



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA DELS MATERIALS I ENGINYERIA
METAL·LÚRGICA

Programa: Tecnología de Materiales, bienio 2002-2004

Recubrimientos biocompatibles obtenidos por
Proyección Térmica y estudio *in vitro* de la función
osteoblástica

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Ciencias Químicas
por Mireia Gaona Latorre,
bajo la dirección del Profesor Josep
Maria Guilemany Casadamon y el
Profesor Javier Fernández González

Barcelona, Junio 2007

CAPÍTULO 3:

Procedimiento experimental

3.1 Equipos de proyección térmica

3.1.1 Proyección térmica por plasma atmosférico (APS).

El equipo utilizado para la proyección térmica de plasma atmosférico es un modelo A-3000 S de PLASMA TECHNIK. El equipo se compone de una consola de control, una fuente de alimentación, un sistema de dosificación de gases, una tolva volumétrica para la alimentación del polvo, un sistema de refrigeración por agua y una pistola de proyección. La pistola de proyección es un modelo PLASMA TECHNIK F4-MB con dos inyectores de polvo, tal y como se puede observar en la Figura 3-3-1. La pistola está provista de un cátodo cilíndrico de cobre con la punta de

ThO₂ y un ánodo circular refrigerado por agua. Los gases son alimentados de forma axial entre los electrodos y, cuando pasan entre ellos, se disocian por la formación de un arco eléctrico entre ellos, dando lugar al plasma.

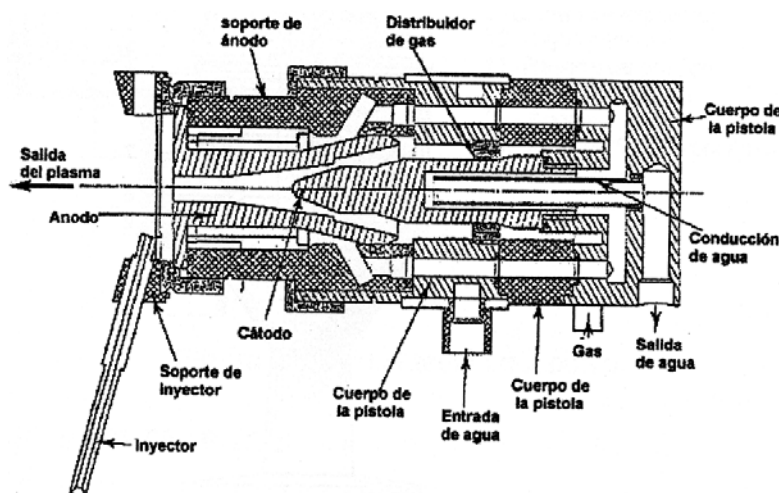


Figura 3-3-1: Pistola de plasma F4-MB

El polvo de proyección se inyecta a la salida de la de la pistola de forma perpendicular y el equipo puede operar con dos polvos a la vez. El equipo puede desarrollar una potencia máxima de 55 KW y voltajes de 70-80 V.

3.1.2 Proyección térmica por alta velocidad (HVOF).

Para la obtención de recubrimientos por HVOF se ha utilizado un sistema de proyección por alta velocidad Diamond Jet Hybrid de SULZER METCO (Figura 3-3-2). Se trata de un equipo de tercera generación que trabaja con oxígeno como comburente y propileno (DJ2700) o hidrógeno (DJH-2600) como combustible. Utiliza también aire comprimido para aumentar la presión dentro de la cámara de combustión y proteger sus paredes de las elevadas temperaturas generadas en ella. Como gas portador del polvo desde la tolva a la pistola se utiliza nitrógeno.

Este equipo puede llegar a obtener temperaturas de llama de 2860 °C y velocidades de gas de 1370 m·s⁻¹ y los consumos aproximados de los gases son para el caso del nitrógeno: 900 l·h⁻¹ a 11,6 bar, 16000 l·h⁻¹ a 10,3 bar para el oxígeno, 4400 l·h⁻¹ a 6,9 bar para el propileno, 38100 l·h⁻¹ SLPM hasta 20 bar para el hidrógeno y 18000 l·h⁻¹ a 6 bar de aire comprimido.

La pistola dispone de un único inyector de polvo y un circuito de refrigeración por agua para la zona del cañón (barrel) y la cámara de combustión. La cámara de combustión está situada en la conjunción de salida de los gases y el polvo de proyección siendo el lugar donde se produce la deflagración y expansión de los gases. La entrada de los gases se realiza separadamente dentro de la pistola, mezclándose justo antes de la cámara de combustión. El cañón está dispuesto a modo de doble cono para proporcionar mayor velocidad y homogeneidad en el intercambio energético de las partículas.

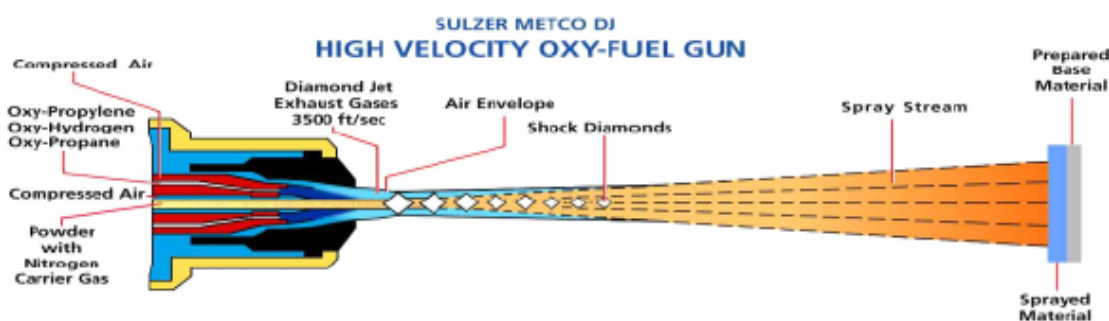


Figura 3-3-2 Esquema de la pistola de HVOF DJH de Sulzer Metco.

El polvo se alimenta en la pistola a través de un conducto que proviene de la tolva. La función de la tolva es almacenar e introducir el polvo dentro de la pistola a través de un flujo de gas a una presión superior a la de la cámara de combustión. La tolva dispone de un microprocesador para poder programar la alimentación deseada, para poder fijar los rangos de alimentación determinados, para guardar en memoria unas condiciones de alimentación para un polvo determinado, etc. Según el fabricante se

pueden alcanzar alimentaciones del orden de $150 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. Todo el equipo se controla a través de una consola a través de la cual se pueden regular las presiones y flujos de los gases de entrada a la pistola, se enciende / apaga la pistola y la alimentación, se ajustan las secuencias de encendido y apagado, etc.

Para reducir el ruido provocado por el proceso de proyección se dispone de una cabina insonorizada, capaz de amortiguar el sonido por debajo de 80 db con un sistema de extracción de aire con una capacidad de $8000 \text{ m}^3/\text{h}$. Por último, para poder aplicar sucesivas capas de material sobre el substrato, se dispone de un brazo robótico ABB de 6 ejes de movimiento, totalmente programable. Las pistolas de proyección se montan sobre este brazo robótico y se programa para que realice un movimiento determinado aplicando las pasadas que sean necesarias para conseguir el espesor de capa deseado.

3.2 Materias primas empleadas en la proyección.

Las materias primas seleccionadas para la realización de esta tesis tienen la necesidad de ser biocompatibles. La biocompatibilidad es el rasgo fundamental de cualquier material que se implante en un organismo y se puede interpretar como la aceptabilidad biológica de la interacción entre el material y los tejidos circundantes. Asimismo, los biomateriales deben poseer unas propiedades mecánicas y químicas específicas según sea su función una vez implantado, una buena resistencia a la corrosión, han de ser baratos, reproducibles y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala y fundamentalmente no ser tóxicos ni cancerígenos

3.2.1 Polvos de proyección utilizados.

Para la obtención de los recubrimientos biocompatibles se han empleado diferentes polvos comerciales para proyección térmica

a) Hidroxiapatita.

La hidroxiapatita es un material bioactivo, osteoconductor, no reabsorbible que provoca interacción e intercambio químico entre el implante y el tejido vivo, dando lugar a una perfecta osteointegración. El polvo utilizado para la obtención de recubrimientos de HA fue CAPITAL 30 de Plasma Biotal Limited (Tideswell, UK).

b) Titania convencional

El titanio es ampliamente utilizado como material en la sustitución de tejido duro. Su biocompatibilidad se cree que es debida a la formación de una capa de óxido de titanio (titania) que crece sobre él de manera natural y espontáneamente, en contacto con el aire y otros medios. La baja solubilidad de los óxidos de titanio hidratados, junto con la aún menor tendencia a formar compuestos de titanio cargados y la capacidad de formar capas de calcio-carbonato-fosfato, a través de procesos específicos de intercambio químico, con los constituyentes de los fluidos corporales (sangre, fluido intersticial), son aspectos muy relevantes para la biocompatibilidad del óxido de titanio. Por estos motivos se obtuvieron recubrimientos de titania a partir de polvo de titania sinterizado y cuarteado XPT-DH-1102 de Sulzer Metco (Wohlen, Suiza).

c) Alúmina

Las primeras cerámicas utilizadas en aplicaciones médicas fueron la alúmina y la circonita. Estas dos cerámicas presentan una cinética de reacción muy lenta, tanto que se las puede considerar como cerámicas “casi inertes”. La alúmina ha sido utilizada como un pigmento de la porcelana dental desde hace aproximadamente 60 años y como un material de restauración de cerámica durante 25 años. En usos ortopédicos en la cadera y rodilla también se ha demostrado su excelente biocompatibilidad. El polvo de alúmina para obtener los recubrimientos fue Amdry 6062 de Sulzer Metco (Wohlen, Suiza).

d) Zircona estabilizada con itria

La circona es una cerámica que, gracias a sus buenas propiedades mecánicas y a su biocompatibilidad, ha sido empleada en los últimos años para aplicaciones ortopédicas como por ejemplo en prótesis de cabezas femorales. Hasta la fecha, más de 600.000 cabezas femorales de circona han sido implantadas en Europa y Estados Unidos. Sin embargo, desde 2001 algunas roturas en servicio de estas prótesis han provocado y una drástica disminución en la utilización de este material para estas aplicaciones e incluso algunos cirujanos incluso evitan su utilización. A pesar de estos problemas en esta tesis se utilizó polvo de $ZrO_2 \cdot 8Y_2O_3$ 203 NS de Sulzer Metco (Wohlen, Suiza) para obtener recubrimientos.

e) Titania nanoestructurada

Las mejoras mecánicas en recubrimientos nanoestructurados obtenidos por proyección térmica se han hecho cada vez más evidentes durante los últimos años. Por este motivo se estudiaron recubrimientos obtenidos por HVOF utilizado polvo de titania nanoestructurada Altair VHP-DCS [5-20 μm] de Altair Nanomaterials Inc (Reno, NV, USA) como alternativa a la hidroxiapatita.

3.2.2 Substrato de proyección.

Como substrato de proyección se utilizó la aleación Ti6Al4V y acero inoxidable 316L. Los estudios previos se han realizado utilizando el acero inoxidable, pero esta memoria se centrará en el empleo de Ti6Al4V como substrato. El análisis químico elemental del substrato utilizado según el fabricante se muestra en la Tabla 3-1, así como las especificaciones de las normas ISO 5832-3 y ASTM F136.

Tabla 3-1: Composición del Ti6Al4V (wt. %) según el fabricante y las normas ASTM F136 e ISO 5832-3.

	Al	V	Fe	C	O	N	H	Ti
Substrato de proyección	5,75-6,35	3,75-4,25	0,15	0,02	0,12	0,012	0,0017	Bal.
ASTM F136	5,50-6,50	3,50-4,50	0,25	0,08	0,13	0,05	0,012	Bal.
ISO 5832-3	5,50-6,75	3,50-4,50	0,30	0,08	0,20	0,05	0,015	Bal.

Se han utilizado cuatro tipos diferentes de probetas como sustrato de proyección en función del ensayo al que han sido sometidos los recubrimientos. Las probetas utilizadas para la caracterización metalográfica y para difracción de rayos X consisten en placas rectangulares con dimensiones 100 x 20 x 5 mm. Las probetas utilizadas para los ensayos de adherencia y de fricción son piezas cilíndricas con un diámetro y una altura de 2.54 cm (1 pulgada) según indica la norma ASTM F1147-99 [1]. En la base de la pieza se ha mecanizado una rosca métrica M16. Para los ensayos in vitro se utilizaron discos de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Por último se utilizaron probetas "ALMEN" para los ensayos de tensiones residuales ALMEN en la proyección térmica de titania nanoestructurada. Estas probetas son rectangulares, con dimensiones 76 x 19 x 0.7 mm, y aseguran una planaridad de flecha inferior a 0.01 pulgadas.

a) Preparación superficial del sustrato

Previamente al proceso de proyección, se realiza un desengrasado por inmersión del sustrato en un baño ultrasónico de acetona durante 5 minutos. Una vez seco se procede al chorreado superficial con corindón (Al_2O_3) grado 24, proyectado con aire comprimido a una presión de entre 5 y 6 bares manteniendo un ángulo de 45-60 ° para obtener una rugosidad superficial (Ra) superior a 4 μm que garantice la máxima adherencia del recubrimiento al sustrato. Se ha evitado chorrear perpendicularmente a la superficie de la probeta puesto que las partículas de corindón pueden quedar

incrustadas de manera irreversible, disminuyendo la adherencia y fomentando la propagación de grietas en la interfase.

3.3 Caracterización estructural de las materias primas y recubrimientos

3.3.1 Caracterización del tamaño de partícula del polvo de proyección.

La distribución granulométrica de los polvos se ha obtenido mediante un equipo de difracción láser Beckman Coulter LS 13320. Cuando la luz ilumina una partícula de un material que tiene una constante dieléctrica diferente del medio que le rodea, ésta será dispersada de forma única. La intensidad de la luz dispersada dependerá del tamaño de la partícula, entre otras. Cuando el tamaño de las partículas es muy superior a la longitud de onda de la luz incidente ($d > 10 \mu\text{m}$), según la teoría de Fraunhofer, el tamaño de partícula depende de la longitud de onda y del ángulo de dispersión con lo que una vez establecida la longitud de onda es fácil para el equipo determinar la dispersión del tamaño de partícula de los materiales en polvo.

Los polvos se dispersan en agua destilada o acetona en un vaso de precipitados y agitando la dispersión se deposita en la cubeta de entrada del aparato hasta que el equipo detecta la cantidad necesaria para realizar la medida. Es importante observar si, al dispersar el polvo en agua, se forman aglomeraciones de partículas, ya que podrían falsear las medidas.

3.3.2 Determinación de la fluidez del polvo de proyección.

Se determina para conocer la capacidad de un polvo de fluir bajo la acción de la gravedad sin ayuda alguna. Los polvos dotados de una buena fluidez, presentan menos problemas en la inyección. Se ha determinado siguiendo la norma ASTM B-213-30 [17] que establece el uso de un embudo metálico Hall para el caso de los materiales con buena fluidez y un embudo Carney para los que presentan una mala

fluidez. Para determinar la fluidez se pesan 50 gramos del polvo y se depositan dentro del embudo, con el orificio obturado. Al dejar el orificio libre, el polvo fluye a través de él. Se cronometra el tiempo que tarda todo el polvo en salir del embudo, siendo el tiempo inicial cuando se abre el orificio.

3.3.3 Densidad del polvo

Se ha determinado tres densidades para el polvo de HA: densidad aparente, densidad vibrada y densidad real. La densidad aparente se mide introduciendo una cantidad conocida de polvo en una probeta graduada de 25 ml y midiendo el volumen que ocupa. Posteriormente, para medir la densidad vibrada se introduce la probeta en un

baño de ultrasonidos durante 15 minutos y una vez vibrado el polvo, se mide el volumen de probeta que ocupa. (ASTM B-527-85). La densidad real se ha medido introduciendo una cantidad conocida de polvo en un matraz aforado de 25 ml y enrasando con un líquido de elevada mojabilidad y densidad conocida, en el caso del presente trabajo ciclohexanona. La densidad se calcula según la ecuación 3-1.

$$\rho = \frac{M_p}{25 - \frac{(M_T - M_p)}{\rho_L}} \quad \text{Ec. 3-1}$$

Donde M_p es la masa de polvo introducida, M_T es la masa conjunta de ciclohexanona y del polvo y ρ_L es la densidad de la ciclohexanona a la temperatura de trabajo.

3.3.4 Caracterización del comportamiento térmico del polvo.

Para comprender los procesos físico-químicos que sufren las partículas en el haz de proyección se llevó a cabo un estudio del comportamiento térmico del polvo de proyección mediante un microscopio de calefacción L-1700 Leica con un

equipamiento Novocontrol Mitronic II y mediante Calorimetría Diferencial de Barrido realizada con un equipo SDT 2960 (TA instruments, New Castle, Delaware, EEUU).

3.3.5 Caracterización estructural mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el estudio estructural del polvo y los recubrimientos se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL 5510 que dispone de un detector JEOL de electrones secundarios que permite trabajar con una resolución horizontal de 4 nanómetros y un detector ROBINSON de electrones retrodifundidos con una resolución horizontal de 2.5 nanómetros. La captura de las imágenes se realiza de forma digital con el programa SEMafore que permite captar las imágenes en pocos segundos y modificar los valores de brillo y contraste al instante. La determinación del espesor de los recubrimientos se realizó mediante análisis de imagen de 20 medidas seleccionadas de forma aleatoria en todo el recubrimiento.

3.3.6 Determinación de la porosidad del recubrimiento

La porosidad de los recubrimientos se midieron mediante el uso del programa informático de análisis de imagen INSPECTOR sobre las micrográficas de la sección transversal de los recubrimientos. Para discernir la porosidad producida por el arranque de material durante la preparación metalográfica de la intrínseca del recubrimiento se realizó una impregnación al vacío de los recubrimientos con una resina epoxi.

3.3.7 Determinación de la composición del polvo de proyección y los recubrimientos mediante microanálisis por separación de energías (EDS).

Para conocer la composición química del polvo, del sustrato y de los recubrimientos se ha realizado microanálisis por separación de energías (EDS) utilizando un detector RÖNTEC acoplado al microscopio electrónico JOEL 5310 para elementos de número atómico mayor a 5 (boro) y con una resolución de 109 eV con respecto a la línea $K\alpha$ del Mn.

3.3.8 Caracterización estructural mediante difracción de rayos x

a) Caracterización cualitativa de las fases presentes en el polvo y de los recubrimientos.

La caracterización cualitativa de las fases cristalinas presentes se ha realizado mediante un equipo SIEMENS D500 con radiación $Cu K\alpha_{1+2}$ ($\alpha_1=1.54060$ y $\alpha_2=1.54443$) a 40 kV y a una corriente de 30 mA. Los resultados se analizan mediante el software EVA que permite identificar las fases presentes con la base de datos JCPDS.

b) Análisis cuantitativo utilizando el método Rietveld de las fases presentes en los recubrimientos.

Se realizó un análisis semicuantitativo de las fases presentes en los recubrimientos mediante difracción de rayos X utilizando el método Rietveld. Una vez obtenidos los recubrimientos, éstos han sido separados del sustrato y posteriormente molturados. A cada recubrimiento molturado se le ha añadido un 35% de fracción en peso de ZnO que se ha utilizado como patrón interno, ya que los picos de difracción no se superponen a los de las posibles fases de fosfato de calcio presentes en el recubrimiento y presenta una absorción similar a éstos. La presencia de un patrón interno permite determinar cuantitativamente el porcentaje de fases cristalinas y semicuantitativamente el de amorfas, considerando el patrón interno una fase cristalina más de la muestra. En este método se efectúa un ajuste global del perfil del

difractograma obtenido en base a los difractogramas de las fases presentes y al fondo calculado. Los valores ajustados de los factores de escala y las densidades de las fases presentes permiten obtener las fracciones en peso de cada fase presente en el recubrimiento [2].

Los difractogramas se realizan en difractómetros de geometría de parafofocalización Bragg-Brentano y por reflexión. Las muestras han de ser homogéneas y los tamaños de partícula han de ser inferiores a 30 μm para evitar la microabsorción.

Las medidas se han efectuado en las siguientes condiciones experimentales:

- Difractómetro de geometría Bragg-Brentano Siemens $\theta/2\theta$ D-500 (radio 215,5 mm)
- Radiación Cu $K\alpha$ $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$
- Ventana de divergencia: 1° , Ventana de recepción: $0,05^\circ$
- Monocromador secundario de grafito
- Barrido de 8 a 80 (2θ). Tamaño de paso $0,03^\circ$ (2θ). Tiempo de medida por paso: 24s.

Antes de la realización del análisis cuantitativo de las fases presentes se realizaron análisis cualitativos de los difractogramas mediante el banco de datos PDF del ICDD y una vez identificadas las estructuras cristalinas se utilizó el banco de datos estructurales ICSD para introducir los parámetros estructurales y los pesos moleculares de cada fase en el programa de ajuste FULLPROF.

3.3.9 Caracterización estructural mediante espectroscopia IR (FTIR).

Mediante espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier se ha constatado la degradación que sufren las partículas de HA durante el proceso de proyección térmica. Para ello, muestras del polvo de partida y de los recubrimientos se han mezclado íntimamente con bromuro de potasio desecado y colocado en un troquel a

elevada presión con el fin de obtener un disco fino y transparente, que fue colocado en el portamuestras de un equipo Bomem MB-120 para realizar los espectros en un rango de trabajo de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.3.10 Determinación de la rugosidad superficial del recubrimiento.

La rugosidad superficial se evalúa con un perfilómetro MITUTOYO SURFTEST 301. La determinación se realiza mediante el deslizamiento horizontal, sobre la superficie, de una punta de diamante. Durante este recorrido, la punta adapta su movimiento vertical al relieve de la superficie, quedando registrado. El desplazamiento horizontal es de 4 milímetros, recogiendo el registro en cinco tramos de 0.8 mm cada uno.

Sobre cada muestra se realizan un total de 20 lecturas, 10 en una dirección y 10 a 90°. Del total de parámetros de rugosidad que se han determinado a partir de este tipo de técnica, se ha recogido el valor medio y la desviación estándar de Ra, definido como la media aritmética de las desviaciones del perfil de rugosidad con respecto a la línea media.

3.3.11 Estudios de inmersión en medios fisiológicos simulados.

Para evaluar la capacidad de los recubrimientos obtenidos para formar una capa de fosfato de calcio sobre su superficie se realizaron estudios de inmersión en medios fisiológicos simulados (SBF). Estos SBF son soluciones salinas con concentraciones similares al plasma humano. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 37°C utilizando el SBF descrito por Kokubo [3], el cual tiene una composición similar al plasma humano como se muestra en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Comparación de la concentración de iones en el plasma sanguíneo humano y en la SBF de Kokubo [22].

Ion	Concentración plasma sanguíneo [mM]	Concentración Kokubo SBF [mM]
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	103,0	148,8
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

Para la preparación del SBF descrito por Kokubo se mezclaron en 500 ml de agua destilada los reactivos mostrados en la Tabla 3-3. Los reactivos se añadieron uno por uno siguiendo el orden que aparece en la Tabla 3-3 y esperando a que se disolvieran completamente antes de añadir el siguiente. La solución obtenida se llevó a un pH de 7,25 a 36,5°C mediante la adición de ácido clorhídrico 1M o trishidroximetilaminometano (CH₂OH)₃CNH₂ y finalmente se le añadió agua destilada hasta completar 1 l. de disolución.

Tabla 3-3: Reactivos y orden de adición para la preparación del SBF de Kokubo [4]

Orden	Reactivo	Cantidad
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.228 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.305 g
6	1M-HCl	40 ml
7	CaCl ₂	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

La evolución de la morfología de la superficie de los recubrimientos se analizó por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB), mientras que la variación de la

concentración iónica del SBF se realizó mediante un espectrómetro de ICP-MS Perkin-Elmer Elan-6000.

3.3.12 Determinación de la adherencia del recubrimiento.

Los ensayos de adherencia se han realizado según la norma ASTM F1147-99 específica para la determinación de la adherencia de recubrimientos de fosfatos de calcio. Para el ensayo se han utilizado probetas cilíndricas recubiertas y contraprobetas granalladas que se han unido mediante una resina epoxi de alta resistencia HTK ultrabond 100 en un dispositivo que garantiza una fuerza perpendicular de 35N y asegura la planoplanaridad de las superficies para garantizar el contacto total. El montaje se ha introducido en una estufa a 180°C durante una hora para que cure la resina epoxi. Una vez pasado este tiempo las probetas se dejan enfriar y se ensayan en una máquina universal de tracción. Los ensayos se han realizado a una velocidad constante de 0.020 mm/s hasta rotura (Figura 3-3).

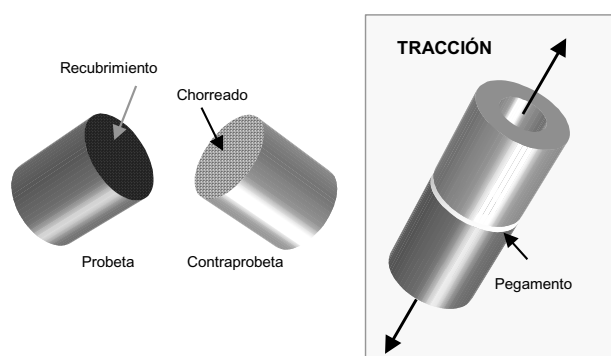


Figura 3-3: Esquema del ensayo de adherencia según la norma ASTM F 1147-99

El estudio posterior de la superficie ensayada mediante análisis de imagen ha permitido determinar si la rotura ha sido adhesiva (rotura en la interfaz recubrimiento-substrato), cohesiva (el recubrimiento rompe entre capas) o por el pegamento (gran adherencia entre el substrato y el recubrimiento, superior a 80 MPa).

3.3.13 Determinación de la resistencia al desgaste por fricción

Los ensayos de resistencia al desgaste se realizaron según el ensayo Ball on Disc (norma ASTM G99-90). El equipo consta de una bola de Al_2O_3 vítrea, que hace de par friccionante, sujeta a un brazo que consta de una célula de carga para medir la carga tangencial (Figura 3-4). La bola de alúmina se situó sobre la superficie del recubrimiento con unas cargas de 5, y 10 N mientras que la muestra se hizo girar a una velocidad de 139 r.p.m que representaba una velocidad lineal de 0.11 m/s. La distancia de ensayo se fijó a 1000 m. Estos ensayos se realizaron con el recubrimiento bajo inmersión en SBF y a 37°C.

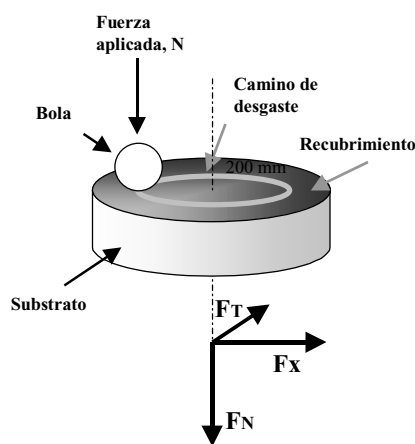


Figura 3-4: Esquema ensayo Ball on Disc ASTM G99-90

Los resultados que se obtienen de estos ensayos son el coeficiente de fricción entre la bola de alúmina y el recubrimiento y la pérdida de volumen del recubrimiento. Las medidas de las pérdidas de volumen han sido evaluadas mediante interferometría óptica de luz blanca ZYGO NEW VIEW 100, usando objetivos de 5 y 40 aumentos. Debido a la baja reflectividad que presentan los cerámicos las muestras han sido previamente recubiertas de oro.

3.3.14 Estudios *in vitro* de la citotoxicidad de los recubrimientos.

Para el estudio de la biocompatibilidad de los recubrimientos, las muestras fueron previamente esterilizadas mediante una irradiación de 25 KGy (2,5 Mrad.) (Aragogamma S.A. Les Franqueses del Vallés). El proceso del cultivo celular se realiza en condiciones estériles, utilizando material esterilizado y una campana de flujo laminar para evitar el riesgo de contaminación.

a) Obtención de las células.

Las osteoblastos se obtuvieron a partir de muestras tejido óseo de pacientes sometidos a artroplastias previo consentimiento informado. El hueso trabecular se separó del cortical y se cortó en explantes de 1-2 mm aproximadamente. Dichos explantes se lavaron en tampón fosfato (PBS) y, a continuación, se depositaron sobre una placa de petri de 10 cm de diámetro tratada para cultivos celulares con 20 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (4,5 g/l de glucosa) suplementado con glutamina (2mM), piruvato (1mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 UI/ml) y con 10% de suero bovino fetal (FBS).

Los explantes óseos, junto con el medio de cultivo, se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ cambiando el medio dos veces por semana. Cuando las células llegaron a la confluencia se subcultivaron en frascos de Roux de 180 cm³ o se congelaron en nitrógeno líquido. Los osteoblastos sembrados en los frascos se cultivaron en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % que se cambió cada 3 días hasta obtener el número de células necesarias para el estudio.

b) Criopreservación.

Las células son capaces de sobrevivir a los procesos de congelación y descongelación. El objetivo de la criopreservación es detener metabólicamente poblaciones celulares con la mínima pérdida de viabilidad celular. La congelación de las células se realizó añadiendo 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) al medio de cultivo con 10% de FBS. El DMSO actúa como crioprotector evitando la formación de cristales de hielo que podrían destruir la integridad de membranas y orgánulos celulares. La velocidad empleada para congelar cultivos ha de ser suficientemente lenta para deshidratar las células y evitar la formación de hielo intracelular, pero suficientemente rápida como para evitar los efectos nocivos de la deshidratación. Una velocidad de congelación de -1°C a -3°C por minuto es satisfactoria. Una vez las muestras están congeladas se guardan en nitrógeno líquido (-192°C).

c) Descongelación de células.

Para una óptima recuperación de los cultivos celulares fue necesario una descongelación rápida (de 60 a 90 segundos a 37°C en un baño de agua) que reduce o evita la formación de los dañinos cristales de hielo durante la rehidratación.

Dado que algunos agentes crioprotectores como el DMSO son tóxicos para las células durante una exposición prolongada, es recomendable eliminarlos tan pronto como sea posible. Una vez las células se descongelaron se añadió rápidamente 10 ml de DMEM para evitar la intoxicación por DMSO. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 10 ml de DMEM. Esta solución se separó en dos frascos de cultivos y se añadió 5 ml más de medio para que los osteoblastos crecieran hasta la confluencia.

d) Tripsinización y recuento celular.

Los osteoblastos son células que se adhieren al material plástico de un frasco o placa donde proliferan hasta llegar a la confluencia. Una vez el cultivo celular ha alcanzado la confluencia se realizó una tripsinización. Esta técnica permite separar las células de su soporte mediante un enzima, la tripsina, que rompe las uniones de las células al soporte, así como las uniones entre las células. Este proceso debe realizarse con cuidado ya que la tripsina también es capaz de destruir las células por digestión total.

Tras la tripsinización se tomó 10 μl de la suspensión celular para realizar el recuento celular en una cámara de Neubauer (cámara de contaje adaptada al microscopio óptico) con el objetivo de 10 aumentos (Figura 3-5).

Esta cámara es un portaobjetos con un depresión central donde se ha gravado un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues, cada zona L corresponde a 1 mm². La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm³, es decir 0.1 μl .

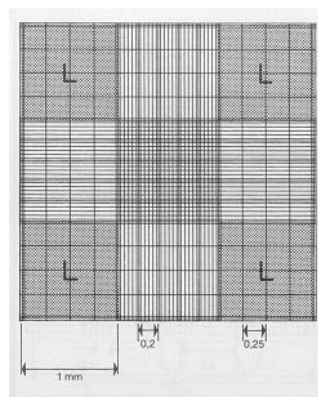


Figura 3-5: Cámara de Neubauer

Se contaron el número de células que se encontraban en cada área L y se determinó la concentración en la suspensión celular mediante la ecuación 3-2, donde x es el número total de células en las 4 regiones L.

$$Células/ml = 10000 \left(\frac{x}{4} \right) \quad \text{Ec. 3-2}$$

e) Morfología celular

El estudio de la morfología celular se llevó a cabo mediante un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) (2020, Electroscan, EE.UU.). Este tipo de microscopía permite observar muestras biológicas reduciendo el daño debido a que permite trabajar con el material hidratado y a bajos potenciales de aceleración de electrones (5-10 keV). Las muestras biológicas se fijaron con una disolución de glutaraldehído (GA) al 2,5% en tampón cacodilato a 4°C durante 2 horas y posteriormente se conservaron en tampón cacodilato a 4°C hasta su observación por microscopía electrónica [5]. Esta fijación permite observar las células muertas preservando sus características estructurales. La fijación con paraformaldehído (PF) que sugieren algunos autores no permitió la observación de las células [6].

f) Determinación de la viabilidad celular.

Las mitocondrias de las células vivas son capaces de reducir el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilo tetrazoli) a formazán en presencia de los cofactores NADH y NADPH como se observa en la Figura 3-6. El formazán presenta un color violáceo que se puede cuantificar a un longitud de onda de 550 nm. Por lo tanto el MTT se puede utilizar como marcador de la viabilidad celular a través de la medida colorimétrica.

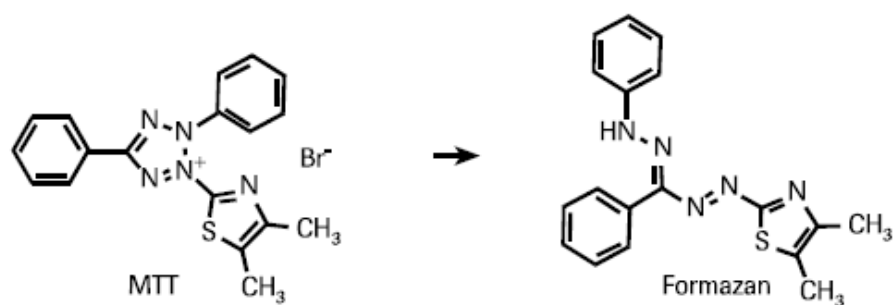


Figura 3-6: Reducción del MTT a formazán por parte de las células viables.

Para realizar este test se utilizó un kit colorimétrico (Cell proliferation kit I (MTT), Roche Diagnostics, Germany). Se sembraron 12.000 células sobre cada material durante y se cultivaron en medio suplementado con 10% de FBS. Al cabo de 3, 7 y 14 días de cultivo se añadieron 50 μ l del reactivo MTT y se incubó durante 4 horas a 37°C para que la reacción tuviera lugar. Posteriormente se añadieron 500 μ l de solubilizador y se dejó a 37°C overnight para disolver los cristales de formazán y se realizó la lectura de la absorbancia con un espectrofotómetro a 550 nm (UV-1700 , Shimadzu, Japón).

g) Cuantificación de la proliferación celular.

La proliferación celular es un parámetro importante en los cultivos celulares *in vitro*, especialmente, cuando el efecto de agentes citotóxicos o sustancias reguladoras del crecimiento está bajo estudio. Los métodos desarrollados para medir la proliferación de células han sido basados en la detección microscópica, incorporación de precursores radiactivos, respuesta de tintes cromogénicos o medición de actividad metabólica de las células que proliferan. Como la proliferación celular se basa en la duplicación del ADN, los métodos basados en la medición de la síntesis de ADN pueden ser utilizados como indicadores del crecimiento celular. El ensayo de proliferación celular que se ha realizado utiliza 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) como marcador alternativo a la timidina que se puede incorporar al nuevo ADN. Se sembraron 12.000 células sobre cada material y se cultivaron en medio de cultivo

durante 3, 7 y 14 días. Antes de la adición de BrdU al cultivo, las células se sincronizaron con medio al 0,1% de BSA. Al cabo de 24 horas se cambió el medio con BSA por medio al 10% de FBS y se añadió BrdU al cultivo. Tras 24 horas se detectó el BrdU incorporado al ADN mediante un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa (Figura 3-7). Seguidamente se lavó el cultivo tres veces con PBS y se añadió la solución substrato para poder realizar la lectura colorimétrica a 450 nm.

Para realizar los ensayos de viabilidad y proliferación se utilizaron materiales sin sembrar como control negativo, y como control positivo se sembraron 3.000 células directamente en pocillos de poliestireno (PS). El motivo de utilizar este control positivo es que en cada pozo con material se sembraron 12.000 cél/pocillo pero tras tripsinizar los materiales después de 1 día de cultivo se observó que solo 3.000 células estaban adheridas sobre el material.

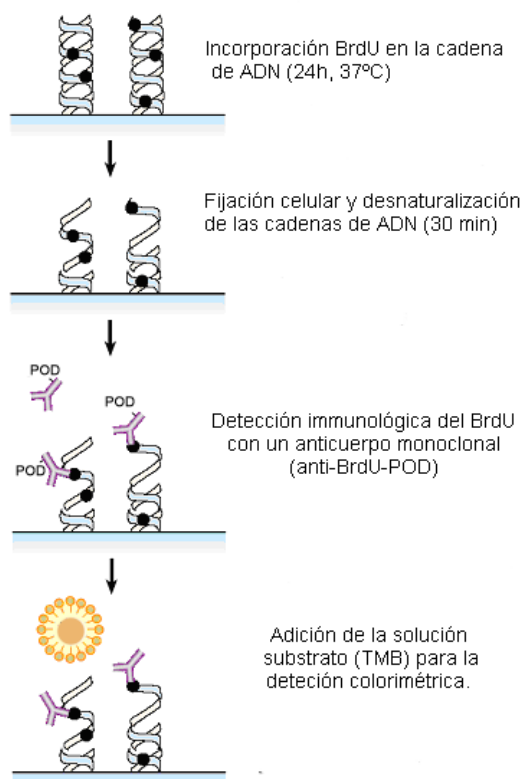


Figura 3-7: Esquema del ensayo de proliferación celular mediante BrdU

h) Diferenciación celular

La diferenciación celular es el proceso en que las células embrionarias o precursores celulares se transforman morfológicamente y fisiológicamente para especializarse durante el desarrollo embrionario o la vida de un organismo pluricelular.

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima que se encuentra en la membrana citoplasmática de los osteoblastos y se produce cuando las células se encuentran activas. De este modo la ALP puede ser utilizada como indicador de formación ósea.

La actividad de ALP se determinó mediante el método basado en la capacidad de la enzima para convertir el sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) en p-nitrofenol como se observa en la Figura 3-8 [7].

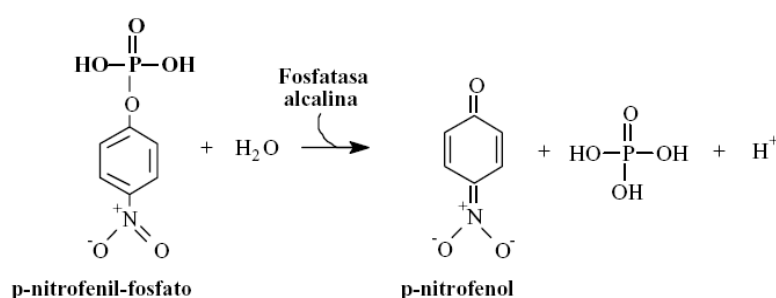


Figura 3-8: Reacción de liberación de fosfato del p-nitrofenil-fosfato por la fosfatasa alcalina

El pNPP es un sustrato cromogénico para la mayor parte de las fosfatasas como la fosfatasa alcalina, el ácido fosfórico, la proteína fosfatasa tirosina y serina/threonina. El producto de la reacción es el p-nitrofenol, un producto amarillo soluble en condiciones alcalinas que puede ser medido a 405 nm con un espectrofotómetro.

Se sembraron 200.000 células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos con DMEM suplementado con un 10% de FBS, con vitamina D 10⁻⁸M (Roche Diagnostics, Germany), vitamina K 10⁻⁸M (Sigma, St. Louis, USA) y 100mg/ml de ácido ascórbico

(Sigma, St. Louis, USA). Como la fosfatasa alcalina se encuentra en la membrana celular se lisaron las células con de 200 µl de detergente Triton 0.1% en tampón tris 0.1M pH=10. La solución substrato se preparó disolviendo 40 mg de p-NPP (Sigma, St. Louis, USA) en 10 ml de agua destilada. Para la elaboración de la recta patrón se prepararon diluciones a $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $12 \cdot 10^{-5}$, $16 \cdot 10^{-5}$, $20 \cdot 10^{-5}$ y $24 \cdot 10^{-5}$ M a partir de una dilución de p-nitrofenol 1:10 en tampón AMP (0,5M 2-amino-2 metil-1 propanol, 2mM MgCl₂) (Sigma, St. Louis, USA).

Para la determinación de la actividad de la ALP se prepararon las soluciones que se muestran en Tabla 3-4. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 min. y se paró con 100 µl de NaOH 3N.

Tabla 3-4: Soluciones preparadas para la determinación de la actividad de ALP

Blancos	Recta patrón	Muestras
50 µl de AMP	50 µl de AMP	50 µl de AMP
50 µl de substrato p-NPP	50 µl de substrato p-NPP	50 µl de substrato p-NPP
100 µl de agua destilada	50 µl de agua destilada	100 µl de muestra.
	50 µl de cada dilución	

Para la lectura de los resultados se empleó un espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda. Los valores obtenidos para las muestras fueron interpolados en la curva patrón con las concentraciones conocidas .

3.4 Referencias

1. ASTM Standard F1147-05. Standard Test Method for Tension Testing of Calcium Phosphate and Metal Coatings.
2. X. Alcobé. Análisis cuantitativo de fases por difracción de rayos X de polvo por el método Rietveld. Aspectos prácticos y ejemplos. Escuela sobre el Método Rietveld. Universidad Jaume I Castelló. (2002)
3. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro. Solution able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990), 721–734
4. <http://www.life.kyutech.ac.jp/~tmiya/SBF-e.html>
5. M. A. Malik, D. A. Puleo, R. Bizios, R. H. Doremus. Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2 h of attachment. *Biomaterials.* 13(2), 1992, 123-128.
6. C. Aparicio, F. J. Gil, J. A. Planell, E. Engel. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 13, (2002), 1105-1111.
7. O. A. Bessey, O. H Lowry, M. J. Brock, A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, (1946), 321-329.

