de proyección térmica por plasma, dichas fases corresponden a TTCP, siendo los planos (013) y (040) identificados con \square , TCP con la aparición de la señal del plano (015) (identificado con símbolo \bullet) a 31° en 2θ ; por otra parte, se logra observar la aparición de la señal para los planos (111), (200) y (220) a $32, 37$ y 54° en 2θ respectivamente, los cuales corresponden a la fase de óxido de calcio (CaO, identificado con símbolo \circ). Las cartas cristalográficas utilizadas para la identificación de estas fases fueron la 00-032-0176 y 00-082-1690, las cuales corresponden a una estructura romboedral para TCP y una estructura cubica para CaO. En ambos recubrimientos se logra observar la fase tetragonal de BT, sin embargo para ambos casos, se puede observar un ensanchamiento de las señales, lo cual, indica una posible reducción en el tamaño de grano debido al proceso de proyección. Por otro lado, para el caso del recubrimiento HABTnAg se logra observar la presencia de la fase de Ag (identificada con símbolo \blacksquare) en su estructura cubica, dichas señales se pueden observar a los 44.5 grados en 2θ el plano 110 y a los 65 grados en 2θ el plano 200, para su indexación fue utilizada la carta cristalográfica 00-004-0783.

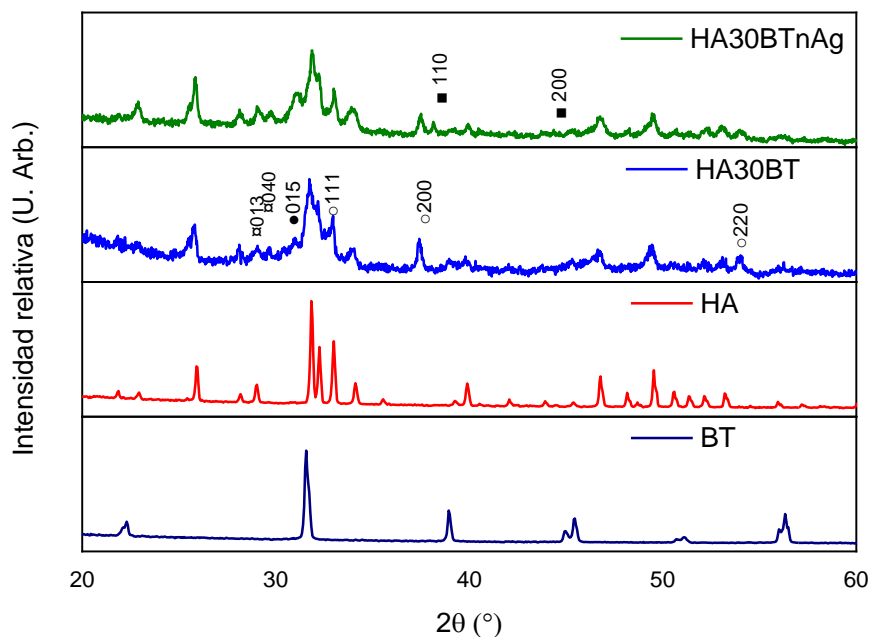


Figura 37 Comparativo de patrones de difracción de recubrimientos vs materia prima.

8.3.1.2 MEB

En la Figura 38 se muestran las micrografías obtenidas mediante MEB por electrones retrodispersados para sección superficial y sección transversal de los recubrimientos H30BT y HA30BTnAg. En la Figura c) y d), las cual corresponde al recubrimiento HA30BTnAg, se muestra una buena distribución de todas las fases contenidas en el recubrimiento; se pueden observar una menor cantidad de aglomeraciones de fases pesadas (regiones brillantes) sobre la matriz del recubrimiento, las cuales corresponderían a la fase de BT. Para ambos recubrimientos se observa a simple vista una buena adherencia al sustrato, por lo que, se podría decir que la adición de nAg al sustrato pudiera tener una adherencia similar a la del recubrimiento sin nAg.

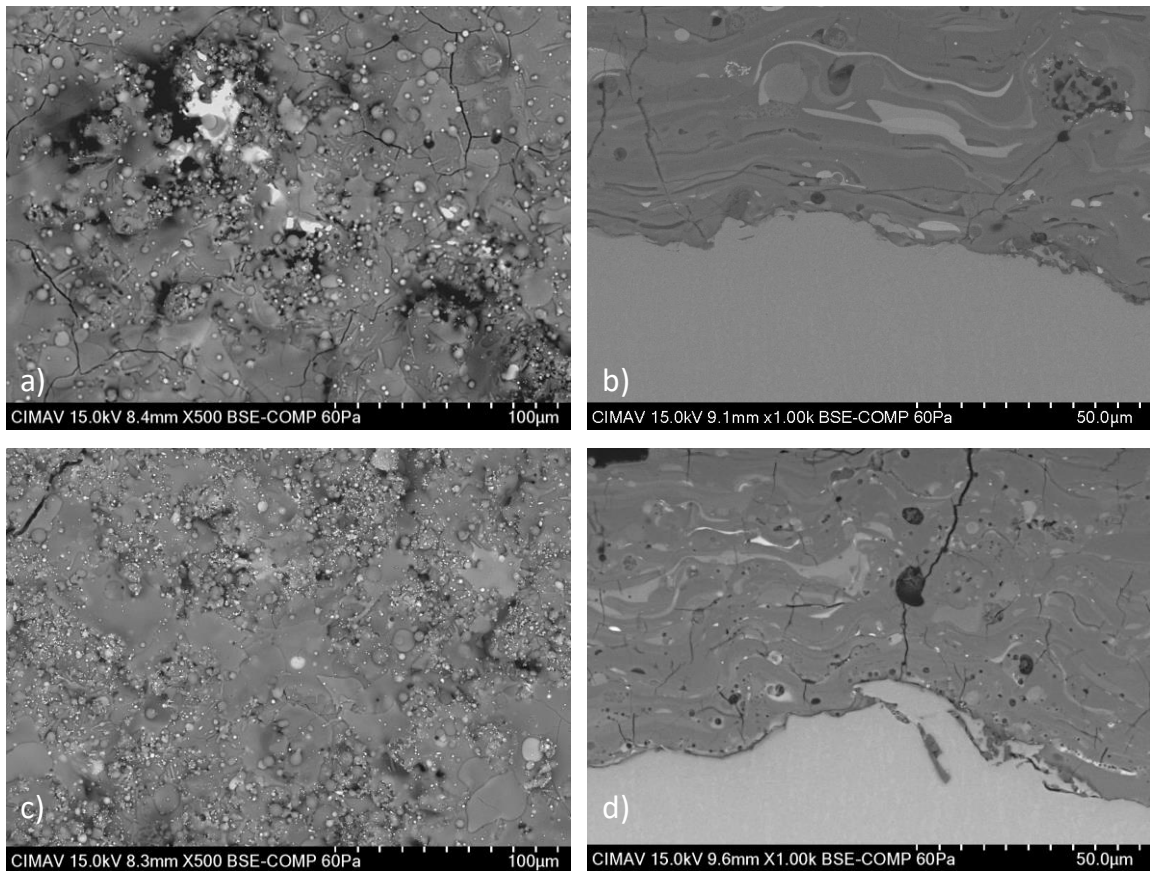


Figura 38 Micrografías MEB obtenidas por electrones retrodispersados; a) y b) se muestra la sección superficial y transversal para el recubrimiento HA30BT, c) y d) se muestra la sección superficial y transversal para el recubrimiento HA30BTnAg.

8.3.1.3 Adherencia

En la Figura 39 se muestran los valores de adherencia nominal de los recubrimientos HA, HA30BT y HA30BTnAg, los cuales fueron desarrollados mediante la metodología descrita en base a la norma ASTM C633 [88], además se muestra un comparativo contra los valores reportados por Zhiguo et al. (2014) [55] para un recubrimiento base BT, los cuales, muestran un comportamiento similar en cuanto a adherencia nominal. Se puede observar, de acuerdo con la Tabla 16, los valores obtenidos para el recubrimiento HA30BTnAg son similares a los valores obtenidos para el recubrimiento sin nAg, teniendo un incremento del 100% con respecto al recubrimiento de HA comercial.

Por otra parte, en la Figura 40 se muestra el comparativo del análisis visual en la zona de falla para el recubrimiento HA30BT y HA30BTnAg, donde se puede observar una tendencia hacia un comportamiento de falla tipo cohesivo; sin embargo, para el recubrimiento con presencia de nAg, se puede apreciar un ligero aumento en la falla de tipo adherente, la cual impacta en las propiedades de adherencia, sin llegar a ser un factor para considerar.

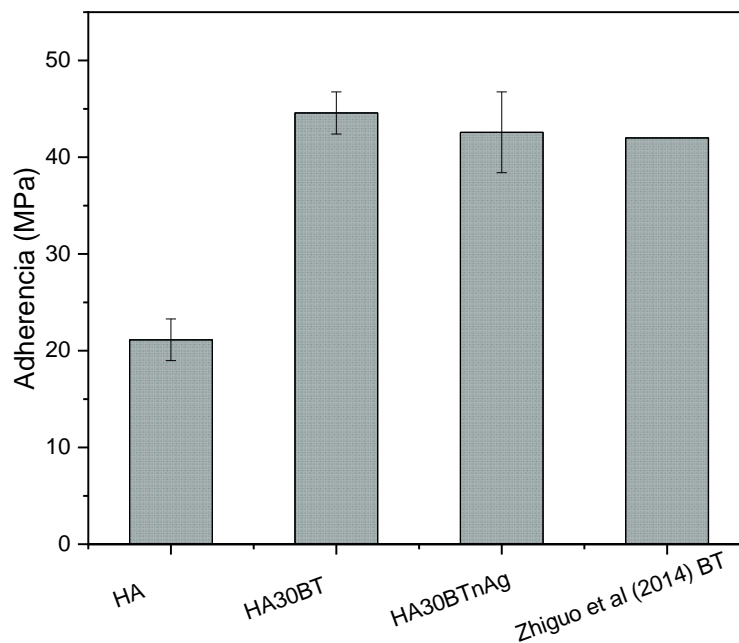


Figura 39 Comportamiento de adherencia nominal para recubrimientos HA30BT y HA30BTnAg.

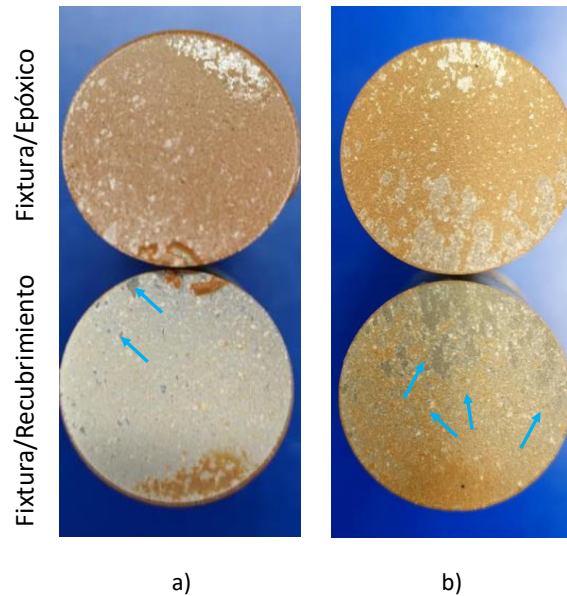


Figura 40 Analisis de falla en seccion superficial de las fixturas recubiertas para los recubrimientos a) HA30BT y b) HA30BTnAg.

Tabla 16 Valores de adherencia de los recubrimientos y comportamiento de falla.

Muestra	Adherencia	Comportamiento	
		Adhesivo	Cohesivo
HA	21 ± 2	84 ± 4	16 ± 4
HA30BT	44 ± 2	11 ± 2	89 ± 2
HA30BTnAg	42 ± 3	17 ± 4	83 ± 4

8.3.1.4 Nanoindentación

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el ensayo de nanoindentación, se muestra en la Figura 41 el comparativo entre las curvas de carga desplazamiento para el recubrimiento HA30BTnAg y su homólogo sin nanopartículas de plata (HA30BT). Se puede observar a simple vista el comportamiento es muy similar, siendo la profundidad de penetración ligeramente por encima del recubrimiento homologo HA30BT. En la tabla 17 se muestran los valores de propiedades mecánicas para ambos recubrimientos así como el comparativo con los materiales en bulk reportados en la literatura.

Al igual que los recubrimientos base HA/BT, se realizó un análisis ANOVA de una sola vía mediante el uso del software Origin Pro-8.5 con un factor de tolerancia $p > 0.05$. El análisis estadístico mostro que no existe un efecto significativo en cuanto a la adición de

nAg a la matriz del recubrimiento teniendo un valor de $p > 0.05$, indicando que la hipótesis nula es aceptada.

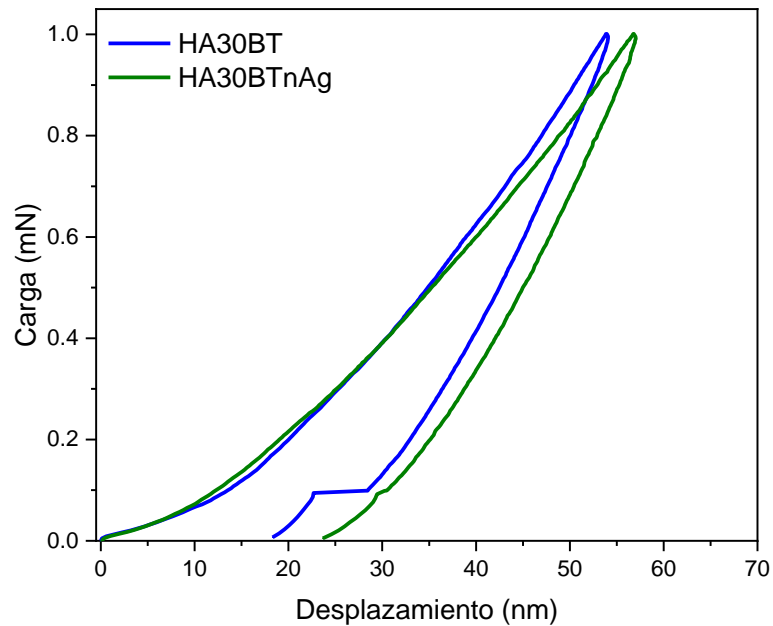


Figura 41 Curvas representativas de esfuerzo desplazamiento para los recubrimientos HA30BT y HA30BTnAg.

Tabla 17 Valores de propiedades mecánicas obtenidas mediante nanoindentación.

Muestra	Rigidez, S(N/m)	Modulo Elástico, E(GPa)	Dureza, H(GPa)
Hueso Cortical [97]		15-25	0.760
Hueso Trabecular [97]			0.234
HA [95]	-	125	6.19
HA30BT	47149 ± 45	123 ± 2	9.1 ± 0.3
HA30BTnAg	47251 ± 49	119 ± 3	8.8 ± 0.8
BT [98]		190	15.0

8.3.2 Caracterización *in vitro*: Ensayos biológicos

8.3.2.1 Citotoxicidad

En la Figura 42 se muestran los valores de citotoxicidad celular calculada mediante el ensayo MTT para las diluciones de sobrenadante a los diferentes tiempos de exposición, 1, 3, 7 y 21 días. Se puede observar que, de acuerdo con los valores permisibles por la norma ISO 10993-5 [100] y ASTM F895 [101], los recubrimientos base HA30BTnAg

muestran un comportamiento de citotoxicidad aceptable; se puede observar que los valores de citotoxicidad se mantienen en valores negativos, lo que quiere indicar que el comportamiento del material tiene una actividad celular superior a la de la muestra control (células sin tratamientos), por lo que los recubrimientos podrían considerarse como promotores para el crecimiento celular. Por otra parte, posterior al análisis de la presencia de Ag en el recubrimiento, se puede observar, una ligera disminución de la actividad celular en tiempos cortos, sin embargo, a tiempos de mayor exposición, el comportamiento se ve similar al recubrimiento con ausencia de nAg. En general, ambos recubrimientos (con y sin nAg) obtuvieron valores de citotoxicidad inferiores al 10% (límite marcado por la FDA para la clasificación de un biomaterial como no tóxico), por lo que de acuerdo con los criterios de las normas establecidas por esta administración, se pueden considerar a los recubrimientos HA/BT BM con y sin nAg, como biomateriales con una respuesta de citotoxicidad nula o baja.

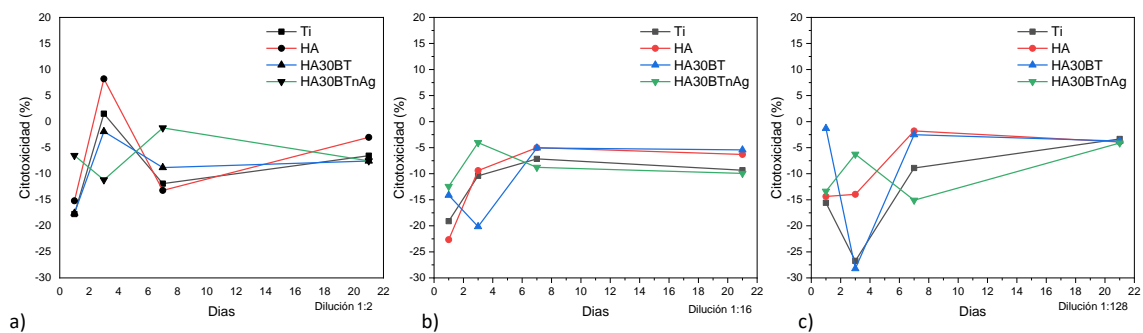


Figura 42 Comparativo de comportamiento citotóxico de muestras para las diferentes diluciones; a) se muestra la dilución 1/2, b) se muestra la dilución 1/16 y c) se muestra el comportamiento de la dilución 1/128.

8.3.2.2 Inmunofluorescencia

Como se muestra en la Figura 43, la adición de nAg sobre la matriz de HA30BT no muestra un efecto negativo para el crecimiento celular, ya que se mantienen una morfología típica de tipo fibroblastoide. Además se puede observar que mediante el marcador de anticuerpo de OCN, la Ag presente en el recubrimiento muestra una buena respuesta en cuanto a la actividad celular, se puede observar al igual que el recubrimiento HA30BT, la OCN se encuentra presente tanto en núcleo como en citoesqueleto, lo cual indica que, la OCN es secretada y transportada hacia todas las

regiones de la célula para de esta manera intervenir en los procesos metabólicos y de osteogénesis ósea.

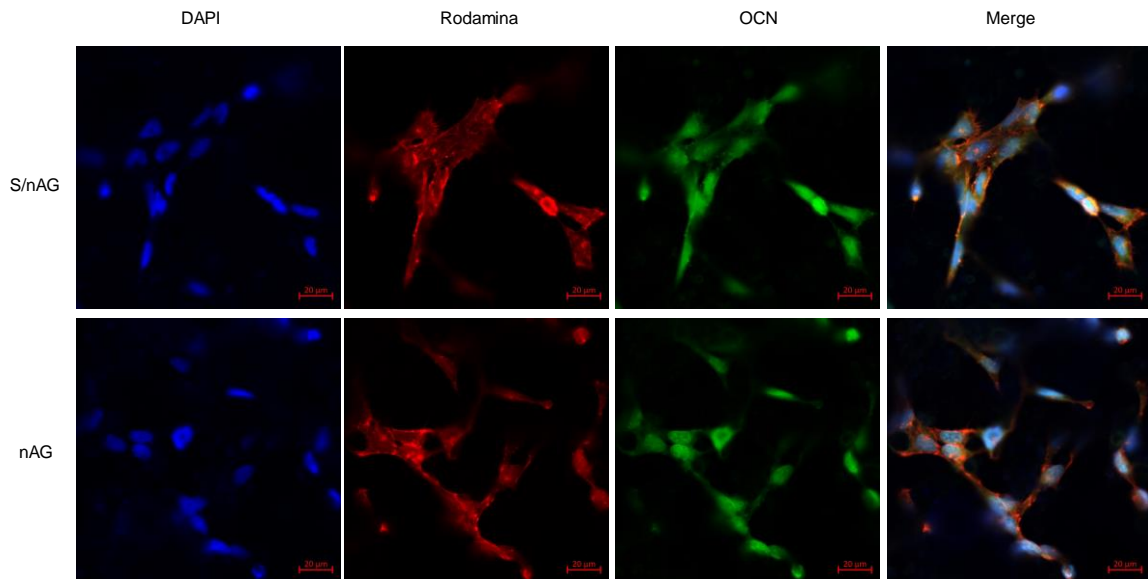


Figura 43 Micrografías obtenidas por ensayo de inmunofluorescencia para los recubrimientos HA30BT con y sin nAg; en color azul la tinción del núcleo (DAPI), en verde la tinción de OCN (FITC), en rojo la tinción de citoesqueleto (Rodamina), por último el condensado de las tres señales.

Por otra parte, en la Figura 44, se muestran el comparativo de las micrografías para el recubrimiento HA30BTnAg con y sin tratamiento mediante LIPUS. Donde se puede observar que el recubrimiento conteniendo Ag, al igual que el recubrimiento sin nAg (ver figura 43), presenta cierto cambio en la morfología celular debido al estrés provocado por los impulsos mecánicos y la respuesta piezoeléctrica propia del material, sin embargo, se puede observar que este estrés provocado en las células no interfiere en la expresión de OC.

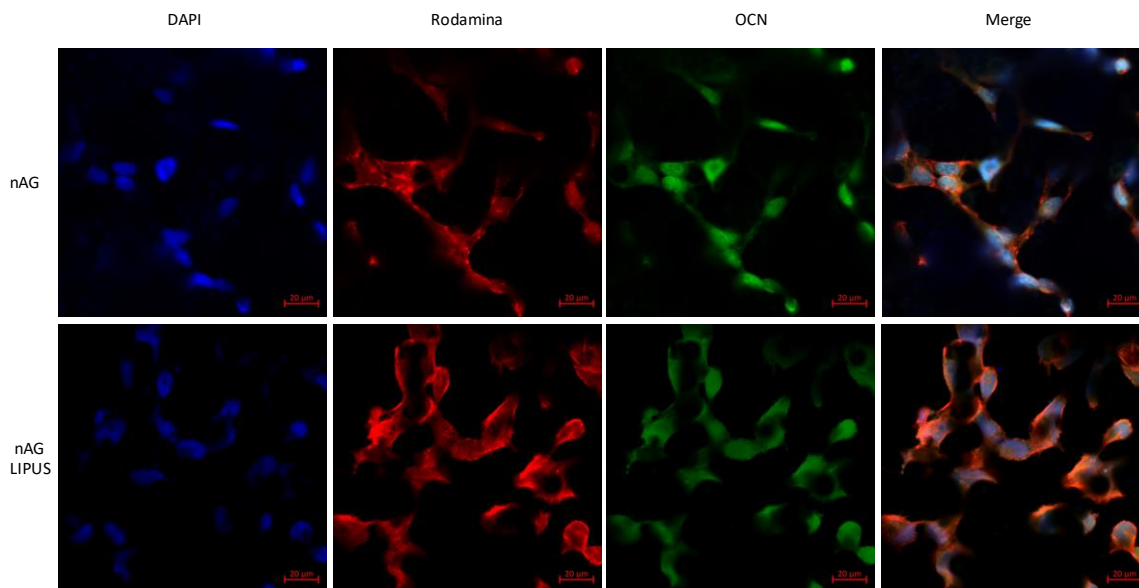


Figura 44 Micrografías obtenidas por ensayo de inmunofluorescencia para los recubrimientos HA30BTnAg con y sin aplicación de ultrasonido pulsado (LIPUS): En color azul la tinción del núcleo (DAPI), en verde la tinción de OCN (FITC), en rojo la tinción de citoesqueleto (Rodamina), por último el condensado de las tres señales.

8.3.2.3 Eficiencia antibacterial

En la figura 45 se muestra un comparativo del crecimiento bacteriano para las diferentes cepas de estudio: *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se puede observar que el recubrimiento HA30BTnAg muestra una alta eficiencia antibacteriana ante las tres cepas de prueba, en las cuales se observa un nulo crecimiento de colonias posterior a las 24 horas de incubación. En cuanto al sustrato de titanio, se puede observar que este no muestra propiedades antibacteriales, ya que se observa un crecimiento significativo de colonias bacterianas posterior a las 24 horas de incubación.

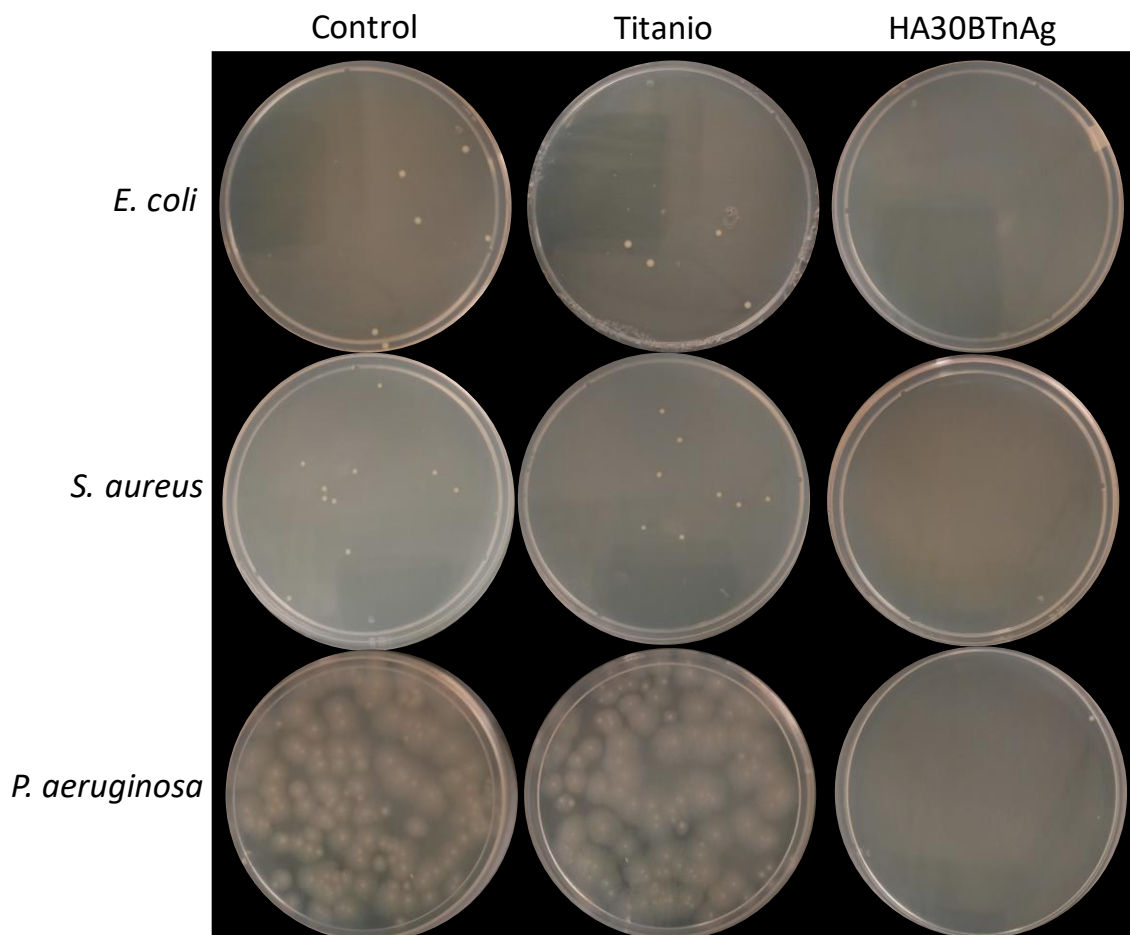


Figura 45 Comparativo de crecimiento bacteriano para control, sustrato de titanio y recubrimiento base HA30BTnAg.

En cuanto al análisis de eficiencia antibacterial, en las tablas 18, 19 y 20 se muestra los valores calculados para la actividad antimicrobiana (R) y el porcentaje de eficiencia antibacterial para las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se puede observar que de acuerdo con los criterios establecidos por la norma JIS Z2801 [90], el recubrimiento HA30BTnAg muestra valores actividad antimicrobiana (R) de 10.27, 10.1 y 8.9 para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente, valores los cuales garantizan una alta eficiencia antibacterial en un periodo de 24 horas de incubación, alcanzando valores de 100% ante *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. En cuanto al sustrato se puede observar que los valores obtenidos para la actividad antimicrobiana muestran valores por debajo del límite permisible de acuerdo con la norma JIS Z2801 [90] para la clasificación de materiales con propiedades antibacteriales ($R < 2$), los valores alcanzados para el titanio son 0.16, 0.22 y 0.11 para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente, lo cual

infiere en que el sustrato no muestra algún efecto biocida siendo promotor del crecimiento bacteriano.

Tabla 18 Valores de actividad antimicrobiana (R) y eficiencia antibacterial para el recubrimiento HA30BTnAg vs Sustrato de Ti para la cepa E. coli.

<i>Escherichia coli ATCC 4157</i>			
Muestra	UFC	Actividad antimicrobiana (R)	Eficiencia Antibacterial (%)
Control	1.80E+8	-	-
Ti	1.20E+8	0.16	29.7
HA30BTnAg	0	10.27	100

Tabla 19 Valores de actividad antimicrobiana (R) y eficiencia antibacterial para el recubrimiento HA30BTnAg vs Sustrato de Ti para la cepa S. aureus.

<i>Staphylococcus aureus ATCC 24213</i>			
Muestra	UFC	Actividad antimicrobiana (R)	Eficiencia Antibacterial (%)
Control	4.40E+8	-	-
Ti	2.00E+8	0.22	24
HA30BTnAg	0	10.1	100

Tabla 20 Valores de actividad antimicrobiana (R) y eficiencia antibacterial para el recubrimiento HA30BTnAg vs Sustrato de Ti para la cepa P. aeruginosa.

<i>Pseudomona aeruginosa ATCC27833</i>			
Muestra	UFC	Actividad antimicrobiana (R)	Eficiencia Antibacterial (%)
Control	3.04E+7	-	-
Ti	2.66E+7	0.11	21.6
HA30BTnAg	0	8.9	1000

9 DISCUSIÓN

De acuerdo con los criterios establecidos por la FDA en base a las normas ISO y ASTM para el desarrollo de un recubrimiento base HA para prótesis ortopédicas óseas, se pudo llegar a las condiciones ideales para la obtención de un recubrimiento optimizado considerando los análisis de adherencia nominal, difracción de rayos X, microscopia electrónica de barrido y ensayos *in vitro*.

Como fue mencionado, uno de los principales criterios establecidos por la FDA que debe cumplir los recubrimientos base HA es la adherencia nominal, el cual, de acuerdo con la norma ISO 13799-4 los recubrimientos deben tener un valor superior a 15MPa [80]. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se pudo observar dos factores que tienen una fuerte influencia en cuanto al comportamiento de adherencia del recubrimiento y el tipo de falla durante el ensayo.

El primer factor lo conforma el proceso de homogenización de la materia prima, el cual tiene un impacto significativo en cuanto a la distribución de fases en el recubrimiento, la cual se pudo observar en los resultados obtenidos por MEB. El procesamiento mediante molienda mecánica muestra una mejor dispersión de fases, observándose aglomeraciones de menor tamaño, que, a diferencia de los recubrimientos desarrollados mediante la homogenización de los polvos por agitación mecánica, los cuales, muestran una mayor incidencia en la aglomeración de fases y por ende una disminución en cuanto a las propiedades de adherencia de los recubrimientos. Por otra parte, mediante el análisis de falla y los resultados obtenidos en la fase de optimización, se pudo observar que mediante el tratamiento de molienda mecánica (metodología tipo V), los recubrimientos mostraron prácticamente la eliminación de fracturas, teniendo un impacto significativo para el comportamiento de falla tipo cohesiva. Contrario a esto, los recubrimientos desarrollados por agitación mecánica (metodología tipo IV) mostraron la presencia de fracturas tanto en la región del recubrimiento así como en la interfase del sustrato, generando un comportamiento de falla de tipo adherente.

El segundo factor lo conforma la concentración de BT sobre la matriz del recubrimiento. Mediante el análisis realizado para los recubrimientos optimizados, se pudo observar que, de acuerdo con las tres concentraciones analizadas en el presente estudio, existe una

concentración ideal en cuanto a la fase de BT en la matriz, siendo el recubrimiento HA30BT BM (30% P/P de BT en la matriz) el que presentó las mejores propiedades de adherencia y comportamiento de falla de tipo cohesiva (44 MPa y 89% de falla de tipo cohesiva respectivamente). Este valor de adherencia (44 MPa) se puede considerar ligeramente por encima de los 42 MPa presentados por Zhiguo et al (2014) para un recubrimiento por proyección térmica por plasma de BT [55], sin embargo al compararlo con los valores reportados por Gadow R et al (2010) [15], Kotian et al. (2019) [46], Heimann et al. (2013) [41] y Yang Y (2007) [102] para los recubrimientos de HA, se encuentran muy por encima de los ~22 MPa reportados por estos autores; además, se observó un comportamiento de falla contrario a lo reportado por dichos autores, ya que se observó para los recubrimientos de HA/BT BM generado en la presente tesis, un comportamiento de falla del recubrimiento principalmente del tipo cohesivo a diferencia del recubrimiento base HA que es fue principalmente del tipo adherente; lo cual, permite establecer que en caso de una falla fortuita del recubrimiento de HA/BT BM, el sustrato no se verá expuesto ya que siempre existirá un recubrimiento remanente, lo cual, favorecerá la estabilidad propia de la prótesis.

Por otra parte, a través del análisis de fases por DRX para los recubrimientos desarrollados en el presente estudio, se pudieron elucidar las fases secundarias típicas debido a la degradación térmica de la HA. Como mencionan Gadow, R. et al. (2010) [15], Kotian et al. (2019) [46], Heimann et al. (2013) [41], este fenómeno se produce debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de deposición por proyección térmica, donde la descomposición de la HA comienza con la formación de la oxihidroxiapatita (OHA) debido a la deshidroxilación (\uparrow OH⁻) que ocurre en el rango de 1173 a 1623. Posterior a esto, en un rango de 1620 a 1758 K, la degradación de HA da como resultado la formación de TCP y CaO. Finalmente, aumentando la temperatura por encima de 1750 K, comienzan a formarse TTCP y P₂O₅. En el caso de la fase P₂O₅, según lo reportado por Heimann (2018) [47], es una fase de evaporación rápida a esta temperatura por lo que es difícil su detección. Por otra parte, a diferencia de los resultados mostrados por Gadow, R. et al. (2010) [15], Yang Y (2007) [102] y Zing et al. (2014) para los recubrimientos base HA, los recubrimientos desarrollados en la presente investigación mantienen una cristalinidad mostrando reflexiones definidas.

En consecuencia a la degradación observada en los recubrimientos desarrollados, se seleccionó el recubrimiento de HA30BT BM, ya que uno de los criterios establecidos por la FDA en base a la norma ISO 13799-2 [29] para el desarrollo de recubrimientos base HA, es que estos deben contener como mínimo el 50% de fase cristalina de HA, por lo que debido a la relación %P/P del recubrimiento HA50BT, este queda descartado para su posible aplicación para desarrollo de prótesis ortopédicas.

De acuerdo con los resultados de propiedades mecánicas reportados por Gaillard et al. (2009) [95] y Zizzet et al. (1999) [97] para el BT en bulk y tejido óseo respectivamente, se pudo observar que los valores de dureza y módulo elástico obtenidos en los recubrimientos HA/BT BM mediante el ensayo de nanoindentación, se encuentran en un valor intermedio de acuerdo a los valores en bulk reportados, por lo que el comportamiento del material responde a un material compósito, el cual es una mezcla de ambas fases (HA y BT)

Los valores de E_{corr} así como I_{corr} reportados para la aleación Ti6Al4V ELI en la presente tesis ($E_{\text{corr}}= 502 \text{ mV}$ e $I_{\text{corr}}= 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) se encuentran dentro de un rango cercano a lo reportado por S. Tamilselvi et al. (2006) [98] y por J. Lu, et al (2019) [99], S Tamilselvi et al (2006) [98] a un tiempo de estabilización de 0 horas muestra valores del potencial E_{corr} en el rango de -480 a 500 mV con una corriente de 0.1 a 5.0 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Por otra parte, de acuerdo con un estudio similar realizado por J. Lu, et al (2019) [99], los valores obtenidos para E_{corr} e I_{corr} para una aleación de Ti6Al4V se encuentran en el rango de -641mV y 25.38 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectivamente. Por otra parte mediante el mismo análisis, se pudo observar que los recubrimientos HA/BT BM presentaron un efecto significativo en la disminución de la I_{corr} y un desplazamiento de la E_{corr} (0.1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ y 250mV respectivamente), de esta manera observándose una disminución en la velocidad de corrosión del sustrato, lo cual, se debe principalmente al efecto resistivo del recubrimiento cerámico no conductor, principalmente por la fase de HA, mostrando de esta manera un efecto de barrera de protección

En base resultados obtenidos mediante el ensayo MTT y de acuerdo con las normas ISO 10993 [100] y ASTM F895 [101], los recubrimientos desarrollados en la presente investigación presentan un resultado favorable en cuanto a biocompatibilidad, ya que los resultados obtenidos para este ensayo quedan por debajo del valor máximo de respuesta

citotóxica permisible (10%), lo anterior se debe a que las fases de BT así como nAg no muestran un efecto negativo en cuanto a la actividad celular, ya que en conjunto con los resultados observados mediante inmunofluorescencia, se pudo observar que las células muestran una buena adhesión sobre la superficie, dando una morfología fibroblastoide (típica de un osteoblasto). Resultados similares han sido reportados por Baxter et al (2009) [65] en un compósito de HA con una concentración de 90% de BT no se observa una respuesta negativa en cuanto a la proliferación celular medida mediante el ensayo MTT, los valores reportados alcanzan un 2% de citotoxicidad, a su vez la morfología reportada no da indicios de un posible daño y/o estrés ocasionados por la fase de BT, de esta manera se concuerda que la fase de BT en la matriz de un recubrimiento base HA muestra una potencial aplicación para su uso médico.

De acuerdo con los resultados obtenidos por expresión de osteocalcina, se pudo observar mediante los ensayos *in vitro*, la expresión de dicha proteína en los recubrimientos desarrollados en el presente estudio muestra resultados prometedores, para el caso de las fases de BT y nAg, estas no muestran algún efecto negativo en dicha expresión. Por otra parte, en conjunto con los resultados obtenidos mediante AFM-DART para la obtención de la respuesta piezoeléctrica y los resultados del ensayo *in vitro* mediante el tratamiento con LIPUS, se pudo observar un efecto significativo debida a la concentración de BT en el recubrimiento en la actividad celular y la morfología, los cuales se ven afectados debido al estrés inducido por la respuesta piezoeléctrica del recubrimiento.

De acuerdo con los estudios a nivel *in vitro* realizados por Chen et al. (2007) [104] y Cao et al. (2017) [105] para el efecto del tratamiento LIPUS a nivel celular muestran un cambio significativo en la actividad celular de acuerdo con las potencias utilizadas durante el tratamiento (50-150mW/cm²); a potencias altas se ve disminuida la actividad celular, morfología y expresión de proteínas específicas como la osteocalcina (OC). En el presente estudio se observó algunos cambios en morfología celular, donde se observó un retracción de la membrana celular, mostrando un cambio en la morfología asociado al estrés provocado por la respuesta piezoeléctrica del material, en la que a concentraciones del 50% de BT en la matriz del recubrimiento y la potencia utilizada (100mW/cm²) generan un estrés significativo modificando la morfología celular y proliferación; sin embargo, para los muestras que carecen de respuesta piezoeléctrica, el tratamiento de

ultrasonido no mostró un cambio significativo en cuanto a morfología y expresión de OC que se vean afectados.

En base a los resultados obtenidos mediante el ensayo de eficiencia antibacterial, se observó que el recubrimiento HA30BT a una concentración de 1% de nAg muestran una alta eficiencia antibacterial ante *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, alcanzando una inhibición bacteriana superior al 99% en un periodo de 24 horas, resultados similares han sido alcanzados por Orozco et al (2014) [36] para concentraciones de 1, 3 y 5% de nanopartículas comerciales de Ag soportadas en la matriz de un recubrimiento APS base HA, donde, a la concentración de 3% mostró una alta eficiencia antibacterial para las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, resultados similares han sido reportados por Rodríguez et al (2017) [37], con el cual a una concentración de 1% de nanopartículas soportadas en extracto de nopal en un recubrimiento APS base HA muestran una eficiencia por arriba del 99 % a 24 horas para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Por otra parte Fielding et al. (2012) [40] para recubrimientos base HA/Sr y nAg al 2 % se observa una buena eficiencia antibacterial ante *P. aeruginosa*.

Por último en la Figura 46 se muestra el diagrama representativo de la optimización de un recubrimiento base HA30BTnAg el cual, de acuerdo con los resultados obtenidos muestra las propiedades adecuadas para su evaluación en un modelo animal (ensayos *in vivo*)

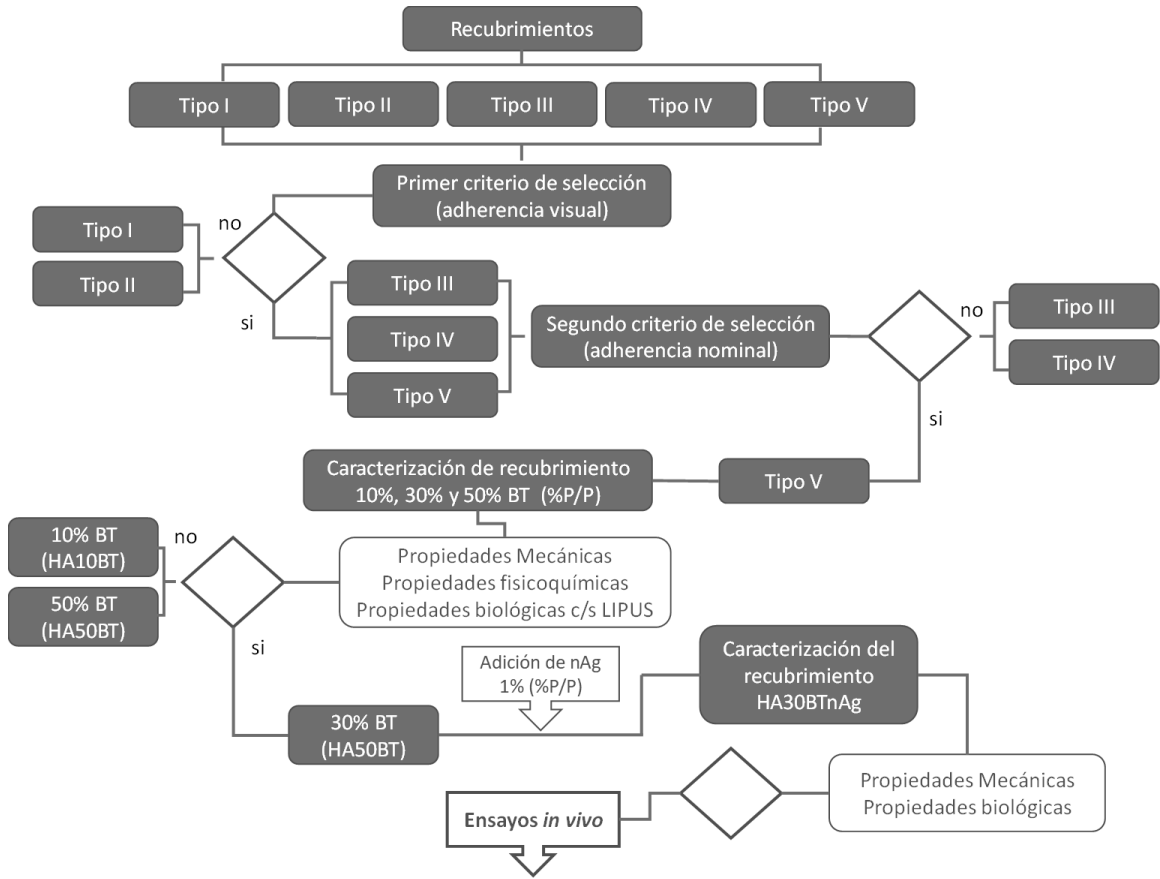


Figura 46 Esquema sintetizado del desarrollo de un biorecubrimiento multifuncional base HA30BTnAg.

10 CONCLUSIONES

- Se pudo observar que mediante la homogenización de los polvos precursores de recubrimiento por molienda mecánica se tiene un impacto significativo en la dispersión de BT en la matriz de HA, teniendo un impacto favorable en cuanto a propiedades de adherencia del material, en donde se logra observar el incremento de dicha propiedad en un 70% de los recubrimientos desarrollados por agitación mecánica.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa II, la concentración ideal para un recubrimiento base HA/BT BM fue con un contenido de 30% de nanopartículas de TiBaO_3 (%P/P), el cual de acuerdo con las diversas propiedades evaluadas en el presente estudio, presentó excelentes resultados posterior a los ensayos in-vitro.
- Derivado del estudio electroquímico, se observó que los recubrimientos HA10BT y HA30BT mostraron un comportamiento protector del sustrato, permitiendo que la vida útil de un implante con dichos recubrimientos presente una vida útil significativamente prolongada.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de piezorespuesta por AFM y los ensayos in-vitro se pudo observar que a concentraciones de 10 y 30% el efecto de ultrasonido muestra una buena respuesta en cuanto a la actividad celular, por lo que es necesaria la evaluación en un modelo animal con el fin de observar de manera real de cómo la propagación mecánica del ultrasonido pulsado a través de la piel, musculo y capa de grasa podrían influir en la estimulación de la piezorespuesta.
- Los resultados obtenidos en el ensayo MTT, y con base a las normas ISO 10993 y ASTM F895, se logró observar que los recubrimientos base HA/BT y HA/BT/nAg mostraron un excelente desempeño con respecto a la propiedad de citotoxicidad, observándose valores por debajo de los límites permisibles por la FDA (10% de citotoxicidad)

- En base a los resultados obtenidos para la eficiencia antibacterial, y de acuerdo con los criterios establecidos por la norma JIS Z2801, se logró observar que el recubrimiento desarrollado base HA30BTnAg mostro una alta eficiencia antimicrobiana con valores del 100% de inhibición, teniendo una potencial aplicación como material antimicrobiano.
- De acuerdo con los criterios establecidos por la FDA para el desarrollo de recubrimientos de implantes ortopédicos base HA, se logró la optimización y desarrollo de un recubrimiento base HA/BT/nAg con excelentes propiedades de adherencia, compatibilidad y actividad celular prometedoras para ensayos *in vivo*.

11 RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

- Realizar evaluaciones dinámicas para evaluar el comportamiento del recubrimiento optimizado HA30BT y HA30BTnAg.

En un modelo *in vivo*:

- Mediante la evaluación de química sanguínea en un modelo animal, evaluar la respuesta inmune del cuerpo biológico, la cual puede inferir en la compatibilidad o posible rechazo del implante.
- En modelo animal mediante técnicas de biología molecular, evaluar la expresión de proteínas involucradas en los procesos de osteogénesis, además mediante el tratamiento de ultrasonido pulsado de baja intensidad, de esta manera se podrá evaluar la influencia que tiene el material al ser inducido el efecto piezoeléctrico propio del recubrimiento.
- Posterior a la implantación en el modelo animal, realizar cortes histológicos en sección transversal y longitudinal del implante para evaluar la morfología del tejido adyacente a este, de esta manera obteniendo el grado de cicatrización ósea inducida por el material con y sin tratamiento de ultrasonido pulsado de baja intensidad. Así mismo mediante marcadores específicos de inmunofluorescencia, evaluar la expresión de proteínas involucradas en los procesos de osteogénesis para evaluar la influencia del efecto piezoeléctrico del material debido a su inducción mediante el tratamiento de ultrasonido pulsado de baja intensidad.
- Mediante cortes histológicos y microscopia electrónica de barrido, evaluar la morfología del tejido en alta resolución y calcular el grado de cicatrización ósea
- Mediante técnicas de microtomografía computarizada y recreación de imagen, evaluar la adherencia del material al tejido adyacente, así mismo mediante imágenes de corte evaluar el grado de cicatrización ósea para las muestras con y sin inducción del efecto piezoeléctrico mediante el tratamiento de ultrasonido pulsado de baja intensidad.

- Así mismo, posterior a la implantación, mediante los ensayos de “pull-off test” evaluar la adherencia del implante hacia el tejido óseo para las muestras con y sin tratamiento de ultrasonido pulsado y un material blanco (recubrimiento comercial de HA), mediante esta técnica se podrá evaluar la influencia que tiene el del efecto piezoeléctrico en los procesos de cicatrización.

12 REFERENCIAS

- [1] Ratner, B.D. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012.
- [2] Park, J. B., Lake, R.S. *Biomaterials: An Introduction*, 2nd Edition. Plenus Press. New York. 2008; pp. 177–197
- [3] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 15, pp. 2907-15, 2006.
- [4] Sarinnaphakorn, L., & Di Silvio, N. Chapter 23. Surface-modified titanium to enhance osseointegration in dental implants. In *Cellular response to biomaterials*, Woodhead Publishing Limited. 2009, 1st Ed., pp. 572–588.
- [5] Mucalo, M. *Hydroxyapatite (HA) for Biomedical Applications*; Woodhead Publishing Limited: Waltham, MA, USA, 2015; pp. 1–364.
- [6] Surmenev, R.A. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication. *Surf. Coat. Technol.* **2012**,206, 2035–2056.
- [7] Chow, L. Next Generation Calcium Phosphate-Based Biomaterials. *Dental Mater. J.* **2009**, 28, 1–10.
- [8] Costescu, A.; Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Ghita, R.V.; Chifiriuc, C.M.; Marutescu, L.G.; Predoi, D. Activity, Evaluation of Low Silver Concentrations in Silver-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2013**, 2013, 1–9.
- [9] Ciobanu, C.S.; Groza, A.; Iconaru, S.L.; Popa, C.L.; Chapon, P.; Chifiriuc, M.C.; Hristu, R.; Stanciu, G.A.; Negriila, C.C.; Ghita, R.V., Antimicrobial Activity Evaluation on Silver Doped Hydroxyapatite/Polydimethylsiloxane Composite Layer. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 2015, 926513.
- [10] Banerjee, S.; Banerjee, S.; Chakraborty, A.; Pal, T.K. Surface modifications of Endosseous dental implants: A review. *Periodontics. J. Indian Dent. Assoc.* **2016**, 10, 19–25.
- [11] Capuccini, C., Torricelli, P., Sima, F., Boanini, E., Ristoscu, C., Bracci, B., & Socol, G. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4(6), 1885–1893.
- [12] Hyup, J., Lin, H., Mee, K., Baek, H., Jin, K., Sun, K., ... Lee, H. (2013). In vitro and in vivo evaluation of the bioactivity of hydroxyapatite- coated polyetheretherketone biocomposites created by cold spray technology. *Acta Biomaterialia*, 9(4), 6177–6187.
- [13] Heimann, R.B. Surface & Coatings Technology Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. *Surf. Coat. Technol.* **2013**, 233, 27–38.

- [14] Gadow, R.; Killinger, A.; Stiegler, N. Hydroxyapatite coatings for biomedical applications deposited by different thermal spray techniques. *Surf. Coat. Technol.* **2010**, *205*, 1157–1164.
- [15] Heimann, R.B. Surface & Coatings Technology Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *233*, 27–38
- [16] Marsh, A.C.; Chamorro, N.P.; Chatzistavrou, X. Long-term performance and failure of orthopedic devices. In *Bone Repair Biomaterials*; Elsevier Ltd.: Cambridge, MA, USA, 2019; Chapter 15; pp. 349–410.
- [17] K. J. Bozic and M. D. Ries, “Wear and Osteolysis in Total Hip Arthroplasty,” pp. 142–152, 2005.
- [18] T. Hanawa, “Metal ion release from metal implants,” *Mater. Sci. Eng. C.* 2004. vol. 24, pp. 745–752
- [19] Teoh, S. H. Fatigue of biomaterials: a review. *International Journal of Fatigue*, 2000, *22*, 825–837.
- [20] Marsland, D., & Mears, S. C. A Review of Periprosthetic Femoral Fractures Associated With Total Hip Arthroplasty. *Geriatric Orthopaedic Surgery & Rehabilitation*, 2012, *3*(3), 107–120.
- [21] Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis.* 2006, *19*(4):349-56.
- [22] Shah MQ, Zardad MS, Khan A, Ahmed S, Awan AS, Mohammad T. Surgical Site Infection In Orthopaedic Implants And Its Common Bacteria With Their Sensitivities To Antibiotics, In Open Reduction Internal Fixation. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2017, *29*(1):50-53.
- [23] Lidgren, L. Infection of prosthetic joints. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2003, *17*(2), 209–218.
- [24] Klouche, S., Sariali, E., & Mamoudy, P. Total hip arthroplasty revision due to infection: A cost analysis approach. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 2010, *96*(2), 124–132.
- [25] Guerrero, Ó., Ortiz, G., Torres, J., & Lugo, R. Infecciones en reemplazos primarios totales de cadera. *Revista Colombiana de Ortopedia Y Traumatología*, 2007, *21*(1), 52–66.
- [26] Ariza, J., Euba, G., & Murillo, Ó. Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 2008, *26*(6), pp. 380–390.
- [27] Hinarejos, P., Guirro, P., Leal, J., Horcajada, J. P., & Puig, L. The Use of Erythromycin and Colistin-Loaded Cement in Total Knee Arthroplasty Does Not Reduce the Incidence of Infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery*,

2013,95, pp. 769–774.

- [28] Krebs, V., Yerger, E. S., Barsoum, W. K., Bauer, T. W., & Borden, L. S. (2005). Treatment of the Infected Total Hip Arthroplasty, 2005, 24(1).
- [29] Lidgren, L. Infection of prosthetic joints. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2013 17
- [30] Bistolfi, A., Massazza, G., Vern, E., Mass, A., Deledda, D., Ferraris, S., ... Crova, M. (2011). Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review. *ISNR Orthopedics*, 2011.
- [31] Carmona, V. O. (2014). Effect of Silver Nanoparticles in a Hydroxyapatite Coating applied by Atmospheric Plasma Spray Effect of Silver Nanoparticles in a Hydroxyapatite Coating applied by Atmospheric Plasma Spray. *International Journal of Electrochemical Science*, 2016.
- [32] Costescu, A.; Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Ghita, R.V.; Chifiriuc, C.M.; Marutescu, L.G.; Predoi, D. Activity, Evaluation of Low Silver Concentrations in Silver-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles. *J. Nanomater.* 2013, 2013, 1–9.
- [33] Ciobanu, C.S.; Groza, A.; Iconaru, S.L.; Popa, C.L.; Chapon, P.; Chifiriuc, M.C.; Hristu, R.; Stanciu, G.A.; Negrila, C.C.; Ghita, R.V.; et al. Antimicrobial Activity Evaluation on Silver Doped Hydroxyapatite/Polydimethylsiloxane Composite Layer. *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015, 926513.
- [34] Bai, X., More, K., Rouleau, C. M., & Rabiei, A. Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(6), 2264–2273.
- [35] Dror-Ehre, a., Mamane, H., Belenkova, T., Markovich, G., & Adin, a. Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 339(2), 521–526.
- [36] Carmona, V. O. (2014). Effect of Silver Nanoparticles in a Hydroxyapatite Coating applied by Atmospheric Plasma Spray Effect of Silver Nanoparticles in a Hydroxyapatite Coating applied by Atmospheric Plasma Spray. *International Journal of Electrochemical Science*, (November 2016).
- [37] Lozoya, D. A., Id, R. D. L., Fraceto, L. F., Ledezma, A., Bazaldua, M., Roberto, G., ... Carmona, O. Development of HA / Ag-NPs Composite Coating from Green Process for Hip Applications. *Molecules*, 2017, 22, 65–70.
- [38] Park, H. J., Park, S., Roh, J., Kim, S., Choi, K., Yi, J., ... Yoon, J. Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2013,19(2), 614–619.
- [39] Radzig, M. a., Nadtochenko, V. a., Koksharova, O. a., Kiwi, J., Lipasova, V. a., & Khmel, I. a. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 102, 300–306.

- [40] Fielding, G., Roy, M., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2012). Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 3144–3152.
- [41] Halperin, C., Mutchnik, S., Agronin, A., Molotskii, M., Urenski, P., Salai, M., & Rosenman, G. Piezoelectric Effect in Human Bones Studied in Nanometer Scale, 2014, pp. 4–7.
- [42] Mucalo, M. *Hydroxyapatite (HA) for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing Limited. 2015
- [43] Nakamura, S., & Kobayashi, Æ. T. Enhanced in vivo responses of osteoblasts in electrostatically activated zones by hydroxyapatite electrets, 2009, pp. 99–103.
- [44] Padilla, F., Puts, R., Vico, L., & Raum, K. Stimulation of bone repair with ultrasound: A review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics*, 2014, 54, pp. 1125–1145.
- [45] Reis, J., Frias, C., Canto, C., Lu, M., Marques, T., Sim, O., ... Potes, J. A New Piezoelectric Actuator Induces Bone Formation In Vivo: A Preliminary Study e Ant onio. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012
- [46] Senthilkumar, G., Saravanan, G., Vignesh, P., Vishwak, R. S., Joy, T. N., & Hemanandh, J. Proceedings Hydroxyapatite – barium / strontium titanate composite coatings for better mechanical, corrosion and biological performance. *Materials Today: Proceedings*. 2020.
- [47] Ustun, Y., Erdogan, O., Kurkcü, M., & Akova, T. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Dental Implant Osseointegration: A Preliminary Report, 2008, 254–262.
- [48] Willie, B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2007, 93, 384–398.
- [49] Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Publishing Group*, 2014, pp 1–10.
- [50] Okino, M., Coutelou, S., Mizuno, K., Yanagitani, T., Matsukawa, M., Okino, M., ... Matsukawa, M. Electrical potentials in bone induced by ultrasound irradiation in the megahertz range Electrical potentials in bone induced by ultrasound irradiation in the megahertz range. *Applied Physics Letters*, 2013, 103(701), 1–5.
- [51] Watanabe, Y., & Matsushita, T. Ultrasound for Fracture Healing: Current Evidence. *Journal Orthop Trauma*, 2010, 24(3), 56–61.
- [52] Kumar, D., Gittings, J., Turner, I., Bowen, C., Bastida-hidalgo, A. and Cartmell, S. "Polarization of hydroxyapatite: Influence on osteoblast cell proliferation," *Acta Biomater*, 2010 vol. 6, no. 4, pp. 1549–1554.
- [53] Capuccini, C., Torricelli, P., Sima, F., Boanini, E., Ristoscu, C., Bracci, B., & Socol, G. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-

- laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4(6), 1885–1893.
- [53] Levingstone, T. J., Barron, N., Ardhaoui, M., Benyounis, K., Looney, L., & Stokes, J. Surface & Coatings Technology Application of response surface methodology in the design of functionally graded plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Surface & Coatings Technology*, 2017, 313, 307–318.
- [54] Bodhak, S., Bose, S. and Bandyopadhyay, A. “Electrically polarized HAp-coated Ti : In vitro bone cell – material interactions,” *Acta Biomater.* 2010, vol. 6, no. 2, pp. 641–651,
- [55] Zhiguo, X., Haidou, W., Lina, Z., Xinyuan, Z., and Yanfei, H. “Properties of the BaTiO₃ coating prepared by supersonic plasma spraying,” *J. Alloys Compd.*, vol. 582, pp. 246–252, 2014.
- [56] M H. Ross, W. Pawlina, “Histología: Texto y Atlas, 5a Edición.”, *Editorial Medica Panamericana*, pp. 218–246.
- [57] Lombardi, M., Palmero, P., Haberko, K., Pyda, W., & Montanaro, L. The Contribution of Natural Hydroxyapatite to the Development of Bone Substitutes. *Key Engineering Materials*, 2013.
- [58] Kanazawa I. Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism. *World J Diabetes*. 2015 18, pp. 1345-54.
- [59] Conigrave, A. D., & Brennan-speranza, T. Osteocalcin: An Osteoblast-Derived Polypeptide Hormone that Modulates Whole Body Energy Metabolism. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96, 1–10.
- [60] Kirkham, G. R., & Cartmell, S. H. Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis. *Genes and Osteogenesis*, 2007, 3(0), 1–22.
- [61] A. Bur, Measurements of the dynamic piezoelectric properties of bone as a function of temperatura and humidity, *Journal Biomechanics*, 1976, 495-507.
- [62] Galkhowski, B. Petrisor and D. Dick, “Bone stimulation for fracture healing”, *Ind. J. Orthop*. 2009.
- [63] G. Ciofani, L. Ricotti, C. Canale, D. D. Alessandro, S. Berrettini, B. Mazzolai, and V. Mattoli, “Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2013, vol. 102, pp. 312–320,
- [64] Baxter, F., Turner, I., Bowen, C., Gittings, J. & Chaudhuri, J. An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using Saos-2 cells. *Journal Materials Science*, 2009, 20, 1697–1708.
- [65] Axter, F. Owen, C., Urner, I. and Ent, A. “Electrically Active Bioceramics : A Review of Interfacial Responses,” 2010, 38, pp. 2079–2092.

- [66] Nakamura, S. and Kobayashi, T. “Enhanced in vivo responses of osteoblasts in electrostatically activated zones by hydroxyapatite electrodes,” 2009, pp. 99–103.
- [67] J. W. Boretos, M. Eden, and Y. C. Fung, “Contemporary Biomaterials: Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects,” J. Biomech. Eng., 1985.
- [68] Portner, R, “Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols”, Humana Press, 3rd ed. 2014
- [69] R. I. Freshney, “Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications” 6th ed., Wiley-Blackwell, 2010.
- [70] Albee, F., and Morrison, H., “Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis”, Annals of Surgery, 1920.
- [71] Billotte, W., “Biomaterials: Ceramic Biomaterials,” Biomed. Eng. Fundam, 2007, pp. 1–34.
- [72] Chow, L. C. Solubility of Calcium Phosphates. *Monographs in Oral Science*, 18, 2001, pp 94–111.
- [73] Joon B Park, “Bioceramics : Properties, Characterizations, and Applications,” Springer, 2008.
- [74] García, C. Ceré, S., and a. Durán, “Bioactive coatings deposited on titanium alloys,” *J. Non. Cryst. Solids*, 2006, 352, pp. 3488–3495.
- [75] Sun, W., Chu, C., Wang, J., Zhao, H. Comparison of periodontal ligament cells responses to dense and nanophase hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007, 18, 677–683.
- [76] Narayanan, R., Seshadri, S.K., Kwon, T.Y., Kim, K.H. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 85B, 2008, pp 279–299.
- [77] YangY, Kim KH, Ong JL, A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying, *Biomaterials*, 2005;26: 327.
- [78] Schwartz, M. “Innovations in Materials Manufacturing, Fabrication and Environmental Safety, Cap.14 Coatings: Thermal Spray Processes,” CRC Press, 2014 385–444 pp.
- [79] Ruzbarsky, J. and Panda, A. “Plasma and Thermal Spraying”. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, 2017, pp 1-107.
- [80] ISO 13779-4 Implants for surgery-Hydroxyapatite. Part 4: Part 4: Determination of coating adhesion strength, Switzerland, 2008, pp.1–5
- [81] Method, S.T. ASTM C633-08 Standard Test Method for Adhesion or Cohesion

Strength of Thermal Spray Coatings, 2008, 3, 1–7.

- [82] Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 2012, 9, 671–675
- [83] Putz, H.; Brandenburg, K.; Match! 3.11 - Phase Analysis using Powder Diffraction. Crystal Impact: Bonn, Germany, 2003.
- [84] Oliver, W.C.; Pharr, G.; 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Research*. **1992**, 7, 1564–1583.
- [85] Sneddon, I.N.;. The Relation between Load and Penetration in the Axisymmetric Boussinesq Problem for a Punch of Arbitrary Profile. *Int. J. Eng. Science* **1965**, 3, 47–57
- [86] Doerner, M.F.; Gardner D. S.; Nix W.D. Plastic Properties of Thin Films on Substrates as Measured by Submicron Indentation Hardness and Substrate Curvature Techniques. *J. Mater. Research* **1986**, 1, 845–851.
- [87] Kokubo, T. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27, 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
- [88] Barss, A. Ivium Technologies B.V., IviumSoft, version 4.977
- [89] Carl Zeiss Microscopy GmbH, ZEN 3.0, Blue Edition [Software], 2019
- [90] JIS Z2801:2000 Antimicrobial product test for antimicrobial activity and efficacy, Tokyo, 2000.
- [91] Origin(Pro), Version 2018. OriginLab Corporation: Northampton, MA, USA, 2018
- [92] ISO 13779-2 Implants for surgery-Hydroxyapatite. Part 2: Coatings of hydroxyapatite, Switzerland, 2008, pp.1–5.
- [93] ISO 13779-3, Implants for surgery Hydroxyapatite Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity.
- [94] Method, S.T., ASTM F1609 - 08 Standard Specification for Calcium Phosphate Coatings for Implantable Materials. 2008.1-4
- [95] Kumar, D., Gittings, J., Turner, I., Bowen, C., Bastida-hidalgo, A. and Cartmell, S. "Polarization of hydroxyapatite : Influence on osteoblast cell proliferation," *Acta Biomater.*2010, vol. 6, no. 4, pp. 1549–1554.
- [96] Gaillard, Y, Hurtado, A., Muñoz-Saldaña, J. Anglada, M., Trápaga, G.. Nanoindentation of BaTiO₃: dislocation nucleation and mechanical twinning. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2009, 42, 1–8.
- [97] Zysset, P. K., Edward Guo, X., Edward Hoffler, C., Moore, K. E., & Goldstein, S. a. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *Journal of Biomechanics*, 1999,32(10),

1005–1012.

- [98] Tamilselvi, S., Raman, V., & Rajendran, N. Corrosion behaviour of Ti – 6Al – 7Nb and Ti – 6Al – 4V ELI alloys in the simulated body fluid solution by electrochemical impedance spectroscopy. *Acta Electrochemica*, 2006.
- [99] Lu, J., Zhang, W., Huo, W., Zhao, Y., Cui, W., & Zhang, Y. (2019). Electrochemical Corrosion Behavior and Mechanical Properties of Nanocrystalline Ti – 6Al – 4V Alloy. *Materials*. 2019.
- [100] ISO 10993-3, Biological evaluation of medical devices — Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
- [101] Method, S. T. ASTM F895 Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity, 2008.
- [102] Yang, Y. C., & Chou, B. Y. Bonding strength investigation of plasma-sprayed HA coatings on alumina substrate with porcelain intermediate layer. *Materials Chemistry and Physics*, 2007, *104*, 312–319.
- [103] Singh, T. P., Singh, H., & Singh, H. (2014). Characterization of thermal sprayed hydroxyapatite coatings on some biomedical implant materials, *12*(1), 48–56.
- [104] Chen, S., Chiu, C.-Y., Yeh, J.-M., & Wang, S.-H. (2007). Effect of Low Intensity Ultrasounds on the Growth of Osteoblasts. In *Annual International Conference of the IEEE EMBS Cité Internationale* (pp. 20–23). Lyon, France.
- [105] Cao, H., Feng, L., Wu, Z., Hou, W., Li, S., Hao, Y., & Wu, L. (2017). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the biological behavior of osteoblasts on porous titanium alloy scaffolds: An in vitro and in vivo study. *Materials Science & Engineering C*, *80*, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.078>
- [106] Chen, Z., Huang, J., Yang, Y., Wang, Y., Wu, Y., He, H., ... Jiang, Z. (2012). Piezoelectric properties of rhombic LiNbO₃ nanowires. *RSC Advances*, *2*(19), 7380–7383. <https://doi.org/10.1039/c2ra20237a>