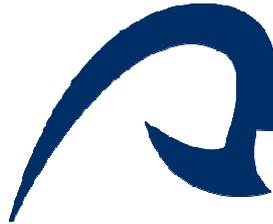


**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Departamento de Ingeniería Mecánica**



TESIS DOCTORAL

***ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO “IN VIVO” DE
UNA PLACA PARA ENSAYOS DINÁMICOS***

Belinda Mentado Almeida

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, 2010

*A mi madre y mi suegro, por su apoyo incondicional.
A mi hermana Eva, por su cariño y comprensión.
A Daniel, mi mejor apoyo y estímulo.
A mis hijos, Adrián y Cloe.*

Agradecimientos

*A mi directora de Tesis, **Julia Claudia Mirza Rosca**, por haberme brindado esta oportunidad, orientándome y aconsejándome en la realización de este trabajo, agradeciéndole la dedicación de su ya muy comprometido tiempo.*

*A **David González**, compañero de trabajo y amigo incondicional, por haberme animado a emprender este camino y ayudarme en los momentos difíciles.*

*A mi jefe y amigo **Donato Monopoli**, al que admiro profesionalmente y debo agradecerle que haya contado conmigo para formar parte de su equipo.*

*A mi amigo **Hernando Afonso**, por su enorme corazón y ser como es, una bella persona, siempre dispuesto a ayudar sea cual sea el obstáculo.*

*A los miembros del **grupo de investigación** perteneciente a **MOTIVA**, profesionales sin los cuáles este trabajo no hubiera salido adelante.*

Así mismo agradezco a todas las personas que no han sido mencionadas pero que de alguna manera han colaborado en el desarrollo de esta Tesis.

PARTE TEÓRICA

Generalidades: Modelo Animal y Fundamentos sobre los Biomateriales y la Biocompatibilidad

CAPÍTULO 1. MODELO ANIMAL	13
CAPÍTULO 2. BIOMATERIALES Y BIOCMPATIBILIDAD	21
CAPÍTULO 3. EL TITANIO COMO BIOMATERIAL	65
CAPÍTULO 4. ELEMENTOS BIOGENÉSICOS O BIOELEMENTOS	89
CAPÍTULO 5. EL ALUMINIO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	95
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	117

Índice Parte Teórica

CAPÍTULO 1. MODELO ANIMAL	11
1.1. MODELOS ANIMALES PARA LA INVESTIGACIÓN.....	13
1.2. ANATOMÍA DEL MIEMBRO POSTERIOR DERECHO E IZQUIERDO.	14
1.2.1. <i>Anatomía de la pierna</i>	14
1.2.2. <i>Músculos de la pierna</i>	14
1.2.3. <i>Vascularización</i>	15
1.2.4. <i>Inervación</i>	17
1.2.5. <i>Tibia</i>	17
1.2.6. <i>Estructura macroscópica del hueso</i>	18
1.2.7. <i>Estructura microscópica</i>	18
1.3. TIPOS DE CICATRIZACIÓN DE LOS IMPLANTES.....	19
1.3.1. <i>Fibrointegración</i>	19
1.3.2. <i>Osteointegración</i>	19
CAPÍTULO 2. BIOMATERIALES Y BIOCMPATIBILIDAD.....	21
2.1. BIOMATERIALES.....	21
2.1.1. <i>Generalidades</i>	21
2.1.2. <i>Conceptos preliminares de los biomateriales</i>	22
2.1.3. <i>Breve historia de los materiales biocompatibles</i>	29
2.1.4. <i>Utilización actual y su futuro previsible</i>	30
2.1.5. <i>Los biomateriales de hoy y de mañana</i>	31
2.1.6. <i>La evolución del campo de los biomateriales</i>	33
2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	36
2.2.1. <i>Comportamiento y condiciones</i>	36
2.2.2. <i>Clasificación de los biomateriales</i>	37
2.2.3. <i>Características de la ciencia y de la ingeniería de biomateriales</i>	38
2.3. MATERIALES IMPLANTABLES.....	41
2.3.1. <i>Elección del material implantable</i>	41
2.3.2. <i>Características de los materiales implantables</i>	41
2.3.3. <i>Deterioro de los materiales implantables</i>	47
2.3.4. <i>Implantes metálicos</i>	48
2.4. RESPUESTA BIOLÓGICA ANTE LOS MATERIALES IMPLANTADOS.	54
CAPÍTULO 3. EL TITANIO COMO BIOMATERIAL.....	67
3.1. GENERALIDADES SOBRE EL TITANIO.....	67
3.2. PROPIEDADES DEL TITANIO.....	68
3.3. ALEACIONES DEL TITANIO.	73
3.4. APLICACIONES DEL TITANIO.	87
3.5. EL PROBLEMA DEL DESGASTE EN LAS ALEACIONES DE TITANIO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.	88
CAPÍTULO 4. ELEMENTOS BIOGENÉSICOS O BIOELEMENTOS.....	91
4.1. GENERALIDADES.	91
4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS BIOGENÉSICOS.....	93

4.3.	OLIGOELEMENTOS, MICRONUTRIENTES O ELEMENTOS TRAZA.	94
CAPÍTULO 5. EL ALUMINIO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS		97
5.1.	INTRODUCCIÓN. BREVE HISTORIA.	97
5.2.	TOXICIDAD.	99
5.3.	EFFECTOS EN EL ORGANISMO DEBIDO A LA EXPOSICIÓN POR ALUMINIO.	104
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA		119

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1.	Músculos de la pierna. Vista interna.	15
Ilustración 2.	Músculo de la pierna. Vista externa.	15
Ilustración 3.	Disección de la tibia y extremo distal del miembro pelviano	16
Ilustración 4.	Las arterias del miembro pelviano. Vista interna.	16
Ilustración 5.	Los nervios del miembro pelviano. Vista lateral.	17
Ilustración 6.	Morfología de la tibia. Vista anterior.....	18
Ilustración 7.	Morfología de la tibia. Vista posterior.....	18
Ilustración 8.	Uso del estimulador eléctrico.....	24
Ilustración 9.	Estimulador eléctrico espinal aplicado en varios niveles del neuroeje.....	25
Ilustración 10.	Componente femoral de una prótesis de rodilla.....	25
Ilustración 11.	Diversos diseños de componentes de cabezas de fémur y componentes de cadera.	27
Ilustración 12.	Polimetilmetacrilato e injerto de dacrón.	30
Ilustración 13.	Tipos de prótesis.	31
Ilustración 14.	Radiografía de una prótesis de cadera fallada por fatiga.	35
Ilustración 15.	Disciplinas que participan en la ciencia e ingeniería de los biomateriales.	39
Ilustración 16.	Acciones involucradas en el desarrollo de un dispositivo compuesto por un biomaterial.....	40
Ilustración 17.	Sección anatómica de una prótesis independiente apoyada por implantes.....	56
Ilustración 18.	Componentes del sistema Brånemark.	58
Ilustración 19.	Estructura del hueso.....	60
Ilustración 20.	Emplazamiento de un implante de tornillo roscado en un hueso trabecular.	60
Ilustración 21.	Dibujo esquemático de la fibrointegración.	62
Ilustración 22.	Dibujo esquemático de la osteointegración.....	62
Ilustración 23.	Microfotografía realizada con SEM de mini implantes retirados del fémur de una rata.	63
Ilustración 24.	Microfotografías de la superficie de Ti Cp que ha recibido diferentes tratamientos.	64
Ilustración 25.	Estructuras cristalinas del titanio. Fase α y fase β	75
Ilustración 26.	Diagrama de equilibrio del titanio con un elemento α -estabilizante.	76
Ilustración 27.	Diagrama de equilibrio del Titanio con un elemento β -estabilizante.	77
Ilustración 28.	Diagrama de equilibrio del Titanio con un elemento β -eutectoide.	77
Ilustración 29.	Diagramas de fases del titanio.....	78
Ilustración 30.	Variación de las propiedades mecánicas del Titanio con la concentración de impurezas.....	82
Ilustración 31.	Microestructura equiaxial del Titanio Cp de Grado dos.	83
Ilustración 32.	Microestructura martensítica del Titanio Cp de Grado dos.....	84
Ilustración 33.	Microestructura Widmanstätten del Titanio cp de Grado dos.	84
Ilustración 34.	Contenido de minerales de un adulto de 70 kg de peso.	91
Ilustración 35.	Elementos traza presentes en los seres humanos.....	92
Ilustración 36.	Composición química de los seres vivos.	93

Ilustración 37. Tabla Periódica de los elementos químicos.	93
Ilustración 38. Curva dosis-dependencia del cinc.....	95
Ilustración 39. Morfología normal de los glóbulos rojos.	105
Ilustración 40. Morfología de los glóbulos rojos “in vivo” sometidos a la acción del aluminio.....	105
Ilustración 41. Captación de Fe por células de la línea eritroleucémica humana K562 en presencia de Al. ...	106
Ilustración 42. Contenido de la corteza cerebral de 9 elementos en pacientes con demencia por diálisis.....	114

Índice de Tablas

Tabla 1. Materiales para cada uno de los componentes, elementos o productos.	23
Tabla 2. Localización de los dispositivos.	24
Tabla 3. Materiales para implantación.	26
Tabla 4. Materiales para implantación.	38
Tabla 5. Reacciones de los implantes.....	44
Tabla 6. Composición química del acero inoxidable 316L.	49
Tabla 7. Características mecánicas para un acero 316L.obtenidas mediante recocido y trabajado en frío	51
Tabla 8. Características químicas de las cuatro aleaciones Cr-Co.	51
Tabla 9. Propiedades mecánicas de las aleaciones Cr-Co.	52
Tabla 10. Propiedades físicoquímicas del Titanio.....	69
Tabla 11. Valores representativos de las propiedades mecánicas del titanio.	71
Tabla 12. Propiedades Físicas del titanio.	74
Tabla 14. Clasificación del titanio c.p según la norma ASTM F67.	80
Tabla 15. Propiedades mecánicas de los grados ASTM del Ti c.p.	81
Tabla 17. Composición del Ti-6Al-7Nb.	86
Tabla 18. Niveles máximos para el agua utilizada en hemodiálisis.	116

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Ley de Hook.	27
$Al + 1/3 Sn + 1/6 Zr + 10 (O + C + 2N) < 9\%$ Ecuación 2	79

CAPÍTULO

1

Modelo Animal

1.1. Modelos animales para la investigación.

La investigación en Implantología se ha fundamentado, en parte en la experimentación en modelos animales. Las especies animales que autoriza el Comité Europeo de Normalización (CEN) para ensayos a largo plazo (más de 12 semanas) y sobre hueso son la rata, la cobaya, el conejo, el perro, la oveja, la cabra, el cerdo y otros animales cuya esperanza de vida sea relativamente larga. Los estudios a escala ósea utilizan preferentemente especies de fácil manejo con semejanzas al comportamiento humano. Las más utilizadas son el perro y el cerdo. Actualmente el cerdo parece ser la especie preferida para la investigación sobre implantes óseos. El minipig tiene a su favor que el tamaño de su cuerpo y también sus órganos son semejantes al de los humanos.

Otro factor importante es el lugar elegido para la colocación de los implantes. La tibia de conejo se ha empleado y es uno de los lugares adecuados, al tener dimensiones semejantes a las del hueso alveolar humano [1].

Para estudios sobre diferencias entre hueso esponjoso y cortical se han utilizado también tibias de oveja a nivel de diáfisis y metáfisis [2].

Se ha comprobado que los modelos mandibular y femoral en animales dan resultados similares [3].

Cualquiera que sea el modelo empleado, además de cumplir las normativas de uso de animales de investigación disponibles en cada país, ha de cumplir una serie de condiciones de uso [4]:

- Deben proporcionarse cuidados y tratamiento adecuados al animal experimental.

- El animal elegido debe ser manejable, anatómico y fisiológicamente.
- Deben existir facilidades para el emplazamiento quirúrgico del implante y para los cuidados necesarios antes y después de la cirugía.
- Las muestras han de ser implantadas en las mismas condiciones, sobre las mismas especies animales de igual edad, sexo y raza, y en los lugares anatómicos correspondientes.
- La eutanasia debe ser indolora y proporcionar la recuperación de la mayor cantidad de datos que sea posible.

1.2. Anatomía del Miembro Posterior Derecho e Izquierdo.

1.2.1. Anatomía de la pierna.

La superficie de la piel de la pierna del cerdo, marcada por delicados surcos que se cruzan al ser raspados, resulta ser muy semejante a la superficie cutánea del hombre a pesar de ser más espesa y con una subestructura correspondiente más elaborada en la superficie rugosa de los labios, morro y pezuñas, según citan *Montagna & Lolitz* en 1964.

El espesor de la piel en las razas mejoradas es de 1 a 2 mm, excepto en machos adultos donde la piel del hombro puede alcanzar de 3 a 4 mm. Según *Sisson* (1986), el tejido adiposo subcutáneo se extiende sobre una mayor parte del cuerpo y muchas veces adquiere un espesor extremo, al que se conoce con el nombre de panículo adiposo.

Montagna & Lolitz declaran que, a pesar de que las razas varían en la profundidad de sus pelos, los suinos poseen un estrato con escasos pelos, siendo estos más largos y gruesos en el dorso y abdomen.

Los pelos son más cortos y próximos entre sí, en áreas donde el grosor de la piel sea mínimo tales como la superficie interdigital, la base de las orejas, cabeza, la cara medial de la tibia y las regiones axilar e inguinal.

De acuerdo con *Getty* [5] las glándulas sebáceas son, en general, pequeñas y mucho menos numerosas que en los otros animales. Sin embargo, las glándulas sudoríparas son grandes y de color amarillo o marrón, siendo visibles en muchos lugares del ojo descubierto.

1.2.2. Músculos de la pierna.

Los músculos que integran la pierna son: el fibular anterior, fibular largo, extensor digital largo, extensor digital lateral, extensor largo del dedo pulgar, extensor digital corto, gastrocnemio, soleo, flexor digital superficial, flexor digital profundo.

Según *Getty* [5] el fibular anterior es un músculo bien desarrollado que está situado en gran parte superficialmente en la cara anterior de la pierna. El tibial anterior es más pequeño que el precedente. Se origina en la cara lateral de tuberosidad y cóndilo lateral de la tibia.

El fibular largo desciende por delante del fibular y del extensor lateral. El extensor digital largo tiene un origen común con el fibular anterior por el que está en gran parte cubierto y con el que se halla unido hasta el tercio distal de la pierna. El extensor digital lateral se halla en la cara lateral de la pierna, por detrás del fibular largo. El extensor largo del dedo pulgar es un pequeño músculo fusiforme que está

cubierto por el extensor largo y el fibular largo. El extensor digital corto es un músculo bien desarrollado que se halla en la cara dorsal de la porción distal del tarso y de los metatarsianos principales.

El gastrocnemio presenta cabezas cortas, pero anchas y gruesas. El sóleo es grueso, ancho y se fusiona con la cabeza lateral de gastrocnemio. El flexor digital superficial tiene un vientre de considerable tamaño.

El flexor digital profundo presenta tres cabezas bien distintas: la primera la más pequeña que constituye el tibial posterior; La Segunda que constituye el flexor digital largo; y la tercera porción o flexor del primer dedo.

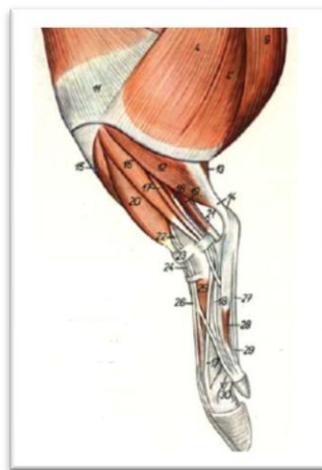


Ilustración 1. Músculos de la pierna. Vista interna.

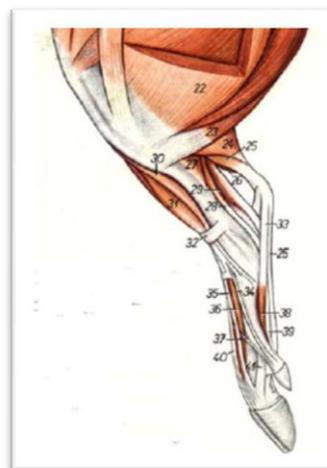


Ilustración 2. Músculo de la pierna. Vista externa.

1.2.3. Vascularización.

La arteria safena es voluminosa, desciende delante de la vena homónima por la cara medial de la pierna y se divide cerca del corvejón en arteria tarsiana lateral y medial.

La arteria tibial posterior es pequeña, estando relacionada distalmente con la safena. Emite ramas a los músculos de la cara posterior de la tibia y proporciona la arteria nutricia tibial.

La arteria tibial anterior continúa dando lugar a la dorsal del pie sobre la cara dorsal del tarso. Emite la arteria tarsiana perforante, que pasa hacia atrás por el canal vascular del tarso y se une con las arterias plantares para formar el arco plantar proximal.

Las venas conservan la denominación de las arterias y caminan paralelas a aquellas y más profundas [5].

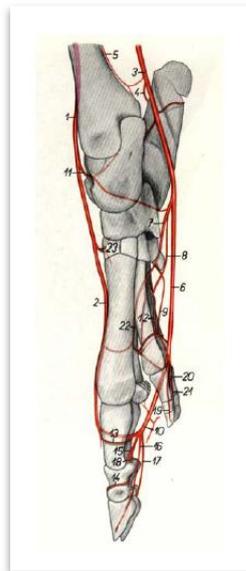


Ilustración 3. Disección de la tibia y extremo distal del miembro pelviano. Vista externa venas, arterias, nervio.

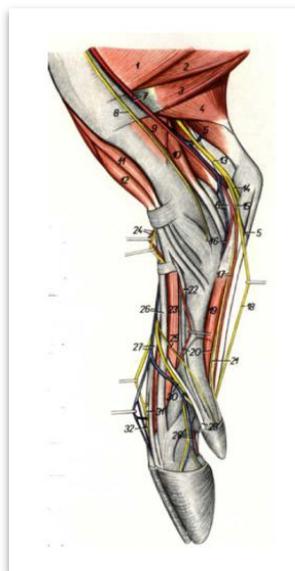


Ilustración 4. Las arterias del miembro pelviano. Vista interna.

1.2.4. Inervación.

El nervio tibial es rama del ciático. Se dirige hacia abajo entre las dos cabezas de los gastrocnemios y acompaña a los vasos tibiales recurrentes hasta el tercio distal de la pierna, donde se divide en los nervios plantares.

En el tercio proximal de la pierna se halla a lo largo del lado medial del flexor superficial, cubierto por la cabeza medial del gastrocnemio; más hacia abajo está cubierto por la fascia común profunda y situado en el espacio existente entre el flexor profundo y el borde medial del tendón calcáneo.

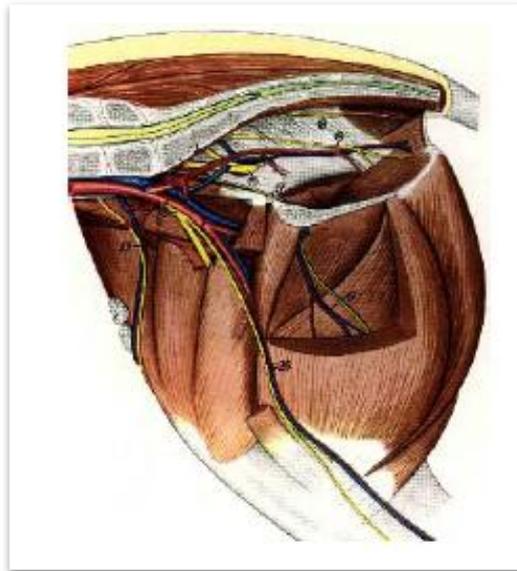


Ilustración 5. Los nervios del miembro pelviano. Vista lateral.

En su origen el nervio tibial emite una rama muscular, cuyas divisiones pasan entre las dos cabezas de los gastrocnemios para inervar a este músculo, el poplíteo, el soleo y los flexores del dedo. Algunos pequeños ramos cutáneos se desprenden también a lo largo del trayecto del nervio [5].

1.2.5. Tibia.

La tibia es un hueso largo que se extiende oblicuamente distal y caudalmente desde la rodilla hasta el corvejón. Se articula proximalmente con el fémur, distalmente con el tarso y lateralmente con la fibula. Posee una diáfisis y dos epífisis.

La diáfisis tibial está ligeramente encorvada y convexa en el centro. La tuberosidad tibial presenta un surco por delante, y otro surco estrecho la separa del cóndilo lateral. La cara lateral se halla en el borde posterior de este cóndilo estando limitada internamente por la eminencia intercondilar. La porción proximal de la cresta es muy prominente y se encorva hacia fuera. Según *Sisson*, la epífisis distal permanece separada y forma el maléolo medial, siendo relativamente más estrecha en sentido transversal y más gruesa antero-posteriormente.

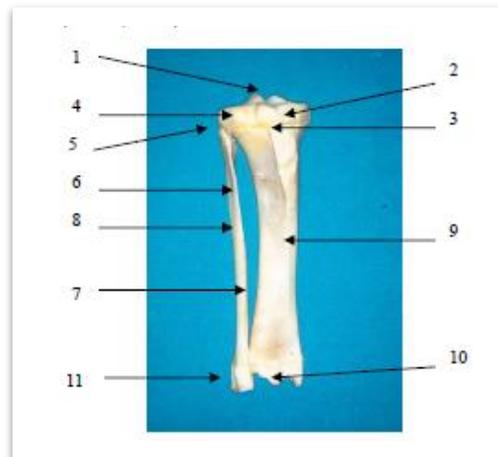


Ilustración 6. Morfología de la tibia. Vista anterior.

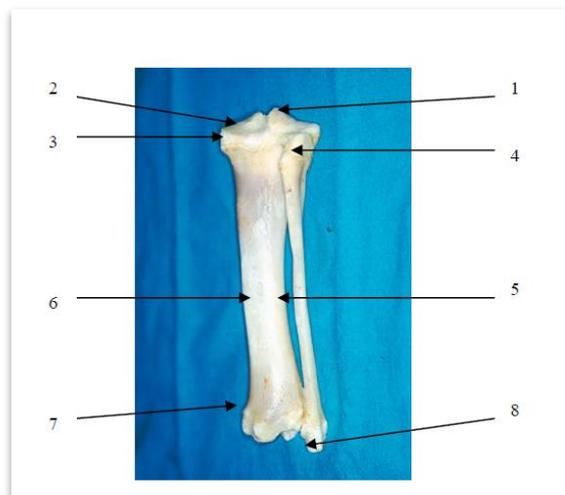


Ilustración 7. Morfología de la tibia. Vista posterior.

1.2.6. Estructura macroscópica del hueso.

Si analizamos la tibia cortada longitudinalmente observamos que los extremos epifisarios están cubiertos por una delgada capa de cartílago hialino (cartílago articular), mientras que el resto de la superficie externa del hueso está recubierta por una membrana fibrosa vascular (periostio). Las epífisis están compuestas por hueso compacto, con una red de trabéculas. La pared de las diáfisis está compuesta de hueso compacto y raramente contiene trabéculas. La cavidad interna (o medular) de las epífisis y la diáfisis está tapizada por el endostio y contiene diversos tipos de médula ósea, dependiendo de la edad del animal y de la región del hueso. Así, en la porción media o diáfisis la pared del cilindro hueco está compuesta por hueso compacto que engloba la cavidad medular. Las epífisis están compuestas fundamentalmente de hueso esponjoso o trabecular.

1.2.7. Estructura microscópica.

El hueso está integrado por tejido conjuntivo-óseo con células y fibras incluidas en una matriz rígida y dura, bien adaptada para las funciones de sostén y protección que realiza.

El hueso es un tejido dinámico que se renueva y remodela a lo largo de la vida de todos los mamíferos, incluido el hombre.

La diáfisis de un hueso largo está formada por hueso compacto, compuesto de matriz ósea depositada en capas o laminillas curvadas con lagunas entre cada capa. Partiendo desde las lagunas se hallan los canalículos ramificados que penetran y se unen entre sí; de este modo, las lagunas y canalículos forman una red extensa de caminos intercomunicados para el transporte de nutrientes.

La osteona, unidad estructural fundamental del hueso compacto, contiene canales osteonales centrales denominados *canales de Harvers* o longitudinales y canales verticales o *canales de Volkmann*. El osteocito es la célula principal del hueso maduro y reside en una laguna rodeada por sustancia intersticial calcificada, que mantiene la integridad estructural del hueso adulto.

El osteoclasto es el segundo tipo de célula del tejido óseo que es responsable de la reabsorción de la matriz orgánica y mineral.

Los osteoblastos son osteocitos jóvenes que están localizados periféricamente en el tejido óseo, teniendo como función principal la síntesis de la matriz ósea.

La mayoría de los huesos están recubiertos por una membrana conjuntiva conocida con el nombre de periostio, que tiene dos capas: una interna vascular y celular ontogénica, que proporciona células para la formación del hueso, y otra externa fibrosa, formada por fibras de colágeno y vasos sanguíneos. El periostio está unido firmemente al hueso por hilos de fibras de colágeno, que se denominan fibras perforantes.

1.3. Tipos de cicatrización de los implantes.

1.3.1. Fibrointegración.

Es la formación de tejido fibroso entre el hueso y el implante. Se produce tras la preparación ósea traumática, necrosis térmica, falta de estabilidad primaria o carga prematura del implante. Su tasa de éxito es del 50 % en 10 años siendo por lo tanto un resultado no deseado en la práctica clínica [6].

Según *Weiss* un número significativo de implantes roscados desarrollarán tejido blando entre el hueso y el implante (fibrointegración), formando un seudoligamento que conducirá al fracaso de éste [7].

Según *Meffert y col* (1992), la formación de tejido conjuntivo (fibrointegración) en la interfase puede ser debida a estas situaciones:

- Migración apical del epitelio en la interfase, seguido por elementos de tejido conjuntivo.
- El implante se coloca con demasiada presión.
- Defectos en la técnica de colocación de implantes.

1.3.2. Osteointegración.

El profesor *Bränemark* fue el primero en describir la osteointegración como la estrecha adaptación que se observaba entre el titanio y el hueso. Esta observación la hizo de forma accidental cuando trabajaba en estudios de microcirculación ósea con microscopía vital sobre tibias de conejo [8] [9].

La microscopia vital utiliza unas cámaras óseas compuestas por tornillos de titanio que se introducen en el hueso. Estas cámaras disponen de unos cilindros huecos por donde crece el hueso [10].

Estos estudios revelaban la íntima conexión circulatoria entre la médula ósea y el hueso cortical. Posteriormente se realizaron estudios en perros, observando una capacidad de unión del titanio al hueso de hasta 100 kg en la mandíbula inferior y de 30 a 50 kg en la superior [8].

Bränemark en 1985 describe la osteointegración como una conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante sin intervención de tejido blando [11].

Según él los requisitos para conseguir una osteointegración son: implante de material biocompatible, un diseño que lo establezca mecánicamente con el hueso, estatus adecuado de lecho implantario, protocolo quirúrgico que reduzca el daño del hueso y fase de curación sin carga [12].

Para generar osteointegración, se debe preparar el hueso de tal manera que se produzca la mínima lesión tisular posible, extrayendo la menor cantidad de hueso y sin cambiar la topografía básica de la región [8].

Con la aparición de nuevos materiales en la fabricación de implantes se modifica el concepto de osteointegración, siendo redefinido por *Zarb* y *Albrektsson* en 1991 como un proceso por el cual se consigue una fijación rígida, asintomática, de materiales aloplásticos y que se mantiene en el hueso durante la carga funcional [13].

La osteointegración implica a nivel de microscopía electrónica un contacto directo entre el hueso vivo y el implante endóseo [14]. Esta definición incluye la Biointegración, que es la adhesión química demostrable del hueso vivo a la superficie de un implante, que es independiente de cualquier unión mecánica e identificable por microscopía electrónica [14] [15].

La biointegración se produce en la interfase del hueso con materiales bioactivos, tales como el fosfato cálcico cerámico y el vidrio bioactivo [14]. La hidroxiapatita genera biointegración y el titanio osteointegración [16].

La premisa original de los sistemas de osteointegración, sean implantes cubiertos o no, se describió con el uso de implantes que eran totalmente endóseos. Los datos más nuevos han venido de *Buser y col.* en 1988 indicando que los implantes de titanio arenado que se colocan por encima de la encía pueden exhibir una anatomía similar a la de los implantes originales de *Bränemark*.

En resumen, la literatura de hoy en día indica que todos los implantes, cubiertos o no, tienen la capacidad de osteointegrarse, si se realiza una técnica quirúrgica correcta. Puede haber, de hecho, diferencias cuantitativas en relación con el grado de osteointegración de cada tipo de superficie en concreto y también la rapidez de la osteointegración puede variar con los diferentes materiales.

CAPÍTULO

2

Biomateriales Y Biocompatibilidad

2.1. Biomateriales.

2.1.1. Generalidades.

Reconstruir partes dañadas del ser humano ya es una realidad. Más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes, siendo raro que en nuestro entorno próximo no conozcamos algún caso de familiar o amigo que los necesite.

Los biomateriales están destinados a su aplicación en seres vivos, y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de muy diversos campos. El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años y una motivación importante para ello ha sido el hecho de que la esperanza de vida aumente de forma considerable.

Según los demógrafos de Naciones Unidas, dentro de unos 5 años es muy probable que haya más personas de más de 60 años que niños de menos de 15. Hoy en día una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco. Y se prevé también que el número de los que tienen unos 80 años se multiplicará por cinco. La longevidad masiva tiene implicaciones individuales relacionadas con mantener la calidad de vida [17].

Estos factores sociológicos han impulsado un gran avance en Biomateriales, y han potenciado la investigación en este campo. Si a esto se le añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede

entender el crecimiento acelerado en la utilización de prótesis, implantes, sistemas y aparatos médicos que deben trabajar en contacto con los tejidos corporales.

Los biomateriales deben cumplir con las condiciones de partida de ser biocompatibles y asegurar una determinada vida media. A su vez, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a que vayan destinados.

Inicialmente, que fue hace relativamente poco tiempo, durante el último tercio del siglo XX, los biomateriales eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo, hoy en día muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo médico.

2.1.2. Conceptos preliminares de los biomateriales.

Es bien sabido que la Ciencia y la Tecnología de los Biomateriales es muy reciente. Tanto es así que todavía no existe una sólida normativa relativa a la evaluación de la biocompatibilidad de los biomateriales, característica que debe cumplir todo biomaterial.

Los biomateriales se distinguen de los demás materiales en que tienen una serie de propiedades químicas, físicas y biológicas, que les permiten mantenerse en un medio extremadamente hostil hacia ellos, como cuerpos extraños al medio en el que son colocados.

La investigación en el área de los biomateriales se inició hace ya muchos siglos puesto que es posible encontrar trazas de prótesis implantadas en momias egipcias. Sin embargo, es a partir de la segunda guerra mundial en el intento de resolver los problemas cotidianos asociados al tratamiento masivo de pacientes, cuando aparece un vasto campo asociado a la Tecnología Médica y en concreto va tomando cuerpo una Ciencia de los Biomateriales [18].

La definición de Biomaterial ha sido muy laboriosa y difícil. Tanto es así que no es hasta marzo de 1986 en una conferencia celebrada en Chester (Reino Unido) y convocada por las diferentes Sociedades Internacionales cuando se empieza a hablar del concepto de biomaterial. Con el fin de encontrar consenso, se buscaron una serie de definiciones comunes, aprobándose, finalmente la de biomaterial como: "Un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos". Esta definición se quedó algo imprecisa en los años posteriores y en la segunda conferencia sobre definiciones en el campo de biomateriales, celebrada también en Chester (Reino Unido) en 1991, se consensó una definición de biomaterial más amplia y ajustada: "Un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo".

En lo que respecta a la búsqueda de biomateriales adecuados, inicialmente se realizó mediante procedimientos puramente empíricos [19] [20] [21] [22].

Esto ha cambiado profundamente y en la actualidad, pueden definirse la ciencia y la ingeniería de los biomateriales como actividades multidisciplinares de investigación y desarrollo que ocupan a un número creciente de personas altamente capacitadas.

Los biomateriales se implantan con el objeto de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones, lo que implica que están expuestos de modo temporal o permanente a fluidos del cuerpo, aunque en realidad pueden estar localizados fuera del propio cuerpo, incluyéndose en esta categoría a la mayor parte de los materiales dentales que tradicionalmente han sido tratados por separado.

Debido a que los biomateriales restauran funciones de tejidos vivos y órganos en el cuerpo, es esencial entender las relaciones existentes entre las propiedades, funciones y estructuras de los materiales biológicos, por lo que son estudiados bajo tres aspectos fundamentales: materiales biológicos, materiales de implante y la interacción existente entre ellos dentro del cuerpo.

Sobre la base de la duración y la forma del contacto que se establece con el organismo, los biomateriales suelen clasificarse como de uso temporario o permanente y de localización intra o extracorpórea.

Desde el punto de vista de su función se pueden distinguir entre ellos los dispositivos destinados al soporte, al diagnóstico o al tratamiento.

Algunos biomateriales contienen drogas y son considerados medicamentos, otros pueden incluir células vivas y construir los llamados biomateriales híbridos.

También hay biomateriales que incluyen compuestos capaces de responder a señales provenientes del medio biológico que reciben el nombre de materiales inteligentes.

Los biomateriales tienen un campo de aplicación muy amplio que se extiende desde dispositivos de uso masivo y cotidiano en centros de salud, como es el caso de jeringas, vendajes, catéteres, bolsas para suero y sangre, y recipientes para residuos, hasta sofisticadas piezas que se emplean para promover la regeneración de tejidos o para reemplazar órganos.

MATERIALES	
ELEMENTO, COMPONENTE O PRODUCTO	MATERIALES
CATÉTERES Y TABULADORAS	PVC, PE, PU, silicona, poliéster, fluoropolímeros (teflón)
BOLSAS SANGUÍNEAS	PVC
FILM PARA EMBALAJES	PE, PVC, nylon, poliestireno (PS)
CONTENEDORES QUIRÚRGICOS	PE, PS, poliéster, acrílico
RECIPIENTES Y BOTELLAS	PE, PVC, PS, poliéster, PP
PARTES DE ANALIZADORES DE LABORATORIO, ASPIRADORES, INSTRUMENTOS ÓPTICOS, ETC	PE, PVC, nylon, etc.
COMPONENTES DE EQUIPOS MÉDICOS ELECTRÓNICOS	Nylon, PP, poliacetales, etc.
COMPONENTE MÁQUINAS PARA CORAZÓN Y PULMÓN.	Polivinilpirrolidona
COMPUESTOS MÉDICOS EN POLVO	Resinas úrea-formaldehído
PARTES DE DISPOSITIVOS ÓPTICOS Y ACÚSTICOS.	Acrílico, policarbonato, epoxi, etc.
EQUIPAMIENTO PARA TRANSPORTE DE ALIMENTOS	PS, PE, PVC, etc.

Tabla 1. Materiales para cada uno de los componentes, elementos o productos.

La biomecánica se encarga de estudiar la mecánica y la dinámica de los tejidos y las relaciones que existen entre ellos; esto es muy importante en el diseño y el injerto de los implantes. Después de realizado un injerto, no se puede hablar del éxito de un implante, éste se debe considerar en términos de la rehabilitación del paciente; por ejemplo, en el implante de cadera se presentan cuatro factores independientes: fractura, uso, infección y desprendimiento del mismo. En la siguiente ilustración se observa el uso del estimulador eléctrico para activar y acelerar el crecimiento del tejido óseo en fracturas, con y sin tornillos de fijación. Todos son biomateriales.

LOCALIZACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS			
LOCALIZACIÓN	DISPOSITIVO	ETIOLOGÍA	MATERIALES
PISO ORBITAL	Piso orbital	Fractura del orbital que conduce a visión doble	Politetrafluoroetileno (PTFE), silicona, polietileno (PE), Ti(malla)
BOCA	Implantes dentales	Traumatismo, enfermedad	Acrílico, epoxi, PE ultra alta densidad, Ti, alúmina
CORAZÓN Y SISTEMA VASCULAR	Marcapasos cardíaco	Arritmia, bloqueo cardíaco	Epoxi, Sil, A.Inox, Ti
	Prótesis valvulares	Enfermedades valvulares	Carbón pirolítico, Ti, PTFE, silicona, tejido reprocesado
	Vasos sanguíneos y "stents"	Traumatismo, enfermedad	PVC, poliéster (dacrón, mylar) Aleac.superelásticas Ni-Ti
	Placas de fijación de fracturas	Traumatismo, enfermedad	Aceros, aleaciones Ti-Al-V, acrílicos, PE ultra densidad, dacrón

Tabla 2. Localización de los dispositivos.

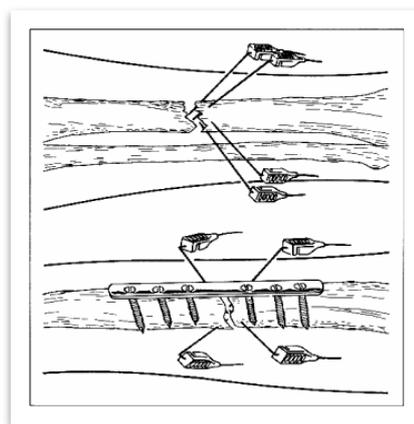


Ilustración 8. Uso del estimulador eléctrico.

A continuación, se muestra cómo el estimulador eléctrico espinal aplicado en varios niveles del neuroeje, puede inducir cambios en diferentes órganos blancos, mediados por vías inducidas por estimulación, reflejos de la raíz dorsal y reflejo víscero-somático.

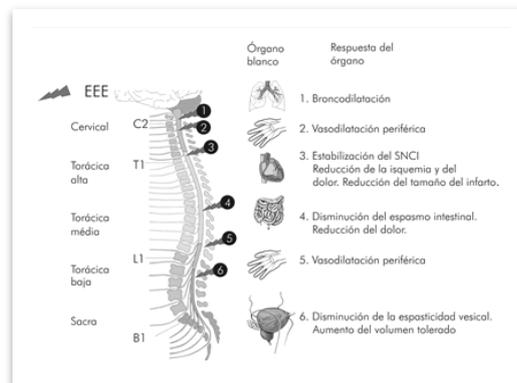


Ilustración 9. Estimulador eléctrico espinal aplicado en varios niveles del neuroeje.

El éxito de un biomaterial o de un implante depende de tres factores principales: propiedades y biocompatibilidad del implante, condiciones de salud del receptor, y habilidad del cirujano que realiza el implante; la física sólo se aplica al primero. Los requisitos que debe cumplir un biomaterial son:

- Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial.
- No ser tóxico, ni carcinógeno.
- Ser químicamente estable, es decir no presentar degradación en el tiempo y ser inerte.
- Tener una resistencia mecánica adecuada.
- Tener un tiempo de fatiga adecuado.
- Tener densidad y peso adecuados.
- Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.
- Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

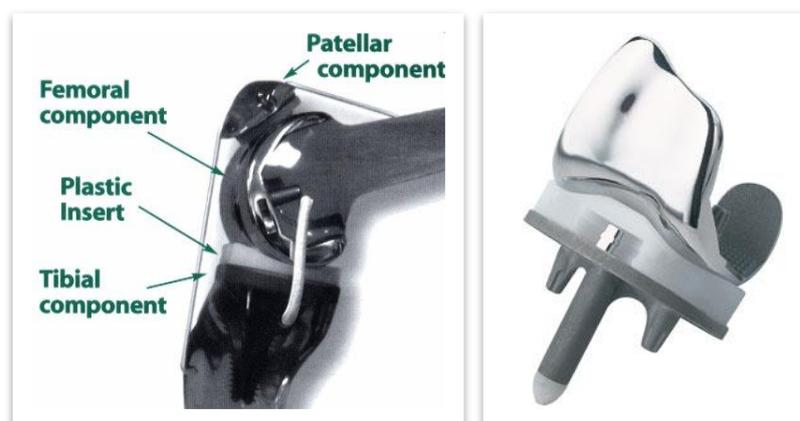


Ilustración 10. Componente femoral de una prótesis de rodilla.

Hay, de hecho, cuatro grupos de materiales sintéticos usados para implantación: metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos de ellos; la siguiente tabla enumera algunas de las ventajas, desventajas y aplicaciones para los cuatro grupos de materiales sintéticos.

MATERIALES PARA IMPLANTACIÓN			
MATERIALES	VENTAJAS	DESVENTAJAS	EJEMPLOS
Polímeros: Silicona, Teflón, Dacrón, Nylon	Elásticos, fáciles de fabricar, baja densidad	Baja resistencia mecánica, degradación con el tiempo	Suturas, arterias, venas, nariz, orejas, mandíbulas, dientes, tendones
Metales: 316, 316 L.S.S, aleaciones de Titanio, aceros de bajo contenido de carbón	Resistencia a esfuerzos de alto impacto, alta resistencia al desgaste	Baja biocompatibilidad, corrosión en medios fisiológicos, alta densidad, pérdida de propiedades mecánicas con tejidos conectivos suaves	Fijación ortopédica: tornillos, clavos, alambres, placas, barras intermedulares, implantes dentales
Cerámicas: Óxidos de aluminio, aluminatos de calcio, óxidos de Titanio, carbonos	Buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inerte, resistencia a la alta corrosión	Fractura ante esfuerzos de alto impacto, difícil fabricación, baja resistencia, inelásticos, alta densidad	Prótesis de cadera, dientes, dispositivos transcutáneos
Compuestos: Cerámica-metal carbón-otro material	Buena compatibilidad, inerte, resistencia a la corrosión, alta resistencia	Carecen de consistencia en la fabricación del material	Válvulas cardiacas, uniones óseas, marcapasos

Tabla 3. Materiales para implantación.

Una alternativa para los implantes artificiales es el trasplante, por ejemplo de riñón o corazón, aunque este esfuerzo se ve obstaculizado por problemas sociales, morales, éticos e inmunológicos; sin embargo, en el caso del riñón, el paciente tiene muchas desventajas con uno artificial: su costo es elevado, no tiene movilidad y, además, el mantenimiento y el cuidado deben ser constantes [23].

Los usos quirúrgicos de los biomateriales son múltiples, por ejemplo, para implantes permanentes:

- a. En el sistema esquelético muscular, para uniones en las extremidades superiores e inferiores (hombros, dedos, rodillas, caderas, etc.) o como miembros artificiales permanentes;
- b. En el sistema cardiovascular, corazón (válvula, pared, marcapasos, corazón entero), arterias y venas;
- c. En el sistema respiratorio, en laringe, tráquea y bronquios, diafragma, pulmones y caja torácica;
- d. En sistema digestivo: esófago, conductos biliares e hígado;
- e. En sistema genitourinario, en riñones, uréter, uretra, vejiga;
- f. En sistema nervioso, en marcapasos;
- g. En los sentidos: lentes y prótesis de córneas, oídos y marcapasos caróticos;
- h. Otras aplicaciones se encuentran por ejemplo en hernias, tendones y adhesión visceral;
- i. Implantes cosméticos maxilofaciales (nariz, oreja, maxilar, mandíbula, dientes), pechos, testículos y penes, entre otros.

La caracterización física de las propiedades requeridas de un material para aplicaciones médicas, varía de acuerdo con la aplicación particular. Debemos considerar que las pruebas fisicoquímicas de los materiales para implante in vivo son difíciles, si no imposibles. Las pruebas in vitro deben ser realizadas antes del implante.

La fabricación y el uso de los materiales dependen de sus propiedades mecánicas, tales como resistencia, dureza y ductibilidad, entre otras. Las propiedades elásticas y viscoelásticas serán caracterizadas antes que las estáticas y dinámicas [24] [25] [26] [27].



Ilustración 11. Diversos diseños de componentes de cabezas de fémur y componentes de cadera.

La naturaleza (iónico, covalente y metálico), y la fuerza de los enlaces atómicos determinan qué tan estable es el material cuando se le aplica una carga, es decir, cuando se le somete a un esfuerzo de tipo mecánico; este tipo de propiedades son conocidas como mecánicas.

Cuando se determina la estabilidad del material en función de cambios en la temperatura, se habla de propiedades térmicas.

Cuando estiramos un material, son las fuerzas entre los enlaces moleculares (fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos que los componen) las que determinan el comportamiento del material. Inicialmente, la mayor parte de los materiales cumplen con la Ley de Hooke, es decir, la fuerza que se aplica para estirarlo (o comprimirlos) es proporcional a la distancia de deformación. La constante de proporcionalidad se llama constante elástica, y está relacionada indirectamente con la energía del enlace. Dicha ecuación se muestra a continuación:

Ecuación 1. Ley de Hooke.

donde,

σ , representa el esfuerzo, que es la fuerza por unidad de área de sección transversal,

y , es la deformación o estiramiento del material, dada por el cambio en la longitud respecto a la longitud original (l/l_0),

E , se conoce como módulo elástico o Módulo de Young el cual es una característica del material.

Cuando un material es sometido a deformación por estiramiento, es posible determinar dos regiones bien marcadas en el comportamiento que presenta: la elástica, donde la deformación es proporcional al esfuerzo aplicado: el material regresa a su forma original cuando la fuerza que actúa sobre él se

elimina; y la plástica, en la que no existe proporcionalidad entre la fuerza aplicada y el estiramiento, en este caso el material no regresa a su forma original al anularse la fuerza que actúa sobre él.

Generalmente, los materiales sometidos a fuerzas pequeñas siguen un comportamiento de tipo elástico, pero a medida que la fuerza crece, el comportamiento pasa a ser del tipo plástico, y si la fuerza sigue creciendo, puede ocurrir la fractura del material [28].

En los materiales cerámicos y en los vítreos es fácil que ocurra la fractura, además es impredecible el momento en que esto puede suceder, por lo que, aunque presentan un alto grado de biocompatibilidad, no son muy usados en implantes.

La resistencia al impacto es la cantidad que puede absorber un material de energía debida a la fuerza ejercida sobre él por un golpe, es decir, por una fuerza grande en magnitud aplicada durante un tiempo muy corto. Ésta es otra de las pruebas que tiene que pasar un material que se requiere para implantación, los requisitos sobre la medida dependerán del uso que se le dé.

La dureza es una medida de la deformación plástica, y se define como la fuerza por unidad de área de penetración o indentación en el material.

Para determinarla de manera experimental, es claro que el método dependerá del tipo de material de que se trate; en el caso de metales, por ejemplo, se incrusta una punta de diamante en forma de pirámide en la superficie del material, con una fuerza conocida, y se mide la penetración que alcanza.

Si se trata de un polietileno, se utiliza una esfera de acero inoxidable sobre la superficie, midiéndose la penetración que alcanza para una carga dada.

Otra propiedad importante del material es la de termofluencia, es decir, la deformación que sufre con el tiempo al someterse a una carga conocida.

La deformación elástica que sufre inicialmente el material ante una carga dada, es seguida de una termofluencia (algo así como el corrimiento entre las capas atómicas que lo constituyen, similar a lo que sucede con los fluidos), antes de que se presente la fractura.

El desgaste de un material de implantes tiene importancia, en especial si se trata de remplazar uniones. El desgaste del material está estrechamente relacionado con la fricción entre los dos materiales.

Es importante considerar el área real de la superficie que entra en contacto en la unión requerida ya que, en general, es mucho menor de lo que aparenta; ésta puede incrementarse con el peso que se aplica para los materiales dúctiles y para los elásticos.

En las prótesis de uniones entre huesos, el desgaste es muy importante, y resulta del movimiento y recolocación de los materiales usados.

Hay diferentes tipos de desgaste: el corrosivo, debido a la actividad química de alguno de los materiales de la unión; el de fatiga superficial, debido a la formación de pequeñas fracturas que

pueden dar lugar a un rompimiento del material, y el abrasivo, en el cual partículas de una superficie son empujadas hacia la otra en la que se adhieren, debido al movimiento que se tiene.

Cuando hay lubricación entre dos superficies en contacto, la fricción y las propiedades de desgaste cambian drásticamente. En la mayoría de las aplicaciones a implantes existe algún tipo de lubricante.

Como podemos notar, la física está presente en todas las ramas de la medicina: no sólo en la investigación básica, también en la instrumentación, en los implantes, en la clínica, en diagnóstico y en terapia, entre otros.

Vivimos en un mundo en el que la física está presente en todo momento, ya que es la ciencia que explica el comportamiento de la naturaleza.

El cuerpo humano y la tecnología que para él podemos desarrollar no pueden quedar excluidos.

2.1.3. Breve historia de los materiales biocompatibles.

La utilización de biomateriales se inició hace ya muchos siglos, puesto que se han encontrado trazas de prótesis implantadas en momias egipcias. También durante las civilizaciones clásicas de Grecia y Roma (siglo VII a.C. a siglo IV d.c.) se usaron materiales no biológicos, en particular, metales y otros materiales naturales para el tratamiento de heridas y de algunas enfermedades.

No fue hasta el siglo XIX cuando empezaron las primeras aplicaciones de biomateriales en medicina con la introducción de las técnicas quirúrgicas asépticas. A principios de 1900 se empiezan aplicar las primeras placas óseas hechas de metal con la finalidad de separar roturas o fracturas. Durante los siguientes años las aleaciones metálicas constituyen la única forma de biomateriales en uso. Sus aplicaciones se extienden desde reparaciones óseas hasta sistemas de liberación de medicamentos. No es hasta la Segunda Guerra Mundial cuando se produce un rápido avance en la ciencia de los polímeros, principalmente enfocado a las aplicaciones médicas debido al enorme aumento de su demanda producida por la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de guerra.

Este aumento corrió en paralelo con avances en otros terrenos que crearon condiciones favorables para obtener soluciones eficaces. Entre ellas cabe mencionar a la investigación y desarrollo en general de nuevos materiales, es especial de los poliméricos, la disminución del riesgo de infecciones causada por la aparición de los antibióticos eficaces y los adelantos en el conocimiento de los procesos biológicos desencadenados como consecuencia del contacto de la materia viva con el biomaterial.

La observación clínica de que la inclusión de partículas metálicas en los cuerpos de los soldados heridos era bien tolerada, otorgó a los médicos un criterio empírico que justificó el uso de implantes metálicos para corregir daños en el cráneo o para la fijación interna de fracturas. La comprobación de que los pilotos de guerra no sufrieron alteraciones en la funcionalidad del ojo frente a inclusiones oculares de astillas de poli (metilmetacrilato), polímero vítreo empleado en las ventanillas de los aviones, condujo al desarrollo de las lentes intraoculares fabricadas con este material. Estas son consideradas aún hoy en día como uno de los implantes más exitosos. El poli (metilmetacrilato) también se usa con éxito en cirugía ortopédica como cemento para la fijación de prótesis.

Los polímeros no únicamente reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, como la sustitución de los catéteres metálicos por polietileno, sino que abrieron el campo a otras nuevas aplicaciones antes difícilmente asequibles. Así, en 1950 se fabrica el primer corazón artificial, llevado a la práctica a finales de 1960 [29].

Limitándonos sólo al caso de las prótesis de válvulas cardíacas, cuyo uso, como ya se comentó, se inició en 1960, nos encontramos que en los países poco desarrollados se implantan anualmente más de 80000 válvulas, de las que un 80% son mecánicas y el 20% de biomateriales, mientras que en los países más desarrollados de las 200.000 válvulas anuales implantadas, más del 50% son de biomateriales. Y más de 10 millones de personas usan anualmente en el mundo, sistemas controlados de dispensación de medicamentos que dependen fundamentalmente de polímeros.

En la actualidad los polímeros continúan en amplio crecimiento y sus aplicaciones son cada vez mayores dentro del campo de la medicina, mejorando las propiedades de los materiales ya existentes y desarrollando nuevos polímeros para aplicaciones específicas.

2.1.4. Utilización actual y su futuro previsible.

Los biomateriales son materiales farmacológicamente inertes, utilizados para ser incorporados o implantados dentro de un sistema vivo para reemplazar o restaurar alguna función, permaneciendo en contacto permanente o intermitente con fluidos corporales.



Ilustración 12. Polimetilmetacrilato e injerto de dacrón.

El uso de la madera, plata y el oro o el del vidrio para mejorar la visión se remonta en algunos casos a hace más de dos milenios. Sin embargo, la eclosión tuvo lugar cuando a finales del siglo XIX, cuando se descubrieron los polímeros sintéticos como el PMMA¹ usado por los dentistas desde 1930, el acetato de celulosa utilizado en los tubos de diálisis desde 1940, el dacrón para injertos vasculares o el polieteruretano empleado en los cinturones femeninos, útil como material cardíaco.

Es inmediato, que debido a la finalidad de su utilización los principales problemas de los biomateriales guardan relación con su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y adaptabilidad.

Los progresos actuales en la ciencia de los materiales están posibilitando la mejora de las utilizaciones clásicas de los biomateriales, así como el diseño de nuevas y prometedoras aplicaciones.

¹ PMMA: polimetilmetacrilato.

En general, se podrían señalar tres situaciones diferentes: el pasado, con el énfasis en la eliminación de tejidos; el presente, con el objetivo principal de la sustitución de tejidos; y el futuro, con el fascinante tema de la regeneración de tejidos. Actualmente se están investigando diversas aplicaciones con variaciones de esa idea, incluyendo stents y otros pequeños dispositivos.

Otra variante es la de los materiales que son líquidos usualmente pero se endurecen con un cambio de temperatura o con un estímulo como la luz. Ello permitirá inyectar en un lugar determinado, con una aguja, la sustancia que posteriormente se solidificará facilitando el implante.

Asimismo se están desarrollando geles que responden a diversos estímulos como temperatura, pH o moléculas como glucosa.

En el caso de la diabetes de tipo I se persigue que un gel de este tipo contenga suficiente insulina, que sólo será liberada cuando la concentración plasmática de glucosa rebase un valor límite.

En conclusión, una parte interesante del futuro de la Medicina descansa en el desarrollo de los nuevos biomateriales y en los avances de las nuevas técnicas de la Biología Molecular.

2.1.5. Los biomateriales de hoy y de mañana.

La mayoría de los materiales utilizados actualmente en dispositivos médicos constituyen materias primas (commodities) estándar que se usan no sólo en medicina sino en otras y muy variadas áreas de la producción industrial.

De entre ellas es posible señalar unas veinte formulaciones básicas que se aplican en biomateriales, catorce de ellas son poliméricas, cuatro metálicas y dos cerámicas [30] [31] [32] [33] [34], como se muestra en las siguientes ilustraciones.

Los polímeros son materiales constituidos por grandes moléculas (macromoléculas) formadas por la unión entre sí de moléculas pequeñas llamadas monómeros.

Es habitual designar a un polímero en particular anteponiendo "poli" al nombre del monómero que lo forma, de allí por ejemplo "polietileno", asociación de moléculas de etileno o "policloruro de vinilo", asociación de moléculas de cloruro de vinilo.

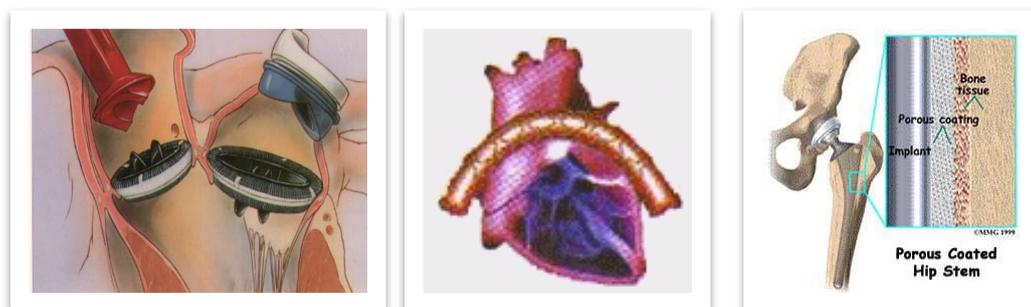


Ilustración 13. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: válvula mitral; "stent" vascular; prótesis metálica de cadera.

La unión de los monómeros puede dar lugar a cadenas lineales, a cadenas ramificadas o a redes. Las distintas formas de asociación de los monómeros participa en la determinación de las propiedades del polímero y, por lo tanto, en su utilidad para diversas aplicaciones.

Los principales polímeros empleados en aplicaciones médicas y farmacológicas son: (el número que sigue a cada uno de ellos representa la participación porcentual de éste en el total de los polímeros que se usan como biomateriales) el polietileno de baja densidad LDPE (acrónimo de Low Density Poly Ethylene) 22%, el policloruro de vinilo (PVC) 20%, el poliestireno (PS) 20%, el polietileno de alta densidad HDPE, (acrónimo de High Density Poly Ethylene) en la que los monómeros de etileno están asociados en forma de cadenas lineales 12%; el polipropileno (PP) 10%, los poliésteres termorrígidos 4%, los poliuretanos (PU) 2%, los acrílicos 2%, el nylon (poliacetato) 2%, epoxis 1% y otros (poliacetales, celulósicos, poliésteres termoplásticos, policarbonatos, polisulfonas, siliconas, resinas urea-formaldehído) en un 5%.

Entre los materiales metálicos se destacan: los aceros inoxidable tipo 316L, las aleaciones de cobalto y cromo, las aleaciones de Titanio, aluminio y vanadio y las aleaciones cobalto, níquel, cromo y molibdeno.

Los cerámicos son materiales inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos unidos principalmente por enlaces iónicos (electrostáticos) y uniones covalentes (electrones compartidos).

Los cerámicos suelen tener gran estabilidad química frente al oxígeno, el agua, los medios ácidos, alcalinos y salinos, y los solventes orgánicos.

Son muy resistentes al desgaste y generalmente se comportan como buenos aislantes térmicos y eléctricos. Todas estas propiedades son ventajosas para su aplicación como biomateriales [35] [36] [37] [38]. Los materiales cerámicos han adquirido recientemente una gran importancia como candidatos para la fabricación de implantes.

Los principales, dentro de esta categoría, son: la alúmina (monocristal de óxido de aluminio), el carbón pirolítico, la hidroxiapatita (fosfato de calcio hidratado) y los vitrocerámicos basados en $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ - $\text{Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ y algunos en MgO y K_2O , (Si = silicio, Ca = calcio, Na = sodio, P = fósforo, Mg = magnesio y K = potasio).

A pesar de que han demostrado ser clínicamente aceptables, ninguno de los materiales mencionados hasta ahora fue originalmente diseñado para ser aplicado en medicina.

Metafóricamente pueden ser considerados como "dinosaurios" condenados a su extinción y progresivo reemplazo por nuevos y más eficaces materiales que surgirán de los actuales procedimientos de desarrollo racional en los que se pueda definir y controlar la naturaleza de la respuesta biológica que generarán [39].

Como establece la definición mencionada al comienzo, se intenta de este modo adecuar la interacción del material con el medio biológico con el que estará en contacto.

Tradicionalmente, se consideraba que un material era adecuado para su uso, cuando no producía daño ni reacción adversa del organismo. En esos casos el material era definido como inerte. Sin embargo, con el correr de los años se ha demostrado que todo cuerpo extraño causa alguna reacción biológica.

En el caso de los materiales mencionados hasta ahora, la respuesta biológica es habitualmente inespecífica y lenta. Durante ella se activan en forma simultánea una variedad amplia de procesos, lo que confiere consecuencias impredecibles a sus efectos a largo plazo.

El desarrollo racional de un dispositivo o pieza implantable debe tener en cuenta los requerimientos de la aplicación y adoptar criterios racionales para la selección o diseño y desarrollo de los materiales.

Debe considerar tanto las capacidades del material para adquirir de manera reproducible la forma que debe tener la pieza final, así como su biocompatibilidad y bioestabilidad.

La aplicación de criterios racionales de diseño ha recibido un fuerte impulso con el desarrollo de técnicas, tales como la microscopia de fuerza atómica (AFM)² y la microscopia de efecto túnel (STM)³, dos procedimientos que permiten conocer la topografía y la organización de las moléculas en la superficie de un material con una resolución de nanómetros⁴, lo que hace posible caracterizar la superficie de un material a escala atómica.

Esta información, junto al conocimiento de cuáles son los procesos biológicos que se estimulan como consecuencia de la estructura química y la topografía de cada biomaterial, ha llevado al desarrollo de una nueva generación de biomateriales cuyo diseño se basa en la observación del ordenamiento estructural de su superficie [40].

También, en el reconocimiento en ella de sitios precisos donde tienen lugar las reacciones que definen la respuesta biológica, y en general, del estudio de cómo el ensamble de moléculas en una superficie es capaz de desencadenar y controlar diferentes reacciones en la materia viva.

2.1.6. La evolución del campo de los biomateriales.

Los dispositivos construidos con biomateriales están cobrando creciente importancia y su número aumenta continuamente. La prevención, el diagnóstico y el tratamiento de muchos trastornos de la salud se han hecho posibles merced a la existencia de nuevos materiales y de formulaciones, y dispositivos que participan en ellos.

En la actualidad, en muchos casos, los biomateriales se han convertido en los factores determinantes de la factibilidad y del éxito de una determinada práctica médica, [41] [42] [43] [44] [45].

El uso de materiales para la elaboración de utensilios se asocia a la historia de la humanidad desde tiempos remotos y dio lugar al desarrollo de tecnologías, las que en muchos casos, definieron el avance de las grandes civilizaciones.

² Acrónimo de Atomic Force Microscopy.

³ Acrónimo de Scanning Túnel Microscopy.

⁴ Milésima de millonésima de metro.

El paso inicial del desarrollo de las nuevas disciplinas de la ciencia e ingeniería de materiales sucedió en la década del 50, con el uso de procedimientos empíricos para adaptar materiales convencionales a aplicaciones biomédicas. Esto fue generando respuestas a los desafíos planteados por la necesidad de producir dispositivos biomédicos de alto rendimiento.

El uso de materiales no biológicos en medicina es, sin embargo, muy anterior a la década del 50. Sus primeros antecedentes documentables se remontan al siglo XXX a.C., en el antiguo Egipto. También durante las civilizaciones clásicas de Grecia y Roma (siglo VII a.C. a siglo IV d.C.) se usaron materiales no biológicos, en particular, metales y otros materiales naturales para el tratamiento de heridas y de algunas enfermedades.

Ya en la era moderna, en la Europa del siglo XVI se empleó el oro y la plata para la reparación dental y, más tarde, hilos de hierro para la inmovilización de fracturas óseas.

Los avances tecnológicos de fines del siglo XIX, en particular el desarrollo de la anestesia, de la cirugía en condiciones estériles y de los rayos X, dieron un fuerte impulso a la búsqueda de metales que pudieran ser utilizados en el interior del cuerpo.

Pero a poco tiempo de la aplicación de metales a este fin, aparecieron inconvenientes causados por la corrosión o porque los metales carecían de las propiedades mecánicas necesarias para que el dispositivo cumpliera adecuadamente la función para la que fue diseñado.

Para superar estos inconvenientes se investigaron nuevas aleaciones metálicas, entre las que cabe mencionar las de cromo-cobalto y los aceros inoxidables con 18% de níquel y 8% de cromo (tipo 302).

Hacia 1940 se mejoró la resistencia a la corrosión de los aceros mediante el agregado de 2-4% de molibdeno.

Hacia 1960 se redujo la cantidad de carbono en estos aceros inoxidables a menos del 0,03% (tipo 316L), por lo que se logró una importante mejoría adicional.

Posteriormente, la introducción del Titanio y de sus aleaciones con niobio y tantalio, extendió el campo de aplicación de los metales [46] [47] [48].

La aplicación de biomateriales no metálicos comenzó también tempranamente; durante la Edad Media fueron utilizados en ligaduras destinadas a detener hemorragias y en algunos de los procedimientos quirúrgicos.

Su desarrollo se aceleró a principios de este siglo con el descubrimiento de materiales para fabricar hilos de sutura, capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo.

Sin embargo, la investigación sistemática y planificada de los materiales útiles para la fabricación de prótesis e implantes sólo surge después de la segunda Guerra Mundial como consecuencia del avance del conocimiento en ciencia y tecnología de materiales.

Un factor que impulsó fuertemente el desarrollo de materiales implantables durante este siglo fue el enorme aumento de su demanda producida por la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de guerra.

Este aumento corrió en paralelo con avances en otros terrenos que crearon condiciones favorables para obtener soluciones eficaces.

Entre ellas cabe mencionar a la investigación y desarrollo en general de nuevos materiales, es especial de los poliméricos, la disminución del riesgo de infecciones causada por la aparición de los antibióticos eficaces y los adelantos en el conocimiento de los procesos biológicos desencadenados como consecuencia del contacto de la materia viva con el biomaterial.

La observación clínica de que la inclusión de partículas metálicas en los cuerpos de los soldados heridos era bien tolerada, otorgó a los médicos un criterio empírico que justificó el uso de implantes metálicos para corregir daños en el cráneo o para la fijación interna de fracturas.

La comprobación de que los pilotos de guerra no sufrieron alteraciones en la funcionalidad del ojo frente a inclusiones oculares de astillas de poli(metilmacrilato), polímero vítreo empleado en las ventanillas de los aviones, condujo al desarrollo de las lentes intraoculares fabricadas con este material. Estas son consideradas, aún hoy en día, como uno de los implantes más exitosos. El poli(metilmacrilato) también se usa con éxito en cirugía ortopédica como cemento para la fijación de prótesis.

Durante las décadas del 40 y el 50, la investigación y el desarrollo de los implantes estuvo exclusivamente en manos de cirujanos. Algunos de los implantes concebidos y probados con la dirección de profesionales médicos están todavía en uso (por ejemplo: implante de cadera de *Charnley* [49] [50] [51] [52] [53] [54], el cemento acrílico y las fibras de *Blakemore* para injertos vasculares [55] [56]).



Ilustración 14. Radiografía de una prótesis de cadera fallada por fatiga.

Durante la década del 60 se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante, e hizo su aparición el término biocompatibilidad para definir el grado de tolerancia del material por parte de la materia viva.

La determinación de la biocompatibilidad para cada aplicación específica y para cada sistema formado por material y el medio biológico con el que estará en contacto, requiere la realización de una serie de ensayos de acuerdo con protocolos preestablecidos y del posterior análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A finales de los años 60, los ingenieros ingresaron en los laboratorios de clínica médica, quirúrgica y dental, y sus contribuciones comenzaron a aparecer en la literatura biomédica.

El primer simposio de Biomateriales que se celebró en la Universidad de Clemson (del estado de Carolina del Sur en los EE.UU.), en 1969, marca el punto de partida de la necesaria integración de las disciplinas complementarias a la ingeniería y a la medicina para el desarrollo de materiales biomédicos.

La influencia del ingreso de la ingeniería al campo de los biomateriales se evidenció en la aplicación de técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los materiales, a los efectos de correlacionarlos con las respuestas biológicas observadas. También, con la incorporación de los materiales cerámicos para el reemplazo de partes óseas y con el desarrollo de materiales compuestos.

La comunidad científica que desarrollaba tareas en este campo se agrupó en diversas sociedades, tales como la Sociedad de Biomateriales (EE.UU) fundada en 1974 y la Sociedad Europea de Biomateriales.

En 1978 se efectuó el primer Congreso Internacional sobre Biomateriales. Desde entonces se produjo un crecimiento notable en el número de trabajos presentados y en el número y nivel de los recursos humanos formados en el área.

2.2. Características generales.

2.2.1. Comportamiento y condiciones.

Un biomaterial ha de tener la capacidad de llevar a cabo sus prestaciones con una respuesta adecuada del huésped en una situación específica. No todo material es susceptible de ser usado en la curación de enfermedades y deficiencias de los pacientes. El implante artificial ha de ser aceptado por parte de los tejidos que lo rodean y del cuerpo en general. Por lo tanto el material usado ha de ser biocompatible, no debe producir irritación de las estructuras cercanas, infecciones, alergias...

Si no seleccionamos el material adecuadamente al problema presentado por el enfermo se puede producir lo comúnmente llamado rechazo. El sistema inmunológico puede atacar el "agente extraño", es decir el material implantado, y producir una respuesta adversa. Existen dos tipos de respuestas ocasionadas por el rechazo del material implantado. La primera es llamada respuesta local, ya que se produce en las inmediaciones del implante, ocasionando una inflamación de los tejidos adyacentes que se manifiesta con hematomas y fuertes dolores. La otra respuesta es la llamada remota, ya que repercute en otro órgano del cuerpo, ocasionando infecciones.

Entre el organismo receptor y el biomaterial hay una doble acción, uno actúa sobre el otro y viceversa. Al trabajar con biomateriales es necesario conocer los dos aspectos de respuestas entre el implante y el organismo y los efectos que se puedan producir entre los dos. El material da lugar a una respuesta

biológica del organismo receptor, como ya hemos visto, puede haber un rechazo del mismo. Pero el cuerpo también puede actuar adversamente al material implantado. Un claro ejemplo es la posible degradación del material a causa de la corrosión, el material pierde sus propiedades mecánicas y su funcionamiento no es óptimo.

El medio fisiológico es altamente agresivo, tiene una elevada actividad química. Hay que tener en cuenta las condiciones físicas y químicas del contorno del material. La reacción contraria del cuerpo humano se produce a distintos niveles: físico-químico, molecular y celular. Es muy importante saber o intentar predecir el comportamiento del material dentro del cuerpo, conociendo si es biocompatible y si sufrirá corrosión [57].

Para que el comportamiento entre el implante y el organismo será lo menos vulnerable posible, deben cumplirse una serie de condiciones prioritarias:

- El material no debe incluir componentes solubles en el sistema vivo excepto si es de forma intencionada para conseguir un fin específico (por ejemplo en sistemas de liberación de medicamentos).
El sistema vivo no debe degradar del implante excepto si la degradación es intencionada y diseñada junto con el implante (por ejemplo en suturas absorbibles).
- Las propiedades físicas y mecánicas del polímero, deben ser las más apropiadas para ejercer la función para la que han sido elegidas (por ejemplo un tendón sustituido debe tener un módulo de tensión adecuado, una membrana de diálisis la permeabilidad apropiada, una junta de cadera debe tener un bajo coeficiente de rozamiento). Las propiedades mecánicas deseadas deben mantenerse durante el tiempo de vida esperado para el implante (por ejemplo no tiene que producirse una relajación significativa en un implante elastomérico).
- El material debe ser biocompatible, siendo este concepto extensible al potencial cancerígeno que pueda poseer y a la interacción con el sistema inmunológico del que va a formar parte.
- El implante debe ser esterilizable y libre de bacterias y endotoxinas adheridas a las paredes de las células de las bacterias.

En general la mayor parte de los materiales metálicos, poliméricos... no satisfacen todas estas condiciones, de manera que los materiales utilizados en medicina deben de ser diseñados específicamente para cumplir unas determinadas funciones. Así se puede afirmar que la creación de biomateriales es una labor que hay que realizar entre el médico, científico y el ingeniero.

2.2.2. Clasificación de los biomateriales.

No existe una única clasificación de los biomateriales debido a la gran variedad de aplicaciones dentro de la medicina actualmente. Existe una clasificación propuesta por el organismo A.S.T.M (American Society for Testing Materials) que englobaría los usos, tipos y aplicaciones de cada biomaterial [58]. Esta sociedad es una corporación sin ánimo de lucro fundada en 1898, para el desarrollo y estandarización de las características de los materiales, productos, sistemas y servicios, así como su

conocimiento. La estandarización incluye métodos de ensayo, definiciones, prácticas recomendadas. La clasificación propuesta es la siguiente:

- Aparatos externos: están en contacto con las superficies del cuerpo, por ejemplo electrodos, prótesis externas.
- Aparatos con comunicación exterior: en comunicación con canales naturales internos (catéteres urinarios, aparatos intrauterinos), en comunicación con tejidos y fluidos (contacto corto tiempo, contacto tiempo medio...), en contacto con la sangre.
- Aparatos implantados largo tiempo: en contacto con el hueso, con tejidos y fluidos tisulares, y en contacto con la sangre.

Una clasificación más cercana al ingeniero consiste en ordenar los materiales en los tres grupos principales según su naturaleza: metales, cerámicos, poliméricos y compuestos, como se observa en la siguiente tabla.

Material	Ventajas	Inconvenientes	Ejemplos
Metales: Titanio, A. Inoxidable, oro, plata...	Resistencia a esfuerzos de alto impacto, alta resistencia al desgaste.	Baja biocompatibilidad, corrosión en medios fisiológicos, alta densidad, pérdida de propiedades mecánicas con tejidos conectivos suaves.	Fijación ortopédica: Tornillos, clavos, alambres, placas, barras intermedulares, implantes dentales.
Cerámicos: Óxidos de aluminio, aluminatos de calcio, óxidos de Titanio, carbonos.	Baja biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, inerte, resistencia a la alta corrosión	Fractura ante esfuerzos de alto impacto, difícil fabricación, baja resistencia, inelásticos, alta densidad	Prótesis de cadera, dientes, dispositivos transcutáneos
Polímeros: Nylon, Teflón, Silicón, Dacrón	Elásticos, fáciles de fabricar, baja densidad	Baja resistencia mecánica, degradación con el tiempo	Suturas, arterias, venas, nariz, orejas, mandíbulas, dientes, tendones.
Compuestos: Cerámica-metal, carbón-otro material	Buena compatibilidad, inerte, resistencia a la corrosión, alta resistencia.	Carecen de consistencia en la fabricación del material	Válvulas cardíacas, uniones óseas, marcapasos.

Tabla 4. Materiales para implantación.

2.2.3. Características de la ciencia y de la ingeniería de biomateriales.

La comunidad académica internacional ha reconocido la importancia de las investigaciones de carácter multi e interdisciplinario y ha reclamado acciones para que éstas sean promovidas.

Las investigaciones propias de la ciencia y la ingeniería de biomateriales constituyen un ejemplo de actividades interdisciplinarias, cuyos contenidos no pueden ser encuadrados dentro de los límites curriculares de los estudios universitarios tradicionales.

Téngase en cuenta que la ciencia de los biomateriales estudia los parámetros que definen las interacciones entre un biomaterial con un sistema biológico; mientras que la ingeniería de biomateriales incluye la investigación y desarrollo de materiales con control de calidad, tanto en lo que se refiere a su estructura, como a su superficie realizado a escala de nanómetros (nanotecnologías) [59].

Esta naturaleza multidisciplinaria hace que la ciencia e ingeniería de los biomateriales comparta áreas temáticas pertenecientes a variados sectores del conocimiento.

Las áreas compartidas están esquematizadas en la siguiente figura y pueden agruparse en cuatro grandes campos: las ciencias básicas, las especialidades médicas, las ciencias biomédicas y la ingeniería.

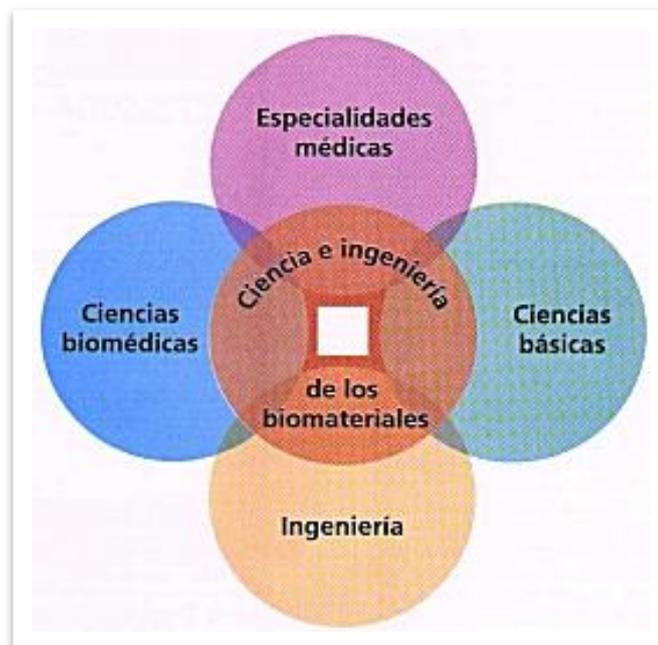


Ilustración 15. Disciplinas que participan en la ciencia e ingeniería de los biomateriales.

Entre las ciencias básicas involucradas, se destacan: la biología celular y molecular, la ciencia de los materiales y la ciencia de las superficies.

Prácticamente todas las especialidades de la medicina hacen uso de los biomateriales. Dentro de las ciencias biomédicas se deben destacar: la cirugía, la fisiología y la anatomía.

En el campo de la ingeniería sobresalen las ingenierías de materiales, la ingeniería mecánica y la ingeniería química.

Puede, por lo tanto, afirmarse que tanto la ciencia como la ingeniería de biomateriales, más que ningún otro campo de la tecnología contemporánea, reúnen a investigadores con diferente formación académica que deben actuar manteniendo una comunicación clara y fluida.

La figura ilustra en su columna izquierda las etapas típicas del proceso de desarrollo de un biomaterial y de la construcción de un dispositivo a partir de él.



Ilustración 16. Las distintas acciones involucradas en el desarrollo de un dispositivo compuesto por un biomaterial y los profesionales que participan.

También, señala en su columna derecha, las interacciones interdisciplinarias que se establecen durante cada etapa del proceso.

Queda así definido, cómo diferentes disciplinas pueden trabajar en conjunto, desde la identificación de la necesidad de un biomaterial hasta el desarrollo, construcción, implantación o remoción de él para su estudio en la etapa de investigación clínica. Los dispositivos biomédicos tienen un alto valor agregado.

El tamaño del mercado para ellos, constituye el principal factor que define el interés de las empresas por producirlos y determina, por lo tanto, su disponibilidad comercial.

Un componente adicional que afecta la disponibilidad de los biomateriales es el riesgo económico asociado a las demandas judiciales de los pacientes afectados por supuestos efectos nocivos de un determinado material.

El uso en ocasiones abusivo de estas demandas ha llevado a que empresas proveedoras retiren biomateriales del mercado.

En consecuencia, la proclamada intención de proteger la salud del paciente que demanda por un daño, puede tener un efecto negativo sobre la salud pública, al comprometer la continuidad de prácticas médicas que requieren de dispositivos confeccionados en base al compuesto retirado del mercado.

Una manera de evitar lo anterior es impedir el creciente distanciamiento que se está produciendo, sobre todo en países con escasa base científico-tecnológica, entre el nivel de conocimiento del médico, que es el responsable del uso de un dispositivo, y del investigador que lo diseña y desarrolla. Las avanzadas tecnologías involucradas en los biomateriales requieren disponer de recursos humanos con alta capacitación, tanto para la etapa de investigación como para la de fabricación y aplicación.

Un paso importante para la formación de recursos humanos en biomateriales en Latinoamérica lo constituye la incorporación de la temática a las carreras de ingeniería en materiales, bioingeniería, ingeniería biomédica, medicina y farmacia, así como también a diversos postgrados, maestrías y doctorados.

2.3. Materiales implantables.

2.3.1. Elección del material implantable.

La elección del material para la concreción física del implante que se haya concedido, es un aspecto del diseño que se puede resolver de forma objetiva, puesto que se pueden expresar de forma cuantitativa. En los años veinte, y gracias a los esfuerzos de investigadores tales como *Prandtl* y *Cottrell*, nace la metalurgia como una ciencia independiente. Contemporáneamente, los años treinta iniciarían la era de los plásticos.

A partir de esta fecha, los cirujanos y diseñadores de implantes, dispondrían de un creciente número de materiales con los que ensayar y diseñar implantes.

Fruto de estos ensayos son prácticamente la totalidad de implantes que en la actualidad son utilizados en la clínica.

Es sólo a partir de los años sesenta cuando se desarrollarían técnicas capaces de evaluar, con bastante aproximación y sin necesidad de largas y costosas implantaciones experimentales "*in vivo*", la biocompatibilidad y deterioro de los, potencialmente, materiales implantables.

Se inician, entonces, numerosas líneas de trabajo a la búsqueda y síntesis de nuevos materiales y, por primera vez, surgen materiales cuya búsqueda ha sido motivada por objetivos exclusivamente médicos.

2.3.2. Características de los materiales implantables.

Existen numerosos intentos, en la literatura biomecánica, para definir los requisitos que han de satisfacer los materiales implantables [60] [61] [62] [63] [64]. Generalmente, estos requisitos pueden ser clasificados en dos grandes grupos:

1. *Los reaccionados con la compatibilidad entre el material y los tejidos con los que se haya en contacto.*
2. *Los vinculados a las propiedades mecánicas del material necesarias para cubrir los objetivos marcados.*

La resistencia de los implantes viene condicionada a que dentro del cuerpo van a tener que aguantar una serie de agresiones mecánicas causadas por el peso del cuerpo del individuo y las fuerzas musculares y otras agresiones químicas por la naturaleza de los líquidos orgánicos.

La influencia de las características y factores, que van a ser descritos seguidamente, en el éxito o rechazo de un implante, es obvia pero no totalmente objetivable con los conocimientos que actualmente se disponen.

Efectivamente, no es posible, o al menos resulta muy difícil, predecir la reacción de un determinado tejido ante un material implantado, lo mismo que es difícil prever la corrosión de este mismo material.

Paralelamente, las condiciones mecánicas a las que se hallan sometidos los implantes, una vez se han ubicado en el organismo, son conocidas con una aproximación somera. Consecuentemente el diseño se transforma más en una actividad rigurosamente científica que en un proceso pseudoartesanal.

La naturaleza y la magnitud de las sollicitaciones actuantes sobre los implantes resultan muy difícil de medir y, sobre todo, es prácticamente imposible generalizar a partir de los escasos datos disponibles, ya que cada caso es un problema, con particularidades propias, que han de estudiarse aisladamente. De ahí que conceptos como el diseño ante la rotura, los coeficientes de seguridad y la elección de materiales, no puedan establecerse sobre la base de conocimientos técnicos fiables.

Afortunadamente, el creciente número de líneas de trabajo que se abren en el campo de la biomecánica del aparato locomotor ofrece, en este sentido, nuevas y optimistas perspectivas de futuro.

En el sentido de un material para la construcción de un implante, es necesario establecer una lista de especificaciones, basada en los objetivos que pretendemos lograr, pero apoyada en los datos experimentales disponibles y en los resultados provenientes de la propia experiencia con otros materiales. Estas especificaciones necesitan ser comparadas con las propiedades que pueden alcanzarse con los materiales implantables más usuales.

Sólo en el caso de que ninguno de estos materiales cubra nuestras necesidades, será recomendable la búsqueda de una alternativa, estando entonces indicado un nuevo material.

En este contexto, pueden definirse dos situaciones básicas. Una, en la que cada una de las especificaciones establecidas sean satisfechas por uno o más materiales conocidos, pero ninguno de ellos cumplen la totalidad, y otra, en la que al menos una de la especificaciones, no se vea cubierta por ninguno de los materiales implantables usualmente utilizados.

La respuesta a la primera solución se encuentra, a menudo, en los materiales compuestos, ya que éstos pueden combinar las propiedades adecuadas de cada uno de los componentes que los integran.

Es, entonces, posible sintetizar un material compuesto AB que presenten las propiedades mecánicas buscadas en el material A y en el material B.

En lo referente a la segunda situación, la solución ha de buscarse ineludiblemente en un nuevo material, con toda la problemática que este hecho comporta.

La biocompatibilidad

El primer requisito que debe evaluarse cuando se trate de enjuiciar si un material determinado puede ser implantable o no, es la biocompatibilidad. La repulsa del organismo a un cuerpo extraño es señal de una incompatibilidad biológica, lo que vulgarmente se conoce con el nombre de rechazo. Si el requisito de la compatibilidad se satisface, pueden comprobarse con sentido el resto de restricciones, puesto que, en caso contrario, es tiempo perdido.

El concepto de compatibilidad hace referencia, tanto al efecto del material en los tejidos biológicos que lo rodean, como al posible deterioro que este material puede experimentar como consecuencia de hallarse implantado en un medio agresivo, como es el biológico.

En lo que concierne al efecto del material en los tejidos que los circunda, la compatibilidad del material implica que los cambios extracelulares e intracelulares de estos tejidos son mínimos.

Por ejemplo, los implantes cerámicos inducen una respuesta química restringida al hecho superficial.

La mayoría de los materiales destinados a la construcción de implantes ortopédicos provocan una reacción de aislamiento en la interfase material – organismo.

Si la reacción produce un lecho de pocas micras de espesor, el material puede ser considerado como biocompatible a escala microestructural.

En esta línea, los materiales pueden ser clasificados de acuerdo al espesor del lecho de reacción, aunque tales clasificaciones han de normalizarse si se desean tengan valor comparativo, ya que se encuentran influidas, entre otros factores, por la configuración geométrica de la probeta que se implanta y por el lugar de implantación.

Las variables intrínsecas, de que depende la compatibilidad de un material, en el sentido que consideramos son: la composición química, las características cristalográficas de las fases presentes y las características microestructurales.

Las variables externas al material y las biológicas, que determinan la compatibilidad son: la concentración y tipo de células que integran los tejidos, la concentración iónica de los fluidos extracelulares, el pH, la concentración de fosfolípidos, mucopolisacáridos y otros constituyentes metabólicos, entre otras.

En lo que atañe a la agresión del material por parte del medio en el que se está inmerso, este ataque puede traducirse en la variación de las propiedades mecánicas, físicas o químicas del material, así

como en su corrosión o degradación, lo que conlleva la liberación el organismo de los productos originados en este deterioro.

Las propiedades mecánicas

Es imposible enumerar cuáles son las propiedades mecánicas y físicas que debe reunir un material destinado a servir como base de un implante, ya que estas propiedades han de adecuarse a la misión mecánica a desempeñar por el implante.

En ocasiones es deseable un material duro y en otras blando, a veces es preferible un material rígido y en otras, es mejor un material de módulo elástico menor.

Las propiedades físicas y químicas dependen del estado de la superficie del material usado.

Las superficies de metales pasivos combinan sus propiedades significativamente mediante la destrucción de la capa de óxido.

Los productos abrasivos y los iones procedentes de la interacción pueden conseguir que en los tejidos se generen por un lado reacciones y por otro debilidad en el material implantado.

En la siguiente tabla, se presentan las reacciones de los implantes:

REACCIONES DE LOS IMPLANTES			
Elemento	Reacción del implante en tejido blando	Reacción del implante en organismos cultivados	Crecimiento del nivel de toxicidad
Mn	-	-	-
V	Tóxico	-	$2 \cdot 10^{-5}$ M
Mo	Separación	No afecta	-
Co	Tóxico	Inhibición	$2 \cdot 10^{-4}$ M
Ni	Tóxico	Inhibición	$1 \cdot 10^{-4}$ M
Fe	Separación	Inhibición	-
Cr	-	-	-
Al	Separación	-	-
Sn	-	-	-
Zr	Inerte	No afecta	-
Ti	Inerte	No afecta	-
Ta	Inerte	No afecta	-
Nb	Inerte	No afecta	-

Tabla 5. Reacciones de los implantes.

En líneas generales, sólo nos es posible enumerar cuáles son las principales características a considerar en un material desde el punto de vista de su comportamiento mecánico. Éstas son:

1. Los módulos elásticos del material, principalmente el módulo de Young (E) y el módulo de rigidez (G).

2. El límite elástico, puesto que en algunas aplicaciones es deseable y en otras evitables el que puedan producirse deformaciones permanentes.
3. La ductilidad junto con un límite elástico bajo es ocasionalmente requerida para la conformación del implante en el acto quirúrgico, de manera que pueda adecuarse su forma a la del elemento biológico sobre el que se actúa. La aplicación de un implante requiere ductilidad, con una elongación que excede del 12%. El tratamiento de las fracturas en los implantes son formados con el contorno del hueso y son cargados duramente durante la inserción, por lo tanto el límite elástico ocasionalmente es excedido
4. La tenacidad o resiliencia⁵ del material es, en términos generales, deseada, puesto que es importante disponer de un implante capaz de absorber energía mecánica.
5. La relajación y fluencia son características, vinculadas principalmente a los materiales plásticos, que explican su deformación cronodependiente para una carga mantenida constante, así como el decremento de la carga requerida para mantener, en el tiempo, una deformación constante.
6. La resistencia a la rotura es un dato importante de diseño y que, obviamente, lo limita y determina en función de las sollicitaciones que actuarán en vida sobre el implante.
7. La resistencia a la fatiga, como la resistencia a la rotura, es un dato de crucial interés, dado que los esfuerzos a los que se ven sometidos los implantes son siempre cíclicos, consecuencia de la naturaleza de la actividad humana. La resistencia a la fatiga es un número alto de ciclos del metal es esencial para la unión de prótesis.
8. Ésto no es, por lo tanto, por el implante del tratamiento de la fractura, el cual es temporalmente soportado y es necesario la observación de la formación de la fractura indicada después de 1 a 10 ciclos. La especial situación anatómica de la fractura y el mal uso del implante por parte del paciente son importantes. En los estudios de la fatiga se simula la carga particular y el diseño de las condiciones para la aplicación de la fractura-crítica.
9. La dureza es otro factor, tenido en cuenta en el diseño, que puede adquirir importancia, sobre todo, en la construcción de tejidos blandos, donde una masa dura es normalmente inaceptable.
10. La resistencia al desgaste adquiere un enorme interés en las reconstrucciones articulares, en donde superficies en contacto sufren, durante un elevadísimo número de ciclos, movimientos de deslizamiento y giro. Mediante el trabajo en frío del Titanio, se ha conseguido una considerable mejora, la cual se manifiesta en su mayor aplicación clínica. El Titanio puro posee las mejores compatibilidades posibles con el tejido, lo cual es certificado desde muchos experimentos en los cuales los implantes de Titanio fueron sustituidos por implantes de acero inoxidable, los cuales provocaron agudas alergias.
11. Compatibilidad biomecánica: la gran resistencia del Titanio lo hace un atractivo material para la aviación. Para los implantes quirúrgicos, su resistencia y el módulo elástico, lo hace en gran medida compatible biomecánicamente. Los implantes en tratamientos de fracturas y los dispositivos protésicos, poseen un volumen restrictivo mediante necesidades anatómicas, además deben soportar altas cargas. Por otro lado, un implante fuerza el hueso, puede reducir y modificar el nivel normal de fuerzas fisiológicas. Así pues, debemos desarrollar implantes

⁵ Magnitud que cuantifica la cantidad de energía que absorbe un material al romperse por un impacto.

menos rígidos. Para el material, ésta es la medida que relaciona la resistencia con el módulo elástico.

12. Resistencia a la corrosión: las fuerzas de formas generadas por el contacto entre las superficie del implante y el entorno, conduce a un aumento de los productos de corrosión, dependiente del diseño y del material usado.
13. Así pues, un buen conocimiento de los mecanismos de corrosión y de las propiedades de pasivación de los metales, son los requisitos para un diseño adecuado de los implantes.
14. La excelente resistencia a la corrosión del Titanio y de las aleaciones a base de Titanio en soluciones fisiológicas de cloruro, está bien documentada, sin embargo se han encontrado compuestos de Titanio en los tejidos adyacentes a implantes de estos materiales. Estos hallazgos sugieren que los metales de las películas pasivas fueron disueltos, generando dichas liberaciones dolores agudos e irritaciones crónicas.

Según Zardiakcas L.D. y Mitchell D.W. las aleaciones de Titanio β , son capaces de suministrar un menor módulo de elasticidad, un aumento de la resistencia a la corrosión y una aceptable biocompatibilidad.

Así, una barra de pequeño diámetro de Ti-15Mo fue templada desde 800° C obteniéndose una fina microestructura de grano beta.

Existen varias técnicas disponibles para medir el fenómeno de la corrosión, tales como la disolución mediante métodos gravimétricos o análisis espectroquímicos de los electrolitos y similares.

Para la resistencia de los biomateriales metálicos, estas técnicas pueden no ser suficientemente sensibles.

Los métodos electroquímicos de polarización catódica y anódica son muy solicitados en los laboratorios, sin embargo puede que no sean adecuados para medidas "en vivo" [48] (tomadas directamente del organismo estudiado), ya que algunas polarizaciones pueden perturbar duramente el sistema, generando un cambio del medio (pH, potencial) y por lo tanto, generar una reacción biológica, la cual provoca una reducción o un aumento del ataque de la corrosión. Hoar y Mears superan algunos de estos problemas usando una técnica híbrida, midiendo el potencial de corrosión "in vivo" y efectuando, a estos potenciales, ensayos de larga duración en soluciones Hank.

Pero aún no es medido directamente, ya que se incluye un proceso de crecimiento controlado de un medio local y no invariable.

Uno, y probablemente el único método para realizar esto, es haciendo una polarización lineal, la cual fue desarrollada y popularizada por Stern y sus asociados.

En esta técnica, la muestra es polarizada a pocos mV de corriente (anódicamente y/o católicamente).

Esta información da una determinada pendiente, la cual, es llamada resistencia a la polarización y está directamente relacionada con la escala de corrosión espontánea.

2.3.3. Deterioro de los materiales implantables.

Con anterioridad hemos definido la compatibilidad biológica como un conjunto de características que confieren a un material la propiedad de no corroerse ni inducir una influencia suficientemente negativa en los tejidos vivos que lo rodean, como para que, por estas causas, sea necesaria una eliminación o pueda provocar el fracaso del implante.

En este punto, vamos a analizar una serie de aspectos ligados a la primera característica descrita, la corrosión.

De forma general, el término corrosión puede ser utilizado para describir el deterioro experimentado por un material sometido a la acción de un medio agresivo.

Consecuentemente, puede afirmarse que todos los materiales conocidos se hallan afectados constantemente por un proceso de corrosión.

Dada la extensión con que podría plantearse el estudio general de la corrosión, se han definido campos específicos de acuerdo con la naturaleza de los materiales que son agredidos y en concordancia con el medio agresor.

Así, se puede hablar de corrosión metálica y corrosión no metálica y de corrosión en medio seco y de corrosión en medio húmedo, entre otras.

Evidentemente, puesto que el ataque sufrido por los implantes, es debido a la acción de los fluidos biológicos, nos interesa analizar la corrosión húmeda.

Cuando un material sólido es introducido en un ambiente líquido, en el que es soluble, las moléculas superficiales del sólido tienden a pasarse al líquido.

Esta tendencia, que puede ser explicada a nivel molecular, como un intento de la materia para alcanzar un nivel mínimo de energía, es susceptible de ser descrita en términos de una tensión de disolución.

Al mismo tiempo, una vez ha comenzado la disolución del sólido en el líquido, tiene lugar un segundo fenómeno, contrario al primero, en virtud del cual se produce una reacción que tiende a impedir el progreso de la disolución y que es medida con una presión osmótica⁶.

Cuando ambas tendencias contrarias se igualan, el sólido deja de corroerse, diciendo entonces que la disolución se ha saturado.

Existen, no obstante, circunstancias en las que nunca llegan a alcanzarse la saturación. Como consecuencia, por ejemplo, de que el fluido sea renovado.

Si el carácter de las moléculas disueltas en el líquido es iónico, éstas se disocian en el seno fluido para dar lugar a iones positivos (cationes) e iones negativos (aniones) que confieren a la disolución la

⁶ Mínima presión necesaria para impedir el paso de las moléculas del disolvente puro hacia una disolución a través de una membrana semipermeable.

capacidad de permitir el paso de la corriente eléctrica, denominándose electrolito de la disolución. Los fluidos biológicos son siempre electrolitos.

Cuando el material que se corroe es metálico, entra en juego un tercer factor que modifica el proceso de corrosión, ya que el metal, por razones de configuración atómica, tiende a pasar al fluido en forma de iones positivos, quedando cargado negativamente.

Consecuencia de este fenómeno, es la actuación de una tercera tendencia, cuyo origen es la fuerza electrostática por la cual el sólido cargado negativamente tiende a atraer los iones positivos en disolución, sumándose este efecto a la disolución osmótica.

El equilibrio en la corrosión se producirá cuando la suma de la presión osmótica y la tensión electrostática iguale a la tensión de disolución.

El valor de la tensión electrostática, que es definida como la diferencia de potencial entre la disolución cargada positivamente y el metal cargado negativamente cuando se llega al equilibrio, se conoce con el nombre de potencial de electrodo.

Con objeto de poder comparar el comportamiento de distintos metales, los potenciales de electrodos de cada uno de ellos pueden ser calculados mediante condiciones normalizadas, tomando como referencia un electrodo de hidrógeno sumergido en una disolución ácida de concentración normal.

De esta forma, puede obtenerse una tabla llamada serie electroquímica de los metales. Desde el punto de vista de la naturaleza de los materiales susceptibles de ser implantados, vamos a dividir el estudio de la corrosión por vías húmeda en corrosión de materiales metálicos y corrosión de materiales no metálicos.

2.3.4. Implantes metálicos.

Los materiales metálicos utilizados en implantes quirúrgicos eran fundamentalmente el oro y la plata hasta el siglo XVIII. Posteriormente empezaron a utilizarse los aceros y ya en este siglo aparecieron los aceros inoxidable y las aleaciones de cromo-cobalto-molibdeno, siendo la década de los años 40 cuando se introdujeron el titanio y sus aleaciones.

Los materiales metálicos implantables tienen una gran importancia dentro del campo de los biomateriales, tanto económica como clínicamente hablando. El mercado americano de implantes y artilugios ortopédicos en el 1991 fue de unos 2098 millones de dólares, de los cuales 1379 millones corresponden a prótesis metálicas de articulaciones (más del 50%).

Clínicamente hablando, los implantes metálicos están presentes en el 40% de intervenciones realizadas [65].

Muchos metales pueden ser tolerados por el cuerpo humano en pequeñas cantidades de (Fe, Cr, Ni, Ti, Co...). Sin embargo no todos los materiales metálicos son aceptados biológicamente por parte de los tejidos que están en contacto con ellos. Por tanto, los estudios de biocompatibilidad son fundamentales para la implantación de un nuevo material.

Los materiales metálicos implantables deben presentar una buena resistencia a la corrosión. Si se produce la oxidación del metal por el ambiente hostil del cuerpo humano, además de que el implante se debilita, se produce una liberación de productos de corrosión a los tejidos circundantes que producen efectos no deseables.

Aunque los metales presentan gran resistencia mecánica y dureza, propiedades necesarias en los reemplazos de unión, son más susceptibles a la degradación electroquímica que las cerámicas o los polímeros.

No obstante, un criterio fundamental para elegir un implante metálico es que la respuesta biológica que provoca sea mínima.

Debido a la combinación de exigencias mecánicas y ambientales, los metales usados en hueso y reconstrucción de uniones han sido limitados a tres clases: aceros inoxidables, aleaciones de cobalto y aleaciones de titanio y, entre otros de menor uso el tantalio y metales nobles como platino y oro.

Cada uno de estos materiales es bien tolerado por el cuerpo debido a la formación de su capa de óxido pasiva. Los principales elementos constituyentes, así como los constituyentes de aleación minoritarios de estos metales, pueden ser usualmente tolerados por el cuerpo en pequeñas cantidades [66].

A continuación, se tratarán brevemente los aceros inoxidables, las aleaciones base cobalto y otros metales con menor uso ya que son parte importante en el campo de los biomateriales. El titanio se describirá con más detalle en un capítulo posterior ya que es el material principal de estudio de este proyecto.

2.3.4.1. Aceros inoxidables.

El acero inoxidable es una aleación de hierro y carbono a la que la adición de otros elementos le confiere la propiedad de ser resistente a la oxidación [20] [26].

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACERO INOXIDABLE	
ELEMENTO	COMPOSICIÓN
Carbono	0.03 máx.
Manganeso	2.00 máx.
Fósforo	0.03 máx.
Azufre	0.03 máx.
Silicio	0.75 máx.
Cromo	17.00-20.00
Níquel	12.00-14.00
Molibdeno	2.00-4.00

Tabla 6. Composición química del acero inoxidable 316L.

Por tanto, con el nombre genérico de aceros inoxidable se conoce una serie de aceros resistentes a una gran variedad de agentes corrosivos. En este tipo de aceros, el contenido de cromo es de al menos un 12%. Este elemento es muy reactivo, produciendo un recubrimiento de una película superficial tan adherente y autorrenovable que resiste a la oxidación aún a temperaturas elevadas.

Existen cuatro tipos de aceros inoxidables dependiendo de su microestructura; los martensíticos, los ferríticos, los austeníticos y los endurecibles por precipitación. Los primeros aceros inoxidables para implantes utilizados fueron los austeníticos y son los que ofrecen mejores resultados para implantes.

Los aceros inoxidables martensíticos se utilizan para la fabricación de material quirúrgico. Por su parte los aceros inoxidables ferríticos, aunque poseen una excelente resistencia a la corrosión bajo tensiones, sus propiedades mecánicas y su capacidad de endurecimiento por trabajo son claramente inferiores a la de los austeníticos, no encontrando así ninguna aplicación en el sector de la biomedicina.

Incluso los aceros inoxidables austeníticos con menor desgaste, se corroen a la larga en el interior del cuerpo humano. Es por ello que estos materiales sólo se utilizan y recomiendan en implantes temporales tales como placas, tornillos y clavos como los que se utilizan para osteosíntesis en traumatología.

El primer acero inoxidable usado para implantes fue el 18-8 (18% Ni, 8% Cr) o AISI 302⁷. Más tarde, fue añadida una pequeña cantidad de Mo (2-4%) con la intención de mejorar la resistencia a la corrosión en medio salino. Esta última aleación es la predecesora del acero inoxidable 316L, que limita la cantidad de carbono a 0.03% en lugar de 0.08% del 316, para mejorar los problemas de corrosión in vivo. En la actualidad, de los aceros inoxidables sólo el 316L es adecuado para la fabricación de implantes.

La mínima concentración de cromo para mantener las condiciones de corrosión del acero inoxidable es del 11%. El cromo es un elemento muy reactivo y, por lo tanto, el acero 316L puede ser pasivado artificialmente para ofrecer una resistencia a la corrosión excelente. Dicho proceso de pasivado consiste en producir una capa superficial de óxido de cromo compacta que protege al núcleo central del material.

Las características microestructurales y propiedades mecánicas de un acero inoxidable, no se deben sólo a su composición química, sino también al tratamiento térmico y mecánico aplicado.

Los aceros inoxidables austeníticos, como el 316L, que es el más usado para la fabricación de implantes, no son endurecibles por tratamiento térmico sino por trabajo en frío (acritud) y no son magnéticos.

En la tabla 7 se muestran las propiedades mecánicas del acero inoxidable 316L exigibles de acuerdo a la norma ASTM F319 [67].

⁷ American Iron and Steel Institute.

DIFERENCIAS ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS MECÁNICAS PARA UN ACERO 316L				
CONDICIÓN	RESISTENCIA A TRACCIÓN (MPA)	TENSIÓN DE FLUENCIA (MPA)	ALARGAMIENTO MÁXIMO (%)	DUREZA ROCKWELL (HRB)
Recocido	485	172	40	95 HRB
Trabajado en frío	860	690	12	—

Tabla 7. Diferencias entre las características mecánicas obtenidas mediante un recocido y con trabajado en frío para un acero 316L.

La acritud no modifica el módulo elástico del material, sino que produce un incremento del límite elástico y de la resistencia a rotura elástica y a fatiga. Una gran parte de las propiedades mecánicas dependen del tratamiento térmico aplicado, o de si el material se trabaja en frío o en caliente.

El diseñador de los implantes ha de ser cuidadoso en la elección del material, para evitar posteriormente efectos indeseados. Incluso el acero inoxidable 316L puede corroerse en algunas circunstancias, como por ejemplo en zonas anexas a los tornillos utilizados en placas de osteosíntesis. Algunos autores recomiendan su uso, únicamente en implantes de uso temporal, tales como placas de osteosíntesis y los tornillos.

2.3.4.2. Aleaciones base Cobalto.

Estas aleaciones se denominan usualmente aleaciones cromo-cobalto y se empezaron a utilizar principalmente en odontología. Existen fundamentalmente dos tipos: la aleación colable y las forjadas.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LAS CUATRO ALEACIONES Cr-Co								
Elemento	CoCrMo (F75)		CoCrWNI (F90)		CoNiCrMo (F562)		CoNiCrMoWFe (F563)	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Cr	27.0	30.0	19.0	21.0	19.0	21.0	18.0	22.0
Mo	5.0	7.0	—	—	9.0	10.5	3.0	4.0
Ni	—	2.5	9.0	11.0	33.0	37.0	15.00	25.00
Fe	—	0.75	—	3.0	—	1.0	4.0	6.0
C	—	0.35	0.05	0.15	—	0.025	—	0.05
Si	—	1.0	—	1.0	—	0.15	—	0.5
Mn	—	1.0	—	2.0	—	0.15	—	1.0
W	—	—	14.0	16.0	—	—	3.0	4.0
P	—	—	—	—	—	0.015	—	—
S	—	—	—	—	—	0.010	—	0.010
Ti	—	—	—	—	—	1.0	0.5	3.5
Co	—	—	—	Hasta el total	—	—	—	—

Tabla 8. Características químicas de las cuatro aleaciones Cr-Co.

Los dos principales elementos de dichas aleaciones, Co y Cr forman una solución sólida de 65% Co-35% Cr. El Mo se añade para obtener un tamaño de grano más fino. Estas aleaciones poseen un pobre

comportamiento a fricción, tanto consigo mismo como con otros materiales. Es por ello que las cabezas articulares de prótesis de Co-Cr, no se hacen jamás del mismo material, utilizándose en general cabezas cerámicas. Las aleaciones forjadas tienen tanto mayor ductilidad como mayor resistencia a la tracción, no estando claro si existen ventajas en cuanto al comportamiento a fatiga de destacar que el módulo elástico de dichas aleaciones está entre 220 y 235 GPa, es decir entre un 10% y un 15% superior al de los aceros inoxidables y el doble del correspondiente al Ti y sus aleaciones. Los modos de transferencia de carga desde la prótesis al hueso, serán pues distintos en cada caso.

Las aleaciones de Cr-Co se conocen comercialmente por los nombres Stellite, Vitallium, Vinertia y otros, según los fabricantes. Para la fabricación de implantes con estas aleaciones se emplea el moldeo y la forja, y no las técnicas tradicionales de mecanizado, pues endurecen rápidamente por la acritud que se produce ya en las primeras operaciones de la máquina, haciendo muy difícil su trabajo.

Existen básicamente dos tipos de aleaciones de Cr-Co, la aleación Co-Cr-Mo que normalmente se utiliza para hacer piezas por fusión o moldeo a la cera perdida y la aleación Co-Ni-Cr-Mo que habitualmente es usada para hacer piezas por forja.

La aleación moldeable (Co-Cr-Mo) se ha utilizado durante décadas en usos dentales y, recientemente, en la fabricación de prótesis articulares. Y la aleación de forja se utiliza para casos donde las sollicitaciones mecánicas son elevadas, como ocurre en los vástagos de las prótesis de rodilla y cadera. Además de las dos aleaciones mencionadas, existen otras dos aleadas con Fe y W, que son raramente utilizadas en la fabricación de implantes.

La aleación de CoNiCrMo tiene una elevada resistencia a la corrosión en medio salino bajo la acción de cargas. Las propiedades de desgaste abrasivo de esta aleación son parecidas a la del CrCoMo pero, sin embargo, no son recomendables para el uso en implantes en los que puedan existir zonas de contacto, debido a sus bajas propiedades friccionales, tanto consigo mismo como con otros materiales, ya sean metálicos o poliméricos. Por otra parte, son altamente recomendables para aplicaciones que requieran una larga vida en servicio sin fracturas y sin pérdidas de resistencia debido a la fatiga. Las propiedades mecánicas de las aleaciones Cr-Co se muestran a continuación:

PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS ALEACIONES Cr-Co			
PROPIEDADES	Fundición CoCrMo (F75)	Forja CoCrWNi (F90)	Forja CoNiCrMo (F562) Tratado en frío
Resistencia a tracción (MPa)	655	860	1793 mín.
Límite de fluencia (0.2% offset) (MPa)	450	310	1585
Alargamiento (%)	8	10	8.0
Reducción de área (%)	8		35.0
Resistencia a fatiga (MPa)	310		

Tabla 9. Propiedades mecánicas de las aleaciones Cr-Co.

2.3.4.3. Otros metales.

Otros metales se han utilizado también en la fabricación de implantes. Se ha demostrado que el tantalio (Ta) es altamente biocompatible, sin embargo, debido a sus pobres propiedades mecánicas y a su alta densidad (16.6 g/cm^3), su utilización está muy limitada a suturas en cirugía plástica y neurocirugía.

El platino y otros metales nobles de su grupo son extremadamente resistentes a la corrosión, aunque tienen muy pobres propiedades mecánicas. Es por ello que sólo se utilizan solos o aleados para producir electrodos tales como las puntas de un marcapasos, debido a sí mismo a sus propiedades eléctricas. El oro y la plata aunque también muy resistentes a la corrosión tienen así mismo muy pobres propiedades mecánicas, lo que les hace de poco interés como materiales implantables.

2.3.4.4. Inconvenientes de los implantes metálicos.

En la actualidad, para todas aquellas aplicaciones clínicas que requieran soportar cargas altas, se están utilizando implantes, en su mayoría metálicos, lo que origina problemas importantes debido a la gran diferencia de propiedades mecánicas entre el implante artificial y el hueso natural, lo que da lugar a rupturas.

La imposibilidad de regenerar el hueso natural y la presencia de iones que, procediendo del implante artificial, son uno de los principales problemas por el dolor que causan en la zona implantada, además de la posibilidad de que los componentes metálicos puedan ser tóxicos o perjudiciales para el ser humano.

Una alternativa, para paliar en parte estos problemas mientras no se logre un material similar al hueso es recubrir el implante metálico con cerámicas. Esto se está realizando tanto en implantes dentales como en prótesis de cadera, aunque el camino que hay que recorrer es todavía muy largo para mejorar estos productos. El proceso de recubrimiento de un metal por una cerámica es complejo y existen muchos métodos para realizarlo. De él depende, en gran parte, el éxito clínico, ya que la calidad y la duración de la fijación en la interfaz dependen en gran medida de la pureza, tamaño de partícula, composición química del recubrimiento, espesor de la capa y características superficiales del sustrato.

2.3.5. Implantes cerámicos.

El uso de materiales cerámicos es bien conocido en odontología, pero su uso en otro tipo de implantes médicos es relativamente nuevo. La principal ventaja de las cerámicas en comparación con otros materiales es que tienen una muy baja reactividad química lo cual les hace inertes y por lo tanto biocompatibles en el cuerpo humano. Los implantes de carbono se han demostrado especialmente convenientes como intercara con la sangre, como en el caso de válvulas cardíacas. Asimismo, son utilizados cementos óseos basados en fosfatos de calcio como la hidroxiapatita que tiene el contenido mineral del hueso para relleno de cavidades.

Aunque no se van a explicar detalladamente, es conveniente tener un concepto sobre los biomateriales más usados en la rama de las cerámicas. En nuestro proyecto solo se llevan a estudio los implantes metálicos, principalmente aleaciones de titanio.

Como resumen cabe destacar los cuatro tipos principales de cerámicas más utilizadas para implantes y tratamientos de adhesión al cuerpo humano, son: el carbono, el óxido de aluminio, hidroxiapatita y algunas cerámicas policristalinas.

2.3.6. Implantes poliméricos y compuestos.

Las posibilidades que ofrecen los polímeros para ser implantados en el cuerpo humano son muy grandes debido al hecho que pueden fabricarse fácilmente en formas muy distintas tales como fibras, tejidos, películas y bloques de diferentes tamaños y formas. Cabe destacar que en realidad los constituyentes de los tejidos naturales no son más que estructuras poliméricas, y por consiguiente los polímeros sintéticos poseen un buen número de similitudes con aquellas.

Sus usos van desde cementos óseos acrílicos, sustitutos de venas o arterias, fibras de sujeción de órganos, hilos de suturas, etc. Cabe destacar los materiales compuestos, que son combinaciones de los otros tres tipos de materiales que han sido citados (metálicos, cerámicos y/o polímeros). Estos materiales pueden combinar las propiedades más adecuadas de los diferentes materiales, caben destacar de esta familia, las fibras de carbono, compuestos cerámica-polímero para sistema de obturación en odontología o materiales compuestos de fibra de vidrio para su aplicación en placas de osteosíntesis.

2.4. Respuesta biológica ante los materiales implantados.

La compatibilidad entre un implante y el organismo humano puede plantearse en dos sentidos diferentes: el efecto que sobre el implante tiene el hallarse ubicado en un medio biológico (corrosión) y la respuesta que este implante produce sobre este medio biológico. Habiéndonos ocupado del primer aspecto en la biocompatibilidad, vamos a centrarnos en el segundo.

Desgraciadamente, los conocimientos actuales sobre esta materia son bastante reducidos, permaneciendo pobremente explicado alguno de los problemas vinculados a la misma.

Para abordar su estudio vamos a considerar, primero, la respuesta biológica de los tejidos ante un material implantado, analizando, seguidamente, las técnicas de que dispone el ingeniero biomecánico para predecir esta respuesta.

2.4.1. Respuesta de los tejidos ante un implante.

La respuesta biológica de los tejidos ante los materiales implantables no sólo ha sido estudiada a la busca de materiales inertes, sino con intención de encontrar materiales capaces de inducir efectos deseables.

Cuando un material extraño al organismo es implantado en un animal o en un individuo humano, los tejidos que lo rodea inician una acción destinada a aislarlo, mediante la formación de una capa fibrosa,

cuyo espesor es proporcional a la cantidad y toxicidad de productos provenientes de la corrosión del cuerpo extraño, así como al movimiento que pueda existir entre éste y los tejidos adyacentes.

Efectivamente, cuando el implante ofrece una gran estabilidad química y permanece, totalmente inmóvil, la capa fibrosa se ve reducida a una película de espesor comparable al diámetro celular. Por el contrario, cuando la acumulación de los productos de la corrosión es nociva para las células en contacto íntimo con el implante, éstas pueden morir liberando enzimas digestivas capaces de provocar, igualmente, la destrucción de los tejidos colindantes.

La primera dificultad con que nos encontramos cuando deseamos estudiar la respuesta de los tejidos ante un material implantado, es que, para ello, ha de intervenir quirúrgicamente, por lo que se provocarán cambios ineludibles en la conducta de los tejidos.

En este sentido, conviene que revisemos las variaciones tisulares que tienen lugar durante la curación de una herida, de manera que podamos analizar la evolución normal de los tejidos y realizar comparaciones sobre la base de esta evolución.

2.4.2. La osteosíntesis.

Cuando hablamos de las características mecánicas en Traumatología, estamos hablando fundamentalmente de osteosíntesis. Dentro de la osteosíntesis, tenemos tres tipos bien diferenciados:

- **Rígida.** *No permite ningún tipo de movimiento entre los fragmentos sintetizados.*
- **Flexible o elástica.** *Opuesta a la anterior, con movilidad en cualquier dirección del espacio.*
- **Dinámica.** *Combinación de las dos precedentes. Permite micromovimientos pero sólo en una dirección, provocando una compresión entre los fragmentos.*

Se ha de tener claro que el hueso es un material viscoelástico, de fibras colágenas y mineral óseo, que sirve como estructura de soporte para la transmisión de las cargas. Con la osteosíntesis trataremos de reconstruir las tres características.

2.4.3. La osteointegración.

La osteointegración se define como un anclaje directo al hueso a un cuerpo implantado que puede proporcionar una base de soporte para una prótesis y posee la capacidad de transmitir fuerzas oclusales directamente al hueso [68]. Esto significa que el implante debe realizarse con material inerte para permanecer en contacto directo con el tejido óseo, sin la interposición de tejido blando.

El término osteointegración [69] consta de «os», que significa “hueso” en latín, y de “integración”, palabra derivada de la misma lengua que significa “estar combinado en un todo completo”. El concepto de osteointegración fue desarrollado, y en su término acuñado, por el doctor Per-Ingvar Brånemark, profesor en el Instituto de Biotecnología Aplicada de la Universidad de Goteborg, Suecia. Descubrió un anclaje óseo directo y fuerte de una cámara de titanio que estaba utilizando mientras estudiaba la microcirculación en mecanismos de reparación ósea.

La cámara de titanio fue introducida quirúrgicamente en la tibia de un conejo. Gracias a la información adicional que reunió en este estudio, descubrió que el titanio era el mejor material para el reemplazo artificial de la raíz. En las siguientes ilustraciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** mos la sección anatómica y los componentes que forman parte de su sistema de prótesis independiente, respectivamente.

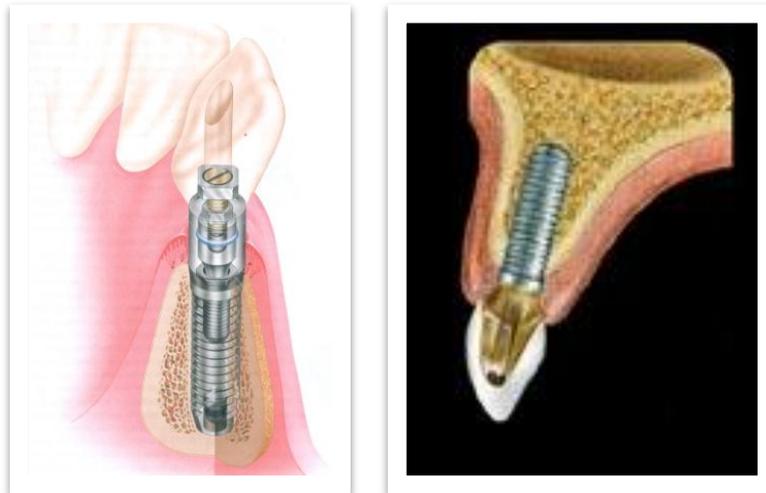


Ilustración 17. Sección anatómica de una prótesis independiente apoyada por implantes sistema Brånemark.

Ya hace más de 30 años que se reconoció que si un material con una superficie porosa era situado en contacto con el hueso, entonces, bajo las adecuadas circunstancias, el hueso podía crecer dentro de la superficie para producir un enlace a través de un encaje mecánico.

La mayoría de las prótesis se adhieren al hueso mediante el uso de un cemento acrílico. Este tipo de prótesis más actuales aprovechan que el crecimiento del hueso para que pueda penetrar en superficies porosas y obtener una osteointegración adecuada. Es decir que se fabrica una prótesis con recubrimiento poroso o rugoso, al que el hueso se une porque penetra el recubrimiento y queda unido a él. Este tipo de prótesis es el más adecuado para pacientes jóvenes o de vida activa.

2.4.3.1. Esfuerzos y cargas.

El hueso está sometido a un proceso de remodelación permanente, que aporta tejido allí donde se necesita y lo retira de donde no, si por un esfuerzo excesivo sufre algún daño, el propio cuerpo procede a repararlo. En los metales no ocurre esto. Si se produce una fisura en la prótesis, el cuerpo no va a poder repararla y la fisura seguirá creciendo hasta la rotura de la prótesis. De allí que para las prótesis sea necesario usar metales de alta resistencia, pero también deben cumplir otra condición y es que sean compatibles, se habla de biocompatibilidad, con los tejidos del organismo.

Se debe pensar que en estas prótesis, los esfuerzos en actividades normales, caminar o subir escaleras, supera cuatro veces el peso corporal del individuo implantado y en algunos casos 10 veces (por ejemplo ante un tropezón). Quiere decir que los esfuerzos sobre la prótesis en una persona de 80 Kg pueden llegar a 800 Kg. Es por este motivo que personas que superen un cierto peso no pueden colocarse prótesis de cadera de ningún tipo ya que durarían poco tiempo.

2.4.3.2. Efectos nocivos.

Los líquidos del organismo son muy corrosivos y la corrosión del implante presenta dos inconvenientes, el primero es que esa corrosión debilita la pieza y el segundo es que el metal disuelto puede ser perjudicial para el organismo. Así, por ejemplo, se considera que el níquel es cancerígeno. Los materiales que resisten la corrosión, más usados en prótesis, son las aleaciones de cobalto-cromo-molibdeno y las de titanio-aluminio-vanadio. Los aceros inoxidable fueron usados en las primeras prótesis de cadera, pero actualmente su uso se encuentra muy restringido en los países del primer mundo, debido a que se corroen más que las aleaciones de cobalto o de titanio y a su contenido de níquel.

El titanio comercialmente puro posee una capa de óxido específica que no debe entrar en contacto con otras superficies del metal. Dicha capa consta de TiO , TiO_2 , Ti_2O_3 , Ti_3O_4 , y puede atraer y rodear biomoléculas. La capa de óxido se contamina cuando entra en contacto con un metal distinto, proteína o lípido. El área contaminada cambia la composición de la capa de óxido y a eso le sigue una reacción inflamatoria que tiene como resultado una formación de tejido de granulación, similar al proceso de organización. Hay bastantes estudios que indican que la biocompatibilidad general de la aleación Ti6Al4V es equivalente a la del metal comercialmente puro.

En vista de posibles diferencias entre esta aleación y el metal puro, y la atribución de estas diferencias al aluminio y al vanadio, muchos grupos de investigación han desarrollado aleaciones alternativas, como la Ti6Al7Nb, siendo ésta una de las razones por las que se ha considerado esta aleación en esta Tesis.

2.4.3.3. Factores clave para la osteointegración.

El primero de los factores clave para una osteointegración exitosa, hace referencia a las características del material.

La fijación Brånemark está hecha de Titanio comercialmente puro, que consta de de 99.5% Ti, 0.5% Fe, 0.03% N, 0.01% C y otros en una cantidad de 0.06%. Cuando la fijación de Ti entra en contacto con la atmósfera, se forma inmediatamente una capa de óxido de grosor 50-100 Å. Y cuando la fijación al hueso ha sanado adecuadamente, la capa de óxido se rodea de una capa de glicoproteína y, después, de una capa calcificada de un grosor aproximado de Å.

Antes de insertar la fijación en el hueso, como se muestra en la figura, la superficie de fijación de Ti debe mantenerse esterilizada y evitarse estrictamente todo contacto con otro metal o sustancia proteínica.



Ilustración 18. Componentes del sistema Brånemark.

En la figura, se observan los componentes del sistema Brånemark, de abajo arriba tenemos: fijación, que es el componente fijado quirúrgicamente a la mandíbula; el tornillo de cobertura, que se enrosca en la parte superior de la fijación para evitar el crecimiento hacia debajo del tejido blando y dura dentro de la parte interna roscada; el pilar, que es el componente que se conecta a través de la mucosa, utilizando el tornillo de fijación que es el que aparece a continuación; el cilindro de oro, parte integrante de la prótesis final, se conecta al pilar con el tornillo de oro.

El segundo factor se refiere al diseño de la fijación. Éste tiene una superficie roscada y se inserta en el emplazamiento óseo preparado, que también posee la misma superficie.

Las roscas crean un área de superficie mayor, pero también ayudan a equilibrar la distribución de fuerzas alrededor del tejido óseo. Un encaje de precisión en el hueso vital es un elemento fundamental para la osteointegración.

El tercer factor se refiere a la prevención de la generación excesiva de calor durante los procedimientos de taladrado del hueso.

Éste no debería calentarse por encima de los 43° C para mantener su vitalidad, ya que al superar esta temperatura, la fosfatasa alcalina comienza a descomponerse; una generación ideal de calor no debería sobrepasar los 39° C.

Un cuarto factor hace referencia a la necesidad de mantener las fijaciones dentro del hueso, sin fuerzas oclusales ni cargas encima de las fijaciones.

2.4.4. Interfase hueso-implante: Biología del hueso.

Antes de discutir la teoría de la osteointegración, es esencial la comprensión exhaustiva de la biología básica del hueso. Éste se clasifica como hueso compacto (hueso cortical) o hueso esponjoso (hueso canceloso).

El primero consta de láminas o capas de células y de una matriz formada por componentes orgánicos e inorgánicos. Las células presentes se denominan osteocitos; están situadas en lagunas y tienen procesos celulares para la difusión de nutrientes dentro de pequeños canales o canalículos.

El componente de matriz u osteoide⁸ representa, aproximadamente, un 40% de peso y está formado por colágeno del tipo I, glicosaminoglicanos y proteína adhesiva, osteonectina.

El componente inorgánico constituye, aproximadamente también, un 40% del peso y consta de hidroxapatita, el cristal apatito de calcio y fosfato.

El hueso compacto tiene láminas circunferenciales exteriores e interiores, láminas haversianas y láminas intersticiales, que contribuyen a la dureza y densidad de este hueso.

El hueso compacto está cubierto de periostio y posee fibras de colágeno, osteoblastos⁹ y osteoclastos¹⁰ [69] [707]. El periostio¹¹ está fuertemente unido a la superficie del hueso con fibras de Sharpey y sirve de protección para el mismo.

Los osteoblastos y osteoclastos de periostio participan en el remodelado, la resorción y la aposición del hueso. En el interior del hueso compacto, el hueso esponjoso tiene una red tridimensional denominada trabéculas óseas. La arquitectura del hueso esponjoso es cavernosa y menos densa, de modo que la dureza es menor cuando se compara con el hueso compacto.

La configuración de las trabéculas óseas crea una gran área de superficie destinada a la abundancia de osteoblastos y osteoclastos, los cuales están asociados a la formación y resorción ósea. Grandes vasos sanguíneos atraviesan las trabéculas óseas.

El hueso esponjoso, de menor densidad y dureza, no es una base estable para la fijación primaria. Únicamente el hueso compacto puede proporcionar una base estable para dicha fijación.

En la siguiente figura, se observa la estructura del hueso. El hueso cortical tiene un sistema haversiano intrincado y una estructura más dura en comparación con el hueso esponjoso, cuya estructura es porosa.

⁸ Conjunto de osteoblasto, osteocito y matriz orgánica aún no mineralizada.

⁹ Células del hueso, sintetizadoras del tejido óseo.

¹⁰ Células multinucleadas que degradan y resorben hueso. Así como el osteoblasto, es implicado en la remodelación de hueso natural.

¹¹ Peri = alrededor, y osteo = hueso. Membrana de tejido conectivo muy vascularizada, fibrosa y resistente, que cubre al hueso por su superficie externa.

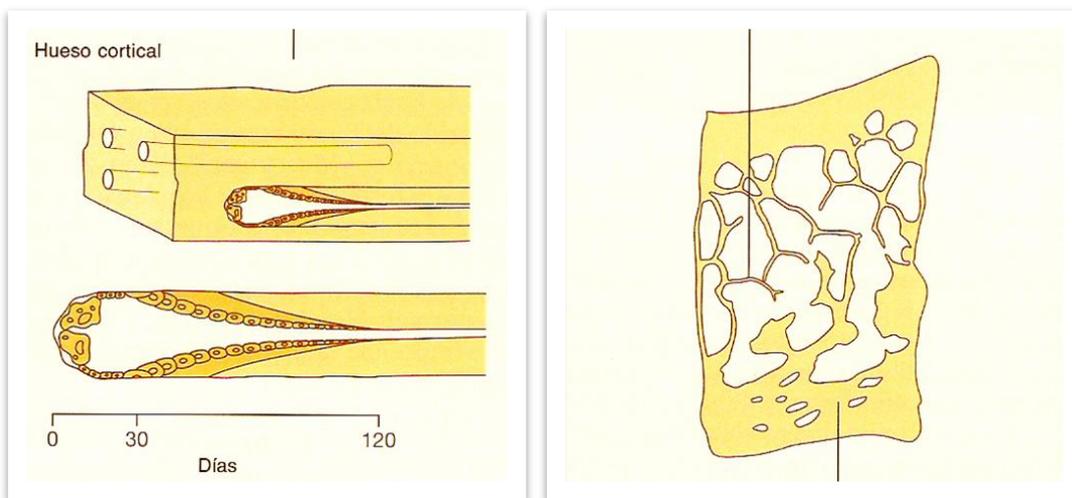


Ilustración 19. Estructura del hueso.

Cuando la sanación del hueso progresa bien, las células óseas presentes en el hueso esponjoso, forma un hueso de alta densidad a lo largo de la superficie de fijación, proceso al que nos referimos como osteointegración.

En la siguiente figura, se observa una representación del emplazamiento de un implante de tornillo roscado en un hueso trabecular.

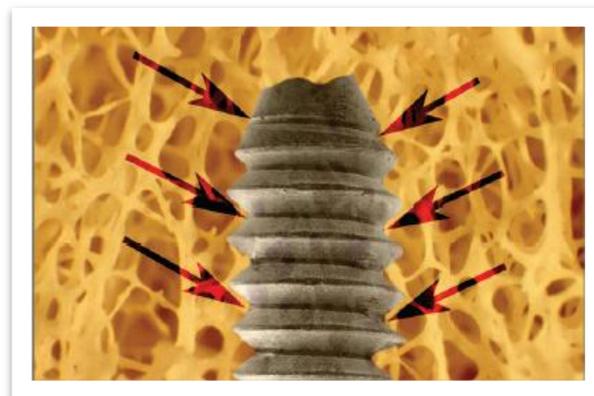


Ilustración 20. Representación del emplazamiento de un implante de tornillo roscado en un hueso trabecular.

Aquí, el hueso trabecular ha sido dañado debido a la preparación del lugar para el implante lo cual le proporcionará un pequeño soporte.

2.4.4.1. Remodelación del hueso.

La osteointegración requiere de la formación del hueso nuevo alrededor de la fijación, un proceso que resulta de la remodelación en el interior del tejido óseo.

En el hueso esponjoso, con abundancia de osteoblastos y osteoclastos disponibles, la remodelación tiene lugar en las superficies de las trabéculas óseas.

Las fuerzas oclusales aplicadas al hueso esponjoso actúan como estímulo para el área de recipiente.

Esta estimulación hace que las células óseas se diferencien de los osteoclastos que participan en la resorción¹² del hueso, mientras que el mismo estímulo hace que las células osteoprogenitoras se diferencien en los osteoblastos que participan en la formación de hueso.

2.4.4.2. Interfase hueso-implante.

La osteointegración fue definida por la Academia Americana de Odontología de Implantes en 1986 como “contacto que se establece sin interfase de tejido no óseo entre el hueso remodelado normal y un implante que ocasiona una transferencia sostenida y la distribución de la carga desde el implante hacia dentro del tejido óseo”.

Haciendo notar que el Titanio es excepcionalmente resistente a la corrosión en los tejidos y que la respuesta del tejido es usualmente mínima, el grupo Brånemark estudió la respuesta del hueso al Titanio en espera de que se pudiera conseguir una aposición directa del hueso.

Existen dos teorías básicas en lo que se refiere a la interfase hueso-implante: una es la de integración fibro-ósea, apoyada por Linkow, James y Weis, y la otra teoría es la osteointegración, apoyada por Brånemark [71].

La integración fibroósea hace referencia al tejido conectivo formado por fibras de colágeno bien organizadas, presentes entre el implante y el hueso. En esta teoría, las fibras de colágeno funcionan de manera similar a las fibras de Sharpey¹³ en la dentición natural. Las fibras afectan a la remodelación del hueso, donde se crea una tensión bajo condiciones óptimas de carga. Las fibras de colágeno situadas alrededor del implante están dispuestas de manera distinta a las fibras de los ligamentos periodontales de los dientes naturales. Dichas fibras están dispuestas de manera irregular, paralelas al cuerpo del implante.

Cuando aplicamos fuerzas, éstas no se transmiten a través de las fibras como ocurre en la dentición natural.

No hay fibras de Sharpey presentes entre el hueso y el implante, por lo que resulta difícil transmitir las cargas. Por tanto, no podemos esperar que en la fibrointegración se produzca una remodelación del hueso.

El tejido conectivo fibroso se interpone entre el implante y el hueso; dicho tejido no actúa como absorbente de choques ni tampoco se parece al ligamento periodontal.

Este tejido conectivo no mineralizado es el resultado de una inflamación local con tendencia a proliferar, aumentando gradualmente la movilidad del implante [72].

Hay abundancia de evidencias que indican que, bajo las condiciones apropiadas, se puede conseguir una buena aposición del hueso-implante con una adecuada estabilidad. Como se observa en la siguiente figura.

¹² Desaparición total o parcial del tejido óseo.

¹³ Cada uno de los numerosos haces de fibras de colágeno del ligamento periodontal que se introducen en el cemento durante su formación.



Ilustración 21. Dibujo esquemático de la fibrointegración.

La interfase de hueso a implante no tiene tejido fibroso interpuesto, es un contacto directo entre el hueso y el implante.

Se forma hueso cortical alrededor de la superficie del implante; dicha formación se equilibra con las fuerzas oclusales.

Por ejemplo, Johansson y Albrektsson realizaron en 1987 un estudio sobre la respuesta del hueso a implantes de Titanio injertados en el hueso de un conejo.

Al nivel de resolución del microscopio óptico, la cantidad de hueso presente en la interfase se incrementó pasado un año de la post implantación, con un recubrimiento óseo aproximado del 85% de la interfase. El par necesario para extraerlo se incrementó durante este periodo.



Ilustración 22. Dibujo esquemático de la osteointegración.

Estudios clínicos, en los cuales los implantes dentales han sido evaluados durante su uso y recuperación, indican que un alto grado de contacto hueso-metal es conseguido también en los humanos¹⁴.

En la primera discusión del concepto de osteointegración, se dijo que el titanio es un material especial que es capaz de facilitar el enlace con el hueso, donde las características específicas de la capa de óxido superficial fueron conducentes para la adsorción de glicoproteínas en la superficie y la subsiguiente mineralización de esta capa.

¹⁴ Johansson, 1991.

Por tanto, con un implante de titanio, injertado cuidadosamente en el hueso, se formará un nuevo hueso para cubrir la mayor parte de la interfase hueso-implante, sin la intervención de una capa de tejido blando; las características no irritantes e inertes del titanio proporcionan las bases para esta reacción.

Señalar, que entre otros factores que afectan a una osteointegración exitosa, se incluye la contaminación de la capa de óxido del implante, y como ya se comentó anteriormente, el mal control de la temperatura durante los procedimientos de taladrado.

La contaminación de la capa de óxido puede inhibir la osteointegración. El titanio comercialmente puro posee una capa de óxido específica que no debe entrar en contacto con otras superficies de metal. Dicha capa consta de TiO , TiO_2 , Ti_2O_3 , Ti_3O_4 , y puede atraer y rodear biomoléculas (Kasemo). La capa de óxido se contamina cuando entra en contacto con un metal distinto, proteína o lípido (Kasemo, Lausmaa). El área contaminada cambia la composición de la capa de óxido, y a eso le sigue una reacción inflamatoria que tiene como resultado una formación de tejido de granulación, similar al proceso de organización, como se observa en la siguiente figura. La situación con las aleaciones de titanio es interesante.

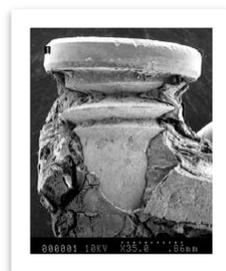


Ilustración 23. Microfotografía realizada con microscopio electrónico de barrido de mini implantes retirados del fémur de una rata, mostrando la aposición de hueso sobre la superficie del implante.

Hay bastantes estudios que indican que la biocompatibilidad general de la aleación Ti6Al4V es equivalente a la del metal comercialmente puro.

El grupo Brånemark ha mantenido consistentemente la opinión de que la respuesta del hueso a la aleación es inferior que al metal puro.

2.4.4.3. Superficies porosas.

Ya hace más de 30 años que se reconoció que si un material con una superficie porosa era situado en contacto con hueso, entonces, bajo las adecuadas circunstancias, el hueso podía crecer dentro de la superficie para producir un enlace a través de un encaje mecánico.

También quedó fuera de duda, en las primeras etapas, que este proceso podría ser logrado ya sea con metales, cerámicas o polímeros y que los criterios fundamentales para el crecimiento óseo dentro del material eran las características geométricas de esta porosidad. Si el material en cuestión no era claramente degradable y citotóxico, podría esperarse crecimiento óseo hacia dentro del material, si las

porosidades (es decir, la mínima interconexión entre los poros) eran del orden de las 100 μm o por encima.

Para porosidades comprendidas entre los 50 y los 100 μm se producía el crecimiento de tejido oseide, tejido parcialmente mineralizado, pero no estructuralmente en forma de hueso, mientras que para menores tamaños de poro, sólo se formaría tejido blando.

En orden a conseguir la estabilidad, no es necesario tener crecimiento de hueso dentro de la totalidad de la estructura porosa, ya que la resistencia de adhesión se derivará de la resistencia del trabéculo que entra en la primera capa de porosidad, y efectivamente el efecto de debilitamiento general de la porosidad sobre el sustrato sugiere que una capa porosa de entre 200-500 μm puede ser suficiente para optimizar su funcionamiento.

Bajo estas condiciones, y con un tamaño de poro en el rango de los 50-300 μm , se puede conseguir un máximo de resistencia a la cortadura en la interfase dentro de las siguientes 12 semanas.

El método de producción de la capa porosa es ciertamente importante, pero no parece tener influencia de por sí en el crecimiento óseo sobre la superficie porosa.

El sinterizado de alta temperatura de partículas metálicas, alambres y fibras, ha sido utilizado para conseguir recubrimientos porosos en las superficies, ocasionando una estructura porosa interconectada y tridimensional regular con una porosidad de hasta el 50%.

Muchos sistemas de implantes dentales emplean actualmente superficies porosas y la deposición por plasma de titanio es claramente la favorita.

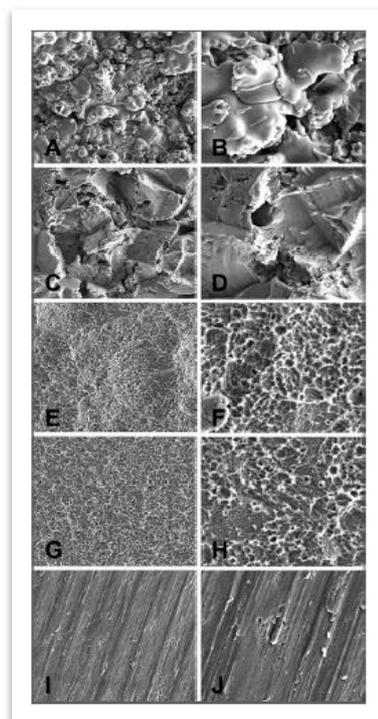


Ilustración 24. Microfotografías de la superficie de Ti Cp que ha recibido diferentes tratamientos.

En la figura, se muestran las microfotografías de la superficie de Ti comercialmente puro que ha recibido diferentes tratamientos. A y B corresponden a un tratamiento de deposición por plasma; C y D corresponden a un “chorreado” con partículas; E y F es la superficie obtenida con un chorreado y un doble ataque ácido; G y H se corresponden a un doble ataque ácido y por último la I y la J representan la superficie para el Ti cp maquinado (torneado). Anchura del campo para (A, C, E, G, I): 234 μm ; (B, D, F, H, J): 58 μm .

Existe poco interés en los polímeros porosos debido a sus limitadas propiedades mecánicas. Más recientemente, ha surgido un considerable interés en las técnicas de deposición por plasma.

Las dos técnicas comentadas, sinterizado y deposición por plasma, dan como resultado capas que van desde los 500 a los 100 μm de espesor, pero las técnicas por plasma presentan mayores dificultades de control y no conduce a una porosidad interconectada regular.

Las dos técnicas comentadas, sinterizado y deposición por plasma, dan como resultado capas que van desde los 500 a los 100 μm de espesor, pero las técnicas por plasma presentan mayores dificultades de control y no conduce a una porosidad interconectada regular.

Cualquiera que haya sido la técnica empleada, se ha de prestar especial atención a la integridad de la capa porosa y cualquier debilitamiento partícula-partícula o en las interfaces capa porosa-substrato, que pueden poner seriamente en peligro la integridad del dispositivo.

También hay que prestar atención al posible incremento en la corrosión de las superficies porosas, debido tanto al incremento del área superficial como a los efectos de corrosión en hendiduras.

CAPÍTULO

3

El Titanio como Biomaterial

3.1. Generalidades sobre el titanio.

El titanio es un elemento que se puede encontrar en cualquier punto del universo. Ha sido detectado en las estrellas, en el polvo interestelar, en meteoritos y en la corteza terrestre. Es el noveno elemento más abundante de la Tierra, con un 0.8% en peso, estando presente en numerosas rocas ígneas. Los minerales que muestran una mayor concentración de este metal son el rutilo (TiO_2) y la ilmenita (FeTiO_3).

La tecnología moderna se ve atraída por sus propiedades: soporta los más diversos agentes corrosivos, elevadas presiones, mayores temperaturas que muchos otros metales, y su peso es reducido (45% menos que el acero). Por ello no es de extrañar que sea una de las más cotizadas materias primas [73] [74] [75] [76] [77].

El titanio fue descubierto por el sacerdote y mineralogista inglés William Gregor en 1791. De la ilmenita procedente de unas arenas negras halló el óxido del nuevo metal. En 1795 un científico alemán descubrió el mismo elemento del rutilo, dándole el nombre de titanio.

En 1937 el doctor Wilhem Kroll, en asociación con Siemens y Helske, desarrolló un proceso para la obtención de titanio consistente en la reducción del compuesto tetracloruro de titanio con magnesio molido, en una atmósfera de argón para evitar la oxidación. Este fue el primer proceso que permitió la obtención de cantidades apreciables de titanio puro, y se sigue utilizando mayoritariamente en la actualidad.

Los pasos a seguir para su obtención son:

1. Cloración del mineral para conseguir tetracloruro de titanio (TiCl_4).
2. Reducción de TiCl_4 para conseguir Ti metálico (proceso Kroll), en forma de piedritas esponjosas.
3. Purificación de estas piedras para quitar los productos de reducción.
4. Separación granulométrica.

Las impurezas resultantes en la obtención del titanio básicamente son: 0.13% de magnesio, 0.11% de oxígeno, 0.2% de hierro, 0.087% de carbono y 0.04% de nitrógeno.

Las posibilidades que ofrece el titanio no fueron conocidas hasta el 1943. Durante la II Guerra Mundial, la Oficina alemana de minas comenzó a entrever las potencialidades del titanio. Una vez acabada la guerra, y con el doctor Kroll como miembro de dicho organismo, publicó el primer gran informe sobre el metal, titulado "Metallic Titanium and its Alloys" [78], en el que se indicaban las interesantes propiedades del metal.

3.2. Propiedades del titanio.

Sus características de poco peso y gran solidez lo hacen especialmente apto para la construcción aeroespacial. Todas las piezas de aviones y de satélites sometidas a condiciones extremas, se fabrican en Titanio.

La posibilidad de combinarlo con otros metales, permite obtener una amplia gama de aleaciones con un fantástico espectro de características, cada una con características excepcionales propias. Algunas de estas aleaciones son las que se utilizan en la parte exterior de cohetes y aviones supersónicos, sometidas a grandes esfuerzos a elevadas temperaturas. Otras se utilizan para la construcción de proyectiles capaces de perforar blindajes.

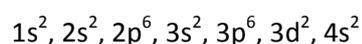
Otra propiedad ampliamente explotada es su gran resistencia a los más diversos agentes químicos. Resiste la acción de ácidos sumamente agresivos (salvo los ácidos clorhídrico y fluorhídrico) que destruyen rápidamente a otros metales como el acero inoxidable. Se utiliza ampliamente en la industria química y petroquímica, como también en la construcción de partes expuestas al agua salina, tales como piezas de barcos y plantas industriales costeras.

Su compatibilidad con los tejidos orgánicos lo colocan al nivel de los metales nobles en lo que respecta a sus aplicaciones en tejidos orgánicos. Muchos elementos de características hipoalergénicas se construyen de titanio.

Sus propiedades de osteointegración lo hacen especialmente apto para la obtención de implantes osteointegrados, tales como los dentales, clavos que se fijan para la reconstrucción de huesos fracturados y prótesis óseas.

3.2.1. Propiedades físicas.

El titanio natural es un elemento común en la corteza terrestre. Es un elemento de transición, como el hierro, con una estructura electrónica:



La cual es característica de este grupo de elementos, con su capa “d” incompleta. Dicha estructura electrónica permite que el titanio forme soluciones sólidas con muchos elementos sustitucionales. Esto propicia los tratamientos térmicos con transformación parcial.

Desde un primer momento se ha considerado como un metal liviano ($4,5 \text{ g/cm}^3$), que pesa un 45% menos que el acero ($7,8 \text{ g/cm}^3$) y solo el 60% más que el aluminio ($2,7 \text{ g/cm}^3$).

Su relación resistencia-peso hace que las aleaciones a base de titanio sean superiores a todos los metales y aleaciones de ingeniería en un rango de temperaturas de -253°C a 594°C . Esta ventaja va acompañada por una excelente tenacidad, resistencia a la fatiga y resistencia a la corrosión.

Entre sus propiedades físicas cabe destacar su alto punto de fusión (capaz de trabajar a altas temperaturas), baja conductividad térmica y bajos coeficientes de conductividad térmica y eléctrica. Las propiedades físico-químicas del titanio se resumen en la siguiente tabla. La tecnología moderna se ve atraída por sus propiedades, por ello no es de extrañar que sea una de las más cotizadas materias primas [79].

Nombre	Titanio
Número atómico	22
Valencia	2,3,4
Estado de oxidación	+4
Electronegatividad	1,5
Radio covalente (Å)	1,36
Radio iónico (Å)	0,68
Radio atómico (Å)	1,47
Configuración electrónica	[Ar]3d ² 4s ²
Primer potencial de ionización (eV)	6,89
Masa atómica (g/mol)	47,90
Densidad (g/ml)	4,51
Punto de ebullición (°C)	3260
Punto de fusión (°C)	1668
Conductividad eléctrica	$2,6 \cdot 10^6 \text{ W}^{-1}\text{m}^{-1}$
Conductividad térmica	$21,9 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ (a 300 K)
Calor específico	$0,523 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ (a 300 K)

Tabla 10. Propiedades físico-químicas del Titanio.

El titanio sufre una transformación alotrópica a temperatura ambiente y presenta una estructura hexagonal compacta (llamada fase α), mientras que por encima de los 882°C dicha estructura se convierte en una cúbica centrada en el cuerpo (llamada fase β). Esto permite que se puedan realizar tratamientos térmicos con transformación total [80].

El titanio es un mal conductor de la electricidad. Es treinta veces peor conductor que el cobre y diez veces peor conductor que el aluminio. Por eso no es usado en el transporte de electricidad. Respecto a sus propiedades magnéticas, el titanio puede ser clasificado como paramagnético, implicando una ligera atracción por un campo magnético.

3.2.1.1. Resistencia a la temperatura.

El límite superior de temperatura para servicios prolongados en aire caliente es de alrededor de 538°C. En aplicaciones por períodos cortos, tales como las paredes de fuego que revisten los motores a chorro de aviones y helicópteros, se consideran que el titanio es utilizable hasta temperaturas de 1100 °C. El límite inferior conocido del titanio es de -253 °C, la temperatura del hidrógeno líquido.

En este punto deben especificarse los grados ELI (Ti-6Al-4V ELI o Ti-5Al-2.5Sn ELI) debido a que proveen la máxima tenacidad.

3.2.1.2. Estabilidad térmica.

Es una medida de la capacidad de una aleación de mantener sus propiedades originales después de exposiciones prolongadas a temperaturas elevadas.

Las aleaciones de titanio para temperaturas de servicio superiores a 426 °C se diseñan y ensayan cuidadosamente, para asegurar su estabilidad a las máximas temperaturas de utilización. Las aleaciones alfa y cuasi alfa son las mejores para aplicaciones de alta temperatura.

3.2.1.3. Transferencia de calor.

La transferencia de calor en un sistema intercambiador de calor de titanio, se aproxima a los niveles de la del bronce almirantazgo, a pesar de su relativamente bajo coeficiente de conductividad térmica¹⁵. Hay algunas razones para que esto ocurra:

- La gran resistencia mecánica del titanio permite la utilización de espesores de pared más finos en los equipos.
- La película de óxido superficial del titanio brinda características inusuales y beneficiosas.
- La ausencia relativa de corrosión en los medios en los que se utiliza generalmente el titanio, deja una superficie clara y suave mejorando el flujo laminar.
- La excelente resistencia a la corrosión por erosión permite operar a velocidades significativamente superiores.

3.2.2. Propiedades químicas.

El titanio tiene cinco isótopos, con pesos atómicos comprendidos entre 46 y 50, todos ellos estables. El más abundante es el Ti-48. Como es característico en los elementos de transición, el titanio presenta una valencia variable entre el estado bivalente, trivalente y tetravalente. El mayor número de compuestos se da con la valencia tetravalente. Puede formar soluciones sólidas y compuestos, bien con enlace metálico, covalente o bien iónico.

¹⁵ Característica de cada sustancia que expresa la magnitud de su capacidad de conducir el calor.

El titanio metálico es un metal blanco y lustroso, con una baja densidad. Presenta una excelente resistencia a la corrosión, ya que soporta el ataque de los ácidos inorgánicos, de la mayoría de los orgánicos y del cloro húmedo. Sin embargo reacciona rápidamente con el oxígeno, nitrógeno, el hidrógeno y el carbono.

La gran reactividad del titanio con el oxígeno origina la rápida formación de una capa superficial de óxido. Los óxidos formados van desde el TiO hasta Ti_7O_{12} , cada uno de los cuales muestran una gradación diferente, y para capas delgadas, muestran una superficie multicolorada. De esta forma el metal queda protegido por una capa inerte que lo protege de la corrosión. El titanio comparte esta característica con el aluminio, si bien la protección que proporciona la capa de óxido de titanio es muy superior a la de óxido de aluminio, tanto frente a la corrosión como frente a la oxidación. Esta notable propiedad hace del titanio un excelente material para su uso en ambientes corrosivos, biomedicina y en la industria en general.

La biocompatibilidad del titanio es excelente. Su no toxicidad, su excelente resistencia a la corrosión, su compatibilidad con tejidos y huesos lo convierte en un metal excelente para el uso de prótesis óseas, dentales y en otras aplicaciones traumatológicas.

3.2.2.1. Resistencia a la corrosión.

La resistencia a la corrosión del titanio es sobresaliente. Las aplicaciones que tiene en la industria química son amplísimas.

El titanio es muy resistente a la corrosión en aguas salinas, cloro líquido, ácido acético, ácido nítrico, hipocloritos y salmuera. Resiste soluciones diluidas de ácido clorhídrico y de ácido sulfúrico cuando están en presencia de inhibidores. Además el titanio presenta buena resistencia a la corrosión a la mayoría de los combustibles y oxidantes que se utilizan actualmente en cohetes propulsados por combustible líquido. El titanio resiste al picado (pitting¹⁶), a la corrosión por cavitación y por erosión.

Las soluciones utilizadas en el proceso de galvanizado, anodizado y refinado electrolítico de metales que no contengan fluoruros, le provocan poco o ningún ataque al titanio.

3.2.3. Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas del titanio dependen de su pureza. Pueden considerarse representativos los valores del titanio comercialmente puro (grado 1) [81], que se muestran en la siguiente tabla:

Propiedades	Valor
Resistencia	240 MPa
Límite elástico	170 MPa
Alargamiento	50 %
Dureza	70 HrB; 85 HV

Tabla 11. Valores representativos de las propiedades mecánicas del titanio.

¹⁶ Aumento de la dureza, fragilidad y resistencia del metal como consecuencia de su forjado en frío.

La resistencia es baja, pero puede elevarse a expensas de disminuir su plasticidad (como en otros metales) disolviendo otros elementos en la red cristalina. También hay que tener en cuenta que es susceptible de recibir tratamientos térmicos con transformación total o parcial de su microestructura.

En el caso del titanio, su gran reactividad, su afinidad con el oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno, y el hecho de que la solubilidad intersticial de estos elementos en el titanio es varios órdenes de magnitud mayor que en otros metales (como el hierro y el aluminio), hace que estos elementos influyan notablemente en las propiedades mecánicas.

Por esto se definen varios grados del titanio comercialmente puro en función del contenido de estos elementos (que controlan su resistencia y fragilidad).

3.2.3.1. Resistencia al pandeo.

La rigidez de las estructuras sometidas a la compresión, está gobernada usualmente por relaciones módulo-densidad, siendo la relación $\frac{E}{\rho}$ un índice para el pandeo elástico de columnas. El índice de pandeo para chapas es $\frac{E}{\rho}$. Si bien en la relación $\frac{E}{\rho}$ el acero y el titanio están a la par, la raíz cuadrada y cúbica en estos índices le otorgan una ventaja al titanio por su baja densidad, para las aplicaciones en las cuales el pandeo elástico es un factor crítico en el diseño.

3.2.3.2. Resistencia al creep y a la rotura.

Algunas aleaciones de titanio tienen una resistencia al creep equivalente a la de los aceros endurecibles por precipitación.

La resistencia al creep del Titanio no es, por lo general, un factor limitante en las consideraciones de diseño, mientras la temperatura no exceda los 315-370 °C.

Por debajo de los 315 °C el creep se vuelve importante únicamente para diseños sometidos a esfuerzos superiores al 90 % del límite de fluencia.

3.2.3.3. Resistencia a la fatiga.

Las propiedades del titanio respecto a la fatiga son excelentes, especialmente para formas suaves. La presencia de entalladuras hasta $K_t = 5$ reduce el valor de fatiga admisible.

3.2.3.4. Resistencia a la fractura.

Las aleaciones de titanio en estado recocido, como la Ti-6Al-4V, Ti-5Al-2.5Sn y Ti-8Mo-8V-2Fe-3Al, tienen una apreciable resistencia al impacto.

Esto significa, una resistencia a la formación y propagación de grietas y la habilidad de soportar cargas en presencia de grietas agudas.

En una variedad de aleaciones tratadas térmicamente se puede obtener gran resistencia al impacto a tensiones superiores que las que soporta el material en estado recocido.

Existe, sin embargo, una relación inversa entre resistencia uniaxial y resistencia a la rotura. Es por ello que la resistencia a esfuerzos uniaxiales debe ser tal que la resistencia a la fractura sea la adecuada, y no necesariamente debe ser la máxima que puede lograrse para la aleación en cuestión.

Un tratamiento térmico inadecuado puede perjudicar estas características.

3.3. Aleaciones del titanio.

3.3.1. Introducción.

La idea de usar materiales preparados o fabricados por el hombre para suplir o reemplazar órganos o tejidos deteriorados del cuerpo humano, se remonta muy atrás en la historia. Reconocen intentos de reemplazar dientes perdidos por marfil o dentina en culturas tan antiguas como la egipcia o la inca [82].

Sin embargo, sólo en la segunda mitad de este siglo se han puesto a disposición del médico y del ingeniero métodos objetivos para la evaluación de las propiedades de los materiales a usar [83].

Actualmente, la necesidad de encontrar materiales más fiables para su uso como biomateriales, en especial en relación a las propiedades mecánicas, ha conducido a la utilización, además de otros materiales, de metales y aleaciones con una excelente biocompatibilidad, pasividad química extrema y propiedades adecuadas para un buen comportamiento a largo plazo [84]. Los materiales más destacados por su uso como biomateriales son los aceros inoxidable, las aleaciones CoCr y diversas aleaciones de titanio.

De los materiales citados, esta Tesis Doctoral se centra en las aleaciones de titanio como biomaterial.

3.3.1.1. Historia.

El titanio fue descubierto en 1791. Tiene una concentración media del 0,8 % en peso, si bien su existencia en concentraciones que permitan una extracción económicamente viable no es muy frecuente, excepto como Rutilo (TiO_2) e Ilmenita (FeOTiO_2).

Debido a su elevada reactividad, no se obtuvo una muestra impura hasta el año 1887. A pesar de que se intentó obtener este metal en forma pura durante mucho tiempo, ello no se logró hasta el año 1910, mediante la reducción del compuesto TiCl_4 con sodio, si bien las cantidades obtenidas eran muy reducidas.

En 1937 Kroll desarrolló un proceso para la obtención de titanio consistente en la reducción del compuesto tetracloruro de titanio con magnesio en una atmósfera de argón para evitar la oxidación. Éste fue el primer proceso que permitió la obtención de cantidades apreciables de Titanio puro, y es el método utilizado en la actualidad [85].

En la década de los años cincuenta, el gobierno de los EEUU potenció los estudios relativos al titanio y a sus aleaciones, ya que, debido a sus excelentes propiedades, caracterizadas por una densidad reducida, una excelente relación resistencia/densidad y un buen comportamiento a altas

temperaturas, las aleaciones del titanio constituyen un material muy útil en los campos de la industria aeroespacial y militar. En la década de los sesenta se amplió su uso a otras aplicaciones, como la industria química, debido a su excelente resistencia a la corrosión [86].

Esta resistencia es causada por una capa de pasivado formada por óxidos de titanio, que se forman espontáneamente en la superficie del titanio al entrar en contacto con la atmósfera.

Otras aplicaciones estudiadas del titanio y sus aleaciones son las aplicaciones estructurales en ambientes salinos, por su resistencia a la corrosión [86] [87], y en el campo de los biomateriales [88], gracias a su excelente biocompatibilidad.

Actualmente el titanio se utiliza principalmente en la industria aeroespacial, en la industria química y en aplicaciones médicas, entre otras. Cabe destacar que sólo un 10% de la producción total se destina a la obtención de titanio en forma metálica.

El 90% se destina a la fabricación de dióxido de titanio, es cual es usado en forma de pintura protectora antióxido. Del 10% restante, el 50% es utilizado para la fabricación de la aleación Ti-6Al-4V [89].

3.3.1.2. Propiedades.

El titanio es un elemento de transición, como el hierro, el níquel o el cobalto, cuya estructura electrónica presenta una capa *d* incompleta. Dicha estructura electrónica permite que el titanio forme soluciones sólidas con muchos elementos sustitucionales.

PROPIEDADES FÍSICAS DEL TITANIO	
PROPIEDAD	VALOR
Número atómico	22
Peso atómico	47.88 g/mol
Volumen atómico	10.6 Å ³
Radio covalente	1.32 Å
Primer potencial de ionización	6.83 eV
Valencia	2, 3, 4
Punto de fusión	1670 °C
Punto de ebullición	3260°C
Estructura cristalina	α (HCP) para T < 882 °C β (BCC) para T > 882 °C
Parámetros de red cristalina	α: a= 0.295 nm; c= 0.468 nm β: a= 0.332 nm (a 900°C)
Temperatura de transición α-β	882° ± 2 °C
Densidad	fase α (20°C): 4.51 g/cm ³ fase β (885 °C)
Capacidad calorífica	523 J/kg . °C
Conductividad térmica	17 W/m . °C
Coefficiente de expansión térmica (a 20°C)	8.41 x 10 ⁻⁶ /°C
Conductividad eléctrica (relativa al cobre)	0.031
Resistividad eléctrica	0.0026 Ω.m

Tabla 12. Propiedades Físicas del titanio.

Desde un primer momento, ha sido clasificado como metal ligero, a pesar de que su densidad de 4.51 g/cm^3 es casi el doble de la densidad del aluminio, debido a su excelente relación entre resistencia mecánica/densidad. El titanio metálico puro es un metal blanco y lustroso.

Presenta una excelente resistencia a la corrosión, ya que soporta el ataque de los ácidos inorgánicos, de la mayoría de orgánicos y del cloro húmedo.

Sin embargo, reacciona muy rápidamente con el oxígeno, el nitrógeno, el hidrógeno y el carbono. Dicha reactividad depende fuertemente de la temperatura y, a altas temperaturas, la reactividad del titanio aumenta exponencialmente.

Esta propiedad es especialmente visible con la extrema reactividad del titanio con el oxígeno y otros elementos a altas temperaturas (mayores de $700 \text{ }^\circ\text{C}$), los gases llegan a difundirse en la red cristalina del titanio [90].

Todos los estudios realizados hasta la fecha muestran que la biocompatibilidad del titanio es excelente [90]. Esta propiedad, unida al elevado ratio resistencia mecánica/peso, a su bajo módulo de elasticidad y su resistencia a la corrosión, lo convierten en un metal excelente para su uso en prótesis articulares, implantes dentales y en otra aplicaciones en Medicina.

3.3.1.3. Características de las aleaciones de titanio.

El titanio es el único metal ligero que presenta dimorfismo, ya que en estado puro su estructura compacta hexagonal (fase α) presenta una transformación alotrópica a $882 \text{ }^\circ\text{C}$, pasando a una microestructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) [90]. Esta transformación alotrópica da al titanio propiedades interesantes al poder tratarse termo-mecánicamente con transformación completa como en el caso de los aceros. Así se puede controlar las proporciones de fase, las propiedades conseguidas o la textura del material.

En equilibrio, la estructura β es inestable a temperaturas menores a $882 \text{ }^\circ\text{C}$, descomponiéndose de nuevo en la fase α al enfriar el titanio por debajo de la temperatura de transición.

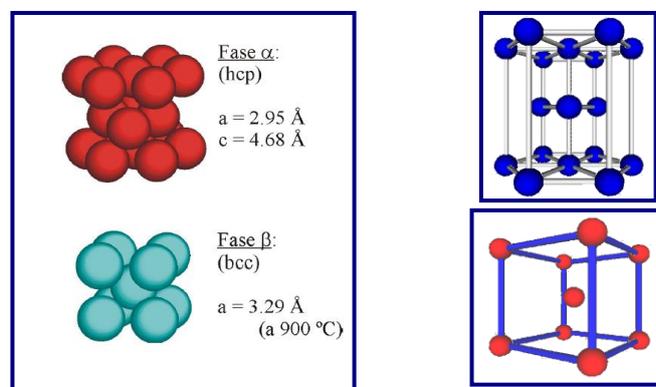


Ilustración 25. Estructuras cristalinas del titanio. Fase α : hexagonal compacta. Fase β : cúbica centrada en el cuerpo.

Esta transformación ofrece la posibilidad de obtener aleaciones con microestructuras de tipo α , β ó α/β , dependiendo de los elementos aleantes que estabilizan una u otra fase.

Las aleaciones de titanio se pueden clasificar en diferentes familias en función de la fase predominante en la microestructura en estado recocido a temperatura ambiente, es decir, según la capacidad de los aleantes de estabilizar la fase α ó β , existen las aleaciones α (y casi α), α/β , β (y casi β).

Los elementos de aleación añadidos en el titanio se suelen clasificar como estabilizadores de la fase α o de la fase β según su efecto, es decir si aumentan o bajan la temperatura de transformación alotrópica.

Las aleaciones tipo α/β se suelen clasificar a su vez en casi- α , cuando tiene una estructura esencialmente α a temperatura ambiente, y casi- β , cuando la estructura a temperatura ambiente es mayoritariamente β .

La manipulación de estas variaciones cristalográficas mediante adición de aleantes y procesos termomecánicos, da lugar a un amplio rango de aleaciones y propiedades.

3.3.2. Efecto de los aleantes o elementos estabilizadores.

El titanio se puede alea con diferentes materiales, que estabilizan una de las dos fases que presenta este material.

- *Elementos alféogeneos*

Los elementos que estabilizan la fase α son aquellos que incrementan la temperatura a la cual la fase α es estable. Los elementos más importantes que se comportan de esta manera son el aluminio, el oxígeno, el carbono y el nitrógeno.

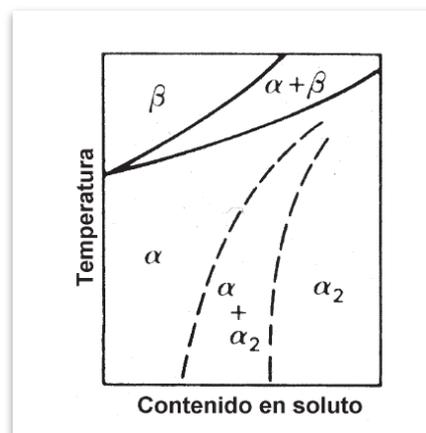


Ilustración 26. Diagrama de equilibrio del titanio con un elemento α -estabilizante.

El aluminio (también Ga, Ge, B), elemento de sustitución, y los intersticiales O, N, y C son todos fuertes estabilizadores de la fase α , ya que aumentan la temperatura del transus y la cinética de precipitación de la fase α con la fracción del elemento. El Al es el que se utiliza como elemento de sustitución ya que tiene una alta solubilidad en la fase α . Se añade hasta un 6% ya que luego conduce a la precipitación de la fase α (Ti_3Al) frágil. Los intersticiales también proporcionan un endurecimiento importante. Son en general impurezas de elaboración y tienen una influencia al

bajar la tenacidad, la resistencia a fatiga y la ductilidad. En general los elementos con menos de 4 electrones de valencia por átomo estabilizan la fase α y se disuelven perfectamente en ella.

- *Elementos betágeneos*

Los elementos que estabilizan la fase β son los que permiten que sea estable a temperaturas menores de la temperatura de β -transus. Los estabilizadores de la fase β se clasifican en elementos β isomorfos y β eutectoides, en función del correspondiente diagrama de fases. Los más utilizados son el vanadio V, el molibdeno Mo, y el niobio Nb. Se puede estabilizar la fase hasta la temperatura ambiente si las concentraciones en estabilizadores β son suficientes.

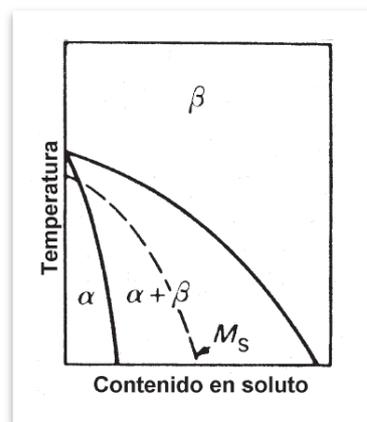


Ilustración 27. Diagrama de equilibrio del Titanio con un elemento β -estabilizante.

Otro grupo de aleantes que estabilizan la fase β son los que forman sistemas eutectoides con el titanio. Estos sistemas poseen una temperatura de transformación eutectoide mucho menor que la temperatura β -trans. Entre estos elementos se destacan el hierro, el manganeso, el cromo, el níquel, el cobre y el silicio.

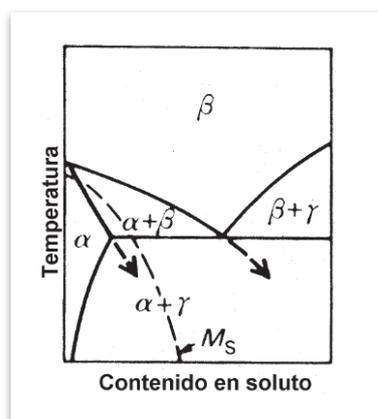


Ilustración 28. Diagrama de equilibrio del Titanio con un elemento β -eutectoide.

Entre otros aleantes destacan el hierro, el manganeso, el cromo, el cobalto, el níquel el cobre y el silicio.

Dentro de las aleaciones β -eutectoides, la adición de pequeñas cantidades de cobre en el titanio permite la obtención de una aleación que responde al tratamiento de envejecimiento, ya que la solubilidad del cobre en el titanio a temperatura ambiente es muy reducida.

Por ello, esta aleación puede ser forjada en frío en una condición relativamente dúctil, y ser posteriormente endurecida mediante un tratamiento térmico de envejecimiento.

▪ *Elementos neutros*

El estaño y el zirconio son solubles en la fase α y permiten su endurecimiento, pero no tienen casi ninguna influencia en la temperatura de transus, por ello se llaman neutros. El zirconio se utiliza entre un 2% y un 8% para aumentar la resistencia a baja y media temperatura, pero parece que a partir de un 5% disminuye la ductilidad y la resistencia a la fluencia.

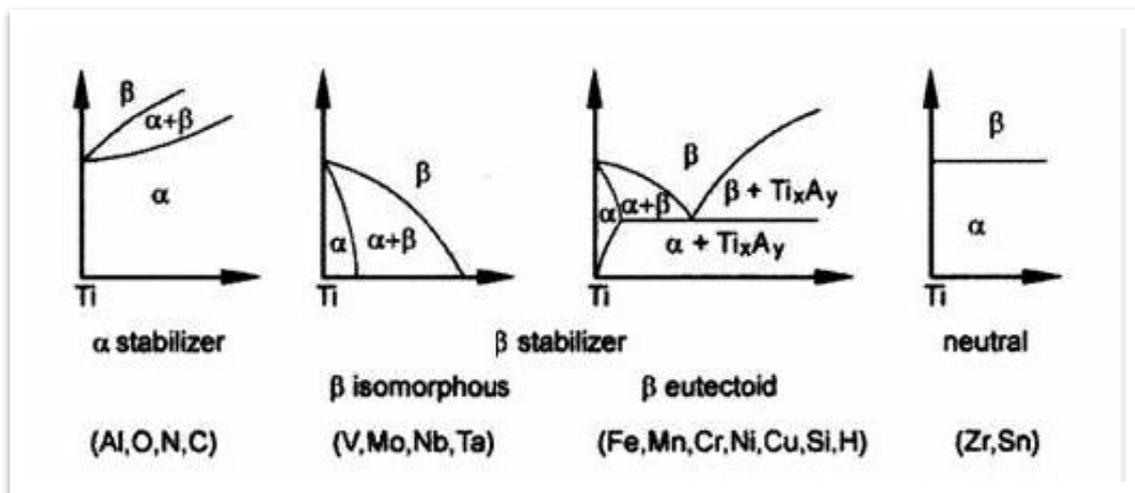


Ilustración 29. Diagramas de fases del titanio. Fase α estabilizada; fases β estabilizadas y con elementos neutros. En orden Izq-Der.

A partir de los diagramas de equilibrio que presenta el titanio aleado con diferentes aleantes, la realización de una clasificación de las aleaciones de titanio es inmediata, según el tipo de fase que presenta la estructura de la aleación a temperatura ambiente.

Se denominan aleaciones α a aquellas aleaciones que presentan una estructura α a temperatura ambiente. El efecto de los aleantes usados en estas aleaciones es generalmente incrementar la temperatura β -transus.

Las aleaciones β son aquellas en las que su estructura a temperatura ambiente es fase β . El efecto del aleante es conseguir estabilizar la fase β de la aleación a temperatura ambiente.

Para lograr este propósito son muy usados los llamados aleantes β -isomorfos. Se denominan aleaciones $\alpha+\beta$ aquellas aleaciones de titanio en las que la estructura del material consiste en un mezcla de fase α y fase β , cuya composición depende del efecto y porcentaje de los aleantes añadidos al titanio.

3.3.3. Clasificación de las aleaciones.

A partir de los diagramas de equilibrio que presenta el titanio aleado con diferentes aleantes, la realización de una clasificación de las aleaciones de titanio es inmediata, según el tipo de fase que presenta la estructura de la aleación a temperatura ambiente.

Se denominan aleaciones α , a aquellas aleaciones que presentan una estructura α a temperatura ambiente. El efecto de los aleantes usados en estas aleaciones es generalmente el de producir un aumento de la temperatura de β -transus. El titanio comercialmente puro (Ti cp) se clasifica dentro de este grupo.

Las aleaciones β son aquellas en las que la estructura a temperatura ambiente es fase β . El efecto del aleante es conseguir estabilizar la fase β de la aleación a temperatura ambiente.

Se denominan aleaciones α/β a aquellas aleaciones de titanio en las que la estructura del material consiste en una mezcla de fase α y fase β . La aleación Ti-6Al-4V se clasifica dentro de este grupo.

3.3.3.1. Aleaciones α .

Las aleaciones α son las que se forman mediante la adición al titanio de elementos estabilizadores de la fase α , como el aluminio. Estos elementos estabilizadores y otros llamados neutros se disuelven por sustitución en el titanio y elevan su resistencia, pero aumentan su fragilidad. Existe una expresión empírica, llamada de "aluminio equivalente", que indica si la cantidad de aleantes añadidos provocará fragilidad.

$$Al + 1/3 Sn + 1/6 Zr + 10 (O + C + 2N) < 9\% \text{ Ecuación 2}$$

Si dicha expresión excede el valor de 9 % se forma una fase α_2 , ordenada y coherente con la fase α , con una fórmula general Ti_3X y una estructura hexagonal que provoca fragilidad debido a su pobre ductilidad.

Las aleaciones α generalmente contienen una gran cantidad de aluminio, ya que es un elemento α -estabilizador, y que contribuye a la resistencia a la oxidación a altas temperaturas.

Como se trata de aleaciones de una sola fase, no pueden ser tratadas térmicamente a fin de obtener mejoras en sus propiedades mecánicas.

Las únicas aleaciones de estructura totalmente α son los diferentes grados del titanio comercialmente puro (c.p) y la aleación Ti-5Al-2.5Sn.

Titanio comercialmente puro

El titanio comercialmente puro (Ti c.p) está disponible como producto metalúrgico desde los años 50 y se ha utilizado en aplicaciones donde se requiere resistencia mecánica moderada combinada con alta resistencia a la corrosión, buena conformabilidad y soldabilidad.

El Ti c.p está disponible en varias calidades, los cuales tienen diferentes grados de impurezas, tales como el carbón, hidrógeno, hierro, nitrógeno y oxígeno.

Generalmente, el Ti c.p contiene más de 1000 ppm de oxígeno y hierro, nitrógeno, carbón y silicio como principales impurezas. Debido a que cantidades mínimas de impurezas intersticiales afectan mucho a las propiedades mecánicas, no es conveniente diferenciar entre los distintos grados del titanio no aleado en función de su análisis químico. La normativa de la American Society for Testing and Materials¹⁷, clasifica el Titanio Cp en cuatro grados, definidos por la concentración presente de otros elementos, como se muestra en la siguiente tabla.

Esta elevada reactividad del titanio con el oxígeno origina la rápida formación de una capa superficial de óxido.

Los óxidos formados, van desde el TiO hasta el Ti₇O₁₂, cada uno de los cuales muestran una gradación diferente, y para capas delgadas, muestran una superficie multicolorada. Esta capa de óxido, si bien es muy delgada, también es sumamente impermeable.

CLASIFICACIÓN DEL TITANIO SEGÚN LA NORMA ASTM F67						
	Composición (% peso)					
	N	C	O	Fe	H	Ti
Grado 1	0,03	0,10	0,18	0,20	0,0125	bal.
Grado 2	0,03	0,10	0,25	0,30	0,0125	bal.
Grado 3	0,05	0,10	0,35	0,30	0,0125	bal.
Grado 4	0,05	0,10	0,40	0,50	0,0125	bal.

Tabla 13. Clasificación del titanio c.p según la norma ASTM F67.

De esta forma, el metal queda protegido por una capa inerte que lo protege de la corrosión. Esta notable propiedad hace del titanio un material ideal para su uso en ambientes corrosivos.

No obstante, es mejor y más fácil distinguirlos por sus propiedades mecánicas. Así, los cuatro grados de Ti c.p, según la norma ASTM, se agrupan de la siguiente forma:

- *Titanio c.p grado 1*

Éste tiene la mayor pureza, la menor resistencia mecánica y la mejor ductilidad y conformabilidad a temperatura ambiente de los cuatro grados.

El grado 1 suele ser utilizado en los casos en que se requiere la máxima conformabilidad, así como cuando sea preciso rebajar los contenidos de hierro y elementos intersticiales para aumentar la resistencia a la corrosión. En este sentido tiene un comportamiento excelente, desde ambientes altamente oxidantes hasta los que son medianamente reductores, incluyendo los clorados.

- *Titanio c.p grado 2*

Es el más utilizado para las aplicaciones industriales, teniendo un límite elástico mínimo garantizado de 275 MPa, buena ductilidad y conformabilidad. También posee unas buenas propiedades al impacto a bajas temperaturas, así como una excelente resistencia al desgaste y a la corrosión por el agua del mar y atmósferas marinas. Los incrementos de concentración de hierro y

¹⁷ ASTM.

oxígeno en el grado 2, comparados con el grado 1, provocan un aumento de la resistencia a la rotura (345 MPa vs 240MPa) y límite elástico (275 MPa vs 170 MPa) en el grado 2, pero es a expensas de una disminución en la ductilidad (20 % vs 24 %). Los mayores contenidos de hierro y oxígeno también degradan la resistencia a la corrosión en comparación con el grado 1.

- *Titanio c.p grado 3*

Posee una excelente resistencia a la corrosión en ambientes, desde altamente oxidantes hasta medianamente reductores, así como una excelente resistencia específica. Por esto es por lo que este grado, como otras aleaciones de titanio, constituye un puente entre el vacío de diseño que dejan el acero y el aluminio, ya que posee la mayoría de las propiedades más deseables de ambos. Este grado del titanio tiene límites máximos en peso de hierro del 0.3% y un 0.35% de oxígeno.

- *Titanio c.p grado 4*

Posee los valores más altos de resistencia mecánica de los cuatro y además de tener una buena ductilidad y aceptable conformabilidad. Su resistencia a la corrosión fatiga en agua salada es excelente. Posee los contenidos en peso permitidos más elevados de los cuatro grados de oxígeno (0.405 %) y hierro (0.5 %). Aumentar los valores de contenido en hierro o elementos intersticiales se traduce en una reducción en su resistencia a la corrosión.

En la tabla siguiente se resumen las propiedades mecánicas de los cuatro grados del titanio comercialmente puro:

PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS GRADOS DE TITANIO COMERCIALMENTE PURO			
Grado	Resistencia a tracción (MPa)	Límite elástico (MPa)	Elongación (%)
1	240	170	24
2	345	275	20
3	450	380	18
4	550	483	15

Tabla 14. Propiedades mecánicas de los grados ASTM del Ti c.p.

Cabe destacar que cuanto más alto es el valor de la tensión a rotura y del límite elástico, menor es el alargamiento y la ductilidad, por ejemplo, el grado 4 tendrá una ductilidad inferior que la del grado 1, pero no quiere decir que la ductilidad del grado 4 sea mala. Contenidos de hidrógeno de 30-40 ppm pueden fragilizar altamente al titanio comercialmente puro.

Las propiedades mecánicas del titanio también dependen fuertemente de su grado de pureza, como se puede apreciar en las ilustraciones.

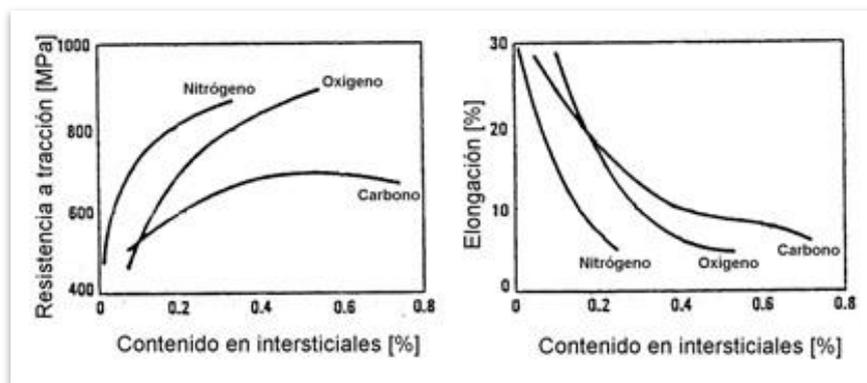


Ilustración 30. Variación de las propiedades mecánicas del Titanio con la concentración de impurezas.

Por ello, las propiedades mecánicas del titanio metal y las del titanio comercialmente puro presentan ciertas diferencias, debidas básicamente a las variaciones de la concentración química de los diferentes.

El titanio comercialmente puro ASTM está disponible en todas las formas posibles de producción y se puede moldear, soldar y trabajar en frío satisfactoriamente. Tienen una estructura α de recocido.

No obstante, sus propiedades mecánicas son limitadas para ciertas aplicaciones y, por ello, su uso como biomaterial se centra en el campo de los implantes y equipamiento odontológico, así como recubrimiento poroso para otras aleaciones de titanio. Es recomendable para la fabricación de tornillos para hueso, placas de osteosíntesis, o para aplicaciones en donde se requieran superficies metálicas en contacto, ya sean de titanio o de otro material.

Una aleación interesante en la fabricación de determinado tipo de implantes es la de titanio y níquel al 50%¹⁸ que presenta memoria de forma, correspondiente al titanio y sus aleaciones, así como del recubrimiento con micro-esferas de Ti de las piezas, con diámetros entre 50 y 200 μm .

Se buscan nuevas técnicas de procesamiento para maximizar las propiedades mecánicas de las aleaciones actuales y lograr que sus superficies tengan texturas adecuadas para inducir la respuesta biológica deseada.

Por ejemplo, está en estudio el desarrollo de microelectrodos para dispositivos neurológicos que resistan la corrosión y en particular, el fenómeno de corrosión bajo tensión¹⁹ inducida por el medio biológico.

También se está prestando atención a las propiedades súper elásticas de aleaciones de níquel y titanio, y al fenómeno de memoria de forma para "stents"²⁰.

Los "stents" son dispositivos tubulares expansibles que se usan en medicina para mantener abiertos a conductos tales como arterias, venas, uretra, tráquea y evitar su colapso.

18 Nitinol.

19 Stress corrosion cracking.

20 Abreviatura científica de la botánica Sydney Margaret Stent (1875-1942).

El término súper elásticos describe la capacidad de algunas aleaciones metálicas de sufrir grandes deformaciones y retornar a la forma original una vez que la fuerza que genera la deformación desaparece.

Por ejemplo, un acero inoxidable común sufre deformaciones elásticas de un 0,5%, mientras que las aleaciones utilizadas en los stents, alcanzan deformaciones de hasta un 11%.

Microestructuras del titanio comercialmente puro

Al igual que en todas las aleaciones monofásicas, la microestructura del Titanio cp depende del trabajado en frío y del proceso de recocido realizado.

Además, si se enfría el material desde temperaturas superiores a la temperatura de β -transus, la microestructura también se ve influenciada por la velocidad de enfriamiento.

Todos estos factores hacen posible la obtención de tres microestructuras diferentes del titanio cp.

- La microestructura equiaxial se obtiene cuando el titanio es trabajado en frío y recocido a temperaturas inferiores a la de β -transus.

El tamaño de grano obtenido tiende a ser reducido ya que el crecimiento de grano se ve inhibido por las relativamente bajas temperaturas de trabajo y por la presencia de impurezas en los límites de grano con efecto de anclaje. También es habitual la presencia de maclas²¹.

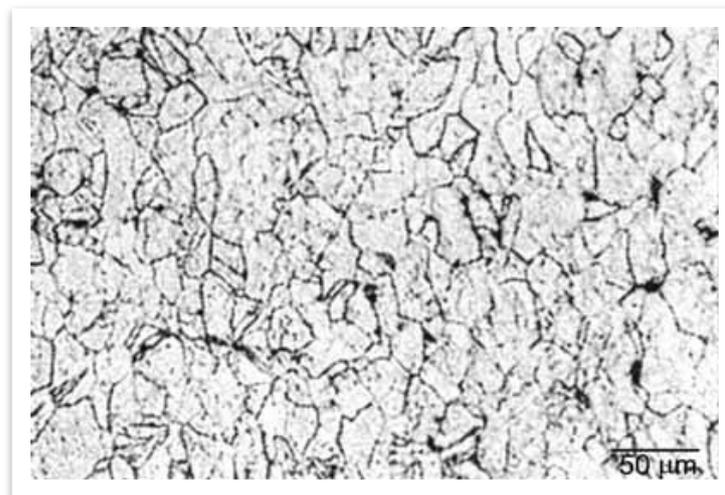


Ilustración 31. Microestructura equiaxial del Titanio Cp de Grado dos.

- Un enfriamiento rápido, desde temperaturas superiores a la temperatura de β -transus producen una microestructura martensítica con celda hexagonal, denominada fase α' , en la que los granos originales de fase β quedan perfectamente delimitados.

²¹ Agrupación simétrica de cristales idénticos.

La martensita se forma por una transformación masiva, por lo que, si bien la densidad de dislocaciones es elevada, casi no hay presencia de maclas.

A diferencia de los aceros, el efecto de endurecimiento producido por la martensita es reducido, debido al gran tamaño de grano y a la inexistencia de supersaturación por átomos intersticiales.

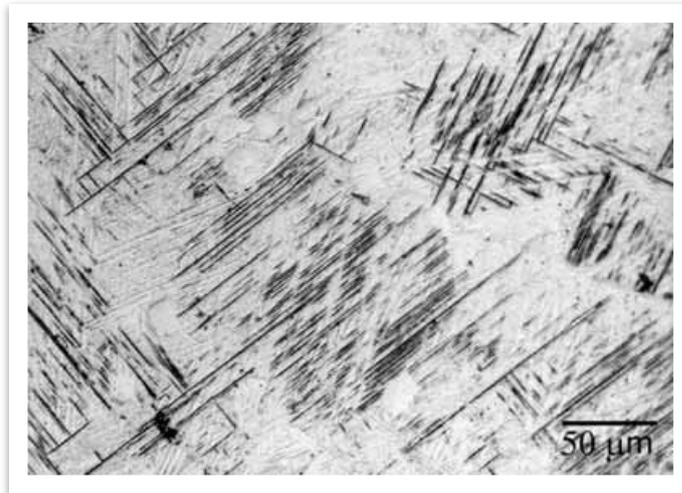


Ilustración 32. Microestructura martensítica del Titanio Cp de Grado dos.

- La tercera microestructura se obtiene por enfriamiento lento desde temperaturas superiores a la de β -transus, por lo que da lugar a que la fase α se forme en forma de placas llamadas Widmanstätten.

En titanio de alta pureza esta estructura se conoce como fase α cerrada, mientras que la presencia de impurezas produce un efecto de placas en forma de cesta.

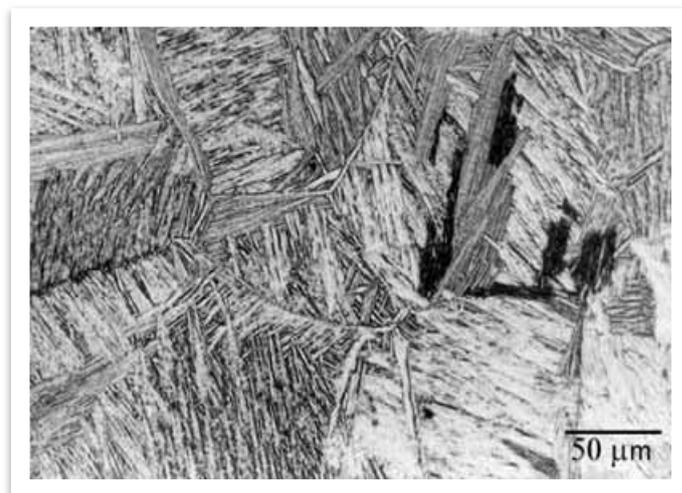


Ilustración 33. Microestructura Widmanstätten del Titanio cp de Grado dos.

3.3.4. Aleaciones casi- α .

Estas aleaciones fueron desarrolladas para permitir trabajar a mayores temperaturas en la sección de compresión de las turbinas de gas de los aviones. Presentan una mayor resistencia a temperatura ambiente que las aleaciones totalmente α y tienen la mayor resistencia a la fluencia de todas las aleaciones de titanio a temperaturas superiores a los 400 °C.

Las aleaciones α se caracterizan por incluir en su composición hasta un 2% de elementos β -estabilizantes. Esto introduce pequeñas cantidades de fase β en la estructura, sin embargo, la cantidad añadida de estos aleantes es normalmente demasiado pequeña para producir un incremento de la dureza mediante la descomposición de la β retenida. La mejora de las propiedades mecánicas se debe a la formación de una fase α' martensítica.

El estaño da mayor resistencia a altas temperaturas, el circonio endurece la fase α , con el molibdeno se obtiene algo de fase α y el silicio mejora la resistencia a la fluencia. Un ejemplo, es la aleación Ti-8Al-1Mo-1V, de menor densidad, más forjable y más soldable.

3.3.5. Aleaciones $\alpha+\beta$.

Las limitaciones que presentan las aleaciones α como su baja resistencia, baja forjabilidad y la fragilidad que presentan si se intenta aumentar su resistencia, dieron lugar al estudio y desarrollo de las aleaciones $\alpha+\beta$. Actualmente, estas son las que presentan una mayor demanda comercial, especialmente la aleación Ti-6Al-4V, que representa más del 50% de las ventas de aleaciones de titanio.

Las aleaciones de sistema $\alpha+\beta$ contienen uno o más α -estabilizadores o elementos solubles en α y uno o más β -estabilizadores, hasta una proporción del 4-6%. Los β -estabilizadores permiten que estas aleaciones retengan fase β tras un enfriamiento rápido desde la zona β o $\alpha+\beta$ dependiendo de la cantidad de fase retenida, de la proporción de elementos β -estabilizantes presentes y del tratamiento térmico empleado.

La aleación de titanio más usada comercialmente es, precisamente, una aleación $\alpha+\beta$ la Ti-6Al-4V, en ella se dedica la mitad de la producción mundial de titanio. Esto se debe al excelente balance entre sus propiedades mecánicas, su resistencia a la corrosión y su buen comportamiento a temperaturas elevadas, debiendo destacarse también su capacidad para ser trabajada mecánicamente y modificar sus propiedades mediante tratamientos térmicos.

En aplicaciones más especializadas, como puntales de soporte de aviones, o piezas de trenes de aterrizaje, se han desarrollado otras aleaciones $\alpha+\beta$ con mayor resistencia (un 30- 40% mayor). Entre estas aleaciones destacan la Ti-6Al-2Sn-4Zr 6Mo. Podemos citar otros ejemplos de aleaciones de este tipo, como la aleación Ti 7Al-4Mo que se usa principalmente como material para hornos. La Ti-6Al-1.7Fe-0.1Si, al contener hierro en lugar de otros aleantes más caros hace que esta aleación sea más barata que las demás.

3.3.6. Aleaciones β .

Si se añaden suficientes aleantes β -estabilizantes al titanio, se puede obtener una estructura totalmente β a temperatura ambiente. Con altas concentraciones de estabilizantes β se puede obtener esta estructura incluso enfriando al aire. Dentro de un cierto rango de contenido de estabilizante β la matriz de fase β retenida a temperatura ambiente es metaestable, y si se calienta por un tiempo a una temperatura por debajo de β -transus, se descompone en la fase α .

Estas características permiten que estas aleaciones tengan una mayor tenacidad a la fractura y permitan la estampación en frío, debido a la estructura más blanda que presentan respecto a las aleaciones con estructura α . También cabe la posibilidad de aumentar la resistencia mediante maduración. La presencia de un alto contenido en aleantes proporciona un alto aumento de la dureza durante la maduración. Los inconvenientes que presentan son la posibilidad de segregación debida a la alta concentración de β -estabilizantes y la elevada densidad de algunas aleaciones.

La primera aleación β con aplicación industrial fue la Ti-13V-11Cr-3Al, empleada en el fuselaje del avión espía SR-71. Esta aleación permite ser tratada con un revenido, enfriada rápidamente y madurada a 480 °C para obtener resistencias a tensión de 1300 MPa. Entre otras aleaciones cabe destacar la Ti-8Mo-8V-2Fe-3Al al tener una gran resistencia.

3.3.7. La aleación Ti-6Al-7Nb.

El Ti-6Al-7Nb es una aleación de titanio ($\alpha+\beta$) que fue desarrollada para la fabricación de prótesis quirúrgicas con el objetivo de lograr una aleación de titanio que poseyera propiedades similares al titanio grado 5 pero sin su contenido de Vanadio. Estudios experimentales avalan la biocompatibilidad de la aleación Ti-6Al-7Nb [91] [92], así como sus buenas características frente a la corrosión [93]y, por tanto, su uso en aplicaciones médicas (cirugía ortopédica, implantes dentales). Desde 1986 se la utiliza en Europa para la fabricación de prótesis de cadera.

COMPOSICIÓN DEL Ti-6Al-7Nb									
Aleación	COMPOSICIÓN (wt %)								
	Al	Nb	Fe	C	O	N	H	Si	Ti
Ti-6Al-7Nb	6.21	7.06	0.13	0.082	0.10	0.031	0.012	0.012	Bal.

Tabla 15. Composición del Ti-6Al-7Nb.

De este material se puede destacar las siguientes características: resistencia a la corrosión, biocompatibilidad, excelente propiedades mecánicas y resistencia a la fatiga, bajo módulo elástico, buena resistencia a la forma y precio aceptable.

La normativa que rige su uso y aplicación se muestra a continuación.

- [ASTM F1295 Standard Specification for Wrought Titanium-6 Aluminum-7 Niobium Alloy for Surgical Implant Applications \(UNS R56700\)](#)
- [ISO 5832-11 Ti-6Al-7Nb wrought](#)

- [UNS R56700 Titanium-6 Aluminum-7 Niobium Alloy](#)

3.4. Aplicaciones del titanio.

3.4.1. Introducción.

Como el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre y el cuarto metal estructural más abundante, la oferta mundial actual de materia prima mineral para producir el titanio es virtualmente ilimitada. La capacidad de fundición y procesamiento del titanio puede acomodar el crecimiento continuo en nuevas aplicaciones de gran volumen.

Además de sus atractivas características de la relación de gran resistencia con densidad para uso aeroespacial, la excepcional resistencia a la corrosión del titanio derivada de su película protectora del óxido, ha motivado una amplia aplicación en biomedicina para implantes biocompatibles, en agua de mar, marina, soluciones salinas y servicios químicos industriales agresivos durante los últimos cincuenta años.

Las aplicaciones aeroespaciales (incluyendo su uso tanto en componentes estructurales como en los motores a reacción) todavía constituyen la mayor aportación en el uso de las aleaciones de titanio. Su alta resistencia específica, resistencia a la fatiga y a la fluencia, así como su alta tenacidad a la fractura son características que hacen del titanio un material idóneo para la industria aeroespacial. Se ha venido utilizando como componentes estructurales de aviones, desde el Boeing 707 hasta satélites espaciales. En lo que se refiere a componentes de los motores a reacción, se fabrican palas de turbinas, discos de ventilación, entre otros componentes.

Otras aplicaciones se han comenzado a explorar recientemente (últimos veinte años), estando alguna en fase de desarrollo, mientras que otras se están usando, consumiendo grandes cantidades de metal. Entre estas aplicaciones se encuentran:

- Aplicaciones donde se requiere una alta resistencia a la corrosión, tales como procesado químico, la industria del papel, aplicaciones marinas, entre otras.
- Aplicaciones biomédicas.
- Industria de la automoción.
- Aplicaciones de consumo, por ejemplo equipamiento deportivo, musicales...

De todas las aplicaciones citadas, me centraré en la biomedicina, ya que es motivo de estudio por parte de la presente Tesis. La utilidad del titanio como material biomédico radica en la falta de reacciones de rechazo por parte de los tejidos del cuerpo humano, debido principalmente a su alta resistencia a la corrosión en el medio fisiológico.

Por lo tanto es importante profundizar en el estudio de este metal, conocer sus propiedades químicas, mecánicas, que estructuras puede tener, conocer sus aleaciones, es decir, caracterizar profundamente el titanio.

3.4.2. Aplicaciones biomédicas.

El titanio y sus aleaciones presentan una destacada resistencia a la corrosión a los fluidos del cuerpo, superior a los aceros inoxidable. Además también posee una alta resistencia a la corrosión bajo tensión, altas propiedades mecánicas y una aceptable tolerancia de los tejidos que lo hace un material idóneo para ser implantado.

Una característica particular del titanio es que es uno de los pocos materiales que no provoca la formación de un tejido fibroso que actúa de barrera cuando el material se coloca en contacto con el hueso sano. Esto permite al hueso crecer y llenar los poros superficiales del implante y obtener una sujeción más firme de la prótesis, por ejemplo en los implantes dentales, y mejorar la regeneración del hueso afectado.

El titanio y sus aleaciones están siendo utilizadas en la construcción de prótesis articulares, prótesis orales y componentes para la fabricación de válvulas cardíacas y componentes de marcapasos. En el campo de la traumatología también se está utilizando en la elaboración de clavos y placas de osteosíntesis para la recuperación de fracturas óseas.

Tipos y especificaciones

La aleación de titanio más empleada en este campo durante los últimos años contiene aluminio y vanadio según la composición: Ti_6Al_4V . El aluminio incrementa la temperatura de la transformación entre las fases alfa y beta. El vanadio disminuye esa temperatura. La aleación puede ser bien soldada y tiene alta tenacidad.

Aparte de esta aleación, existen otras de titanio quirúrgico, empleadas con asiduidad en biomedicina. Estas están clasificadas según las especificaciones de ASTM:

- ASTM B265: placa y lámina: ASTM F1108 Ti_6Al_4V : pieza moldeada para implantes quirúrgicos.
- ASTM B299: esponja: ASTM F1295 Ti_6Al_7 : aleaciones de niobio para aplicaciones de implantes quirúrgicos.
- ASTM B861/B862: tubo: ASTM F1341: alambre de titanio sin aleaciones para aplicaciones de implante quirúrgico.
- ASTM B338: ASTM F136 Ti_6Al_4V : para aplicaciones de implante quirúrgico.
- ASTM B348: barra: ASTM F1472 Ti_6Al_4V : para aplicaciones de implante quirúrgico.
- ASTM B363: conexiones: ASTM F620 Ti_6Al_4V : eli forjados para implantes quirúrgicos.
- ASTM B367: piezas moldeadas: ASTM F67: titanio sin aleaciones para aplicaciones de implante.

3.5. El problema del desgaste en las aleaciones de titanio en aplicaciones biomédicas.

A pesar de las atractivas propiedades que presentan las aleaciones de Titanio, su uso generalizado en aplicaciones de ingeniería se ha visto impedido por la baja resistencia al desgaste que presentan estos materiales.

En el caso de las paliaciones biomédicas, este hecho dificulta su uso en el campo de las prótesis articulares y otras aplicaciones donde el material se ve sometido a fricción. Las causas principalmente citadas de este pobre comportamiento son [94] [95]:

- La configuración electrónica. Cuanto menor es el valor estructural de la capa d electrónica, tanto más activo es el metal y mayor es el coeficiente de fricción. El titanio sólo posee un electrón en la capa electrónica d , lo que lo hace muy activo.
- La cristalografía. Las microestructuras hexagonales generalmente presentan menores coeficientes de fricción y mejores características de fricción que las cúbicas, ya que se deforman plásticamente por deslizamiento en el plano basal de máxima compacidad. Sin embargo, la fase α del titanio posee un ratio c/a de 1587 inferior al ideal (1633), lo que permite deslizamientos en planos prismáticos y piramidales..
- Bajas resistencias a tracción y a esfuerzo cortante. Esto significa que cuando se produce una unión con otros materiales, la fractura se produce más fácilmente en el titanio que en el otro material.
- La capa de óxido que protege al material, formada espontáneamente y de orden nanométrico, es eliminada de la superficie al producirse contacto con otro metal, lo que produce un contacto metal-metal. Este contacto, debido a la alta resistividad del titanio no protegido, puede dar lugar a soldaduras puntuales en frío, con el consiguiente aumento de la fricción.

La problemática no se reduce al hecho de tener un desgaste no deseado en el material, ya que se ha demostrado que el efecto de las partículas de desgaste en la zona de fricción como abrasivo, el efecto como acelerador de la liberación de iones por parte del material y el efecto sobre los tejidos que circundan el material producido por dichas partículas y por los iones liberados, pueden tener consecuencias no deseadas [96] [97].

En los últimos años se ha demostrado que las partículas de desgaste del polietileno de peso molecular ultra-alto (UHMWPE), material habitual para la fabricación de acetábulos en prótesis de cadera, así como las partículas metálicas de desgaste, pueden llegar a producir la llamada “enfermedad de las partículas”: una reacción a un cuerpo extraño por parte de los histocitos²² y la producción de células gigantes multinucleadas, las cuales se hayan relacionadas con una osteólisis²³ progresiva del hueso en torno a la prótesis. Esta cadena de sucesos desemboca en un aflojamiento de la prótesis y la consiguiente necesidad de extracción y recambio de dicha prótesis [98] [99].

El efecto producido por las partículas de desgaste no es uniforme, sino que se halla muy relacionado con el tipo de material, el tamaño de la partícula, la superficie de dicha partícula y su morfología [100] [101].

La evidencia del efecto causado por las partículas de UHMWPE²⁴ en el aflojamiento aséptico de las prótesis ha llevado a cierto número de investigadores y empresas a reconsiderar el uso de prótesis de contacto metal-metal [102].

Los estudios parecen indicar que el efecto más acusado, se debe a las partículas de UHMWPE, y el menor a las partículas de Ti-6Al-4V, dentro de la gama de biomateriales estudiados [99] y [101].

²² Célula grande fagocitaria del sistema reticuloendotelial.

²³ Disolución de los componentes minerales del hueso.

²⁴ Ultra high molecular weight polyethylene.

Los ensayos in vitro existentes [102], así como los análisis más recientes relativos al comportamiento de prótesis de cadera metal-metal tipo Metasul [103], indican que el volumen de desgaste es menor en el caso de un contacto metal-metal que del contacto UHMWPE-metal, o que incluso del par UHMWPE-cerámica.

Dada la excelente biocompatibilidad del titanio y de la aleación Ti-6Al-4V, una opción adecuada para evitar la aparición de la enfermedad de las partículas sería la utilización de estos materiales en contactos metal-metal. Pero como ya se ha comentado, esta posibilidad requiere encontrar una solución a los problemas del desgaste antes indicados. Las posibles soluciones son:

- *Modificación de la estructura efectiva de la capa d, mediante la formación de compuestos.*
- *Modificación de los sistemas de deslizamiento mediante formación de soluciones sólidas.*
- *Incremento de la resistencia del Titanio mediante la adición de aleantes.*
- *Eliminación del Titanio del sistema tribológico²⁵ mediante el recubrimiento con otro material.*

De las posibilidades existentes, básicamente se han estudiado soluciones en la modificación de la superficie de las aleaciones de titanio [104] [105].

Destacan la deposición física en fase vapor, la deposición química en fase vapor, la implantación iónica, el rociado por plasma, tratamientos termoquímicos (difusión gaseosa y deposición por plasma), la aleación con láser o haz de electrones y la aplicación de lubricantes sólidos [106] [107].

La conjunción de las ventajas de disminuir el volumen de desgaste en el contacto metal-metal, junto con la reducción del coeficiente de fricción y del desgaste superficial mediante tratamientos de endurecimiento superficial, incrementan las expectativas del uso de este tipo de prótesis en el caso de pacientes con una esperanza de vida mayor de veinte años.

²⁵ Consta de las superficies de dos componentes que están en contacto móvil entre sí y su entorno.

CAPÍTULO

4

Elementos Biogénicos o Bioelementos

4.1. Generalidades.

Todos los seres vivos están constituidos, cualitativa y cuantitativamente, por elementos químicos que se encuentran en la corteza terrestre. Esto indica que la vida se ha desarrollado a partir de elementos con propiedades físico-químicas acorde con los procesos químicos que se están llevando a cabo en los seres vivos.

Los elementos biogénicos o bioelementos (del griego *bios=vida* y *génesis=origen*) son aquellos elementos químicos que forman parte de la materia viviente [108] [109]. En los seres vivos se pueden encontrar alrededor de setenta elementos químicos diferentes, aunque no todos son indispensables para la vida, ni comunes a todos ellos.

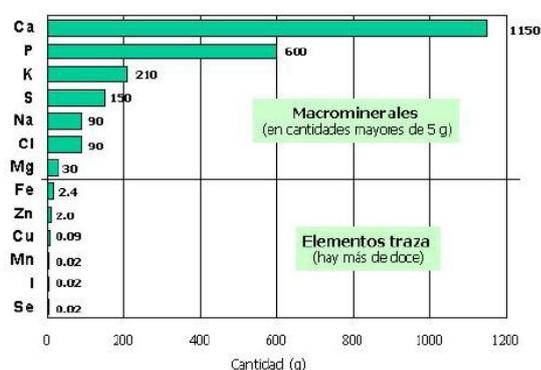


Ilustración 34. Contenido de minerales de un adulto de 70 kg de peso.

Además de los elementos químicos mayoritarios (desde C, H, O, hasta Ca, P, Na, K, y Mg), el cuerpo humano contiene cantidades traza de la mayor parte de los elementos del Sistema Periódico. En la Ilustración 35 se resumen algunos datos sobre contenido total, absorción y excreción de 23 elementos traza; se trata de valores medios correspondientes a mediciones realizadas en diversos órganos, tejidos y líquidos corporales de sujetos de unos 70 Kg de peso corporal [110].

Muchos de estos elementos traza son considerados esenciales para la vida, conservación de la salud y reproducción; se conocen con cierta precisión sus funciones como cofactores enzimáticos o como electrolitos en los líquidos corporales, así como su importancia en los sistemas de transporte de oxígeno o como componentes de macromoléculas que no tienen acción enzimática.

Elemento (orden de abundancia)	Contenido medio en el cuerpo (70Kg)(mg)	Facilidad Absorción dieta (%)	Concentración en plasma (µg/dL)	Órganos de acumulación principal	Ruta de excreción principal
Hierro	3500-4500	5-15	100	Hígado, bazo	Bilis
Flúor	2600-4000	40-100	20-100	Dentadura	Orina
Cinc	1600-2300	31-51	100	Piel, huesos	Páncreas, bilis
Silicio	1100	1-4	500	Piel	-
Plomo	122	5	15-40	Hueso	Bilis
Aluminio	50-150	0.1	13-17	Pulmón	Orina
Cobre	60-80	30-60	100	Hígado	Bilis
Boro	48	99	-	Hueso	Orina
Cadmio	30-38	25	0.1-0.7	Riñón, hígado	Orina
Bario	22	1-15	10-20	¿Piel?	Orina
Selenio	21	35-85	7-30	¿Riñón?	Orina
Germanio	20	Fácil	-	Bazo	Orina
Yodo	10-20	100	2-4	Tiroides	Orina
Estaño	14	2	-	Hígado, bazo, pulmón	Orina
Arsénico	8-20	5	10-64	¿Piel, cabello?	Orina, bilis
Manganeso	12-16	3-4	1-2	Hígado, hueso	Bilis
Molibdeno	9-16	40-100	1-3	¿Hígado?	Orina
Mercurio	13	5-10	0.5-1	Riñón	-
Vanadio	10	0.1-1.5	0.5-2.3	¿Grasa?	Orina
Titanio	9	1-2	-	Pulmón	Orina
Níquel	5-10	3-6	2-4	Piel, hígado	Orina
Cromo	1-5	1	0.15	Bazo, corazón	Orina
Cobalto	1.1-1.5	63-97	0.007-6	Hígado, grasa	Orina

Ilustración 35. Elementos traza presentes en los seres humanos.

La lista de elementos químicos con función biológica ha ido ampliándose progresivamente; ello ha sido posible gracias a la puesta a punto de técnicas adecuadas para realizar análisis en muestras orgánicas (alimentos o tejidos) altamente purificadas, es decir, descontaminadas de elementos químicos procedentes del medio ambiente (de origen extraorgánico); todo lo cual ha permitido, a su vez, estudiar el efecto de deficiencias de elementos traza específicos sobre numerosos aspectos fisiológicos, tanto en animales y plantas como en seres humanos.

Algunos investigadores especialistas en el estudio de la significación biológica de los elementos traza sugieren que, probablemente, todos los elementos del S.P. tienen (o se descubrirá que tienen) alguna función fisiológica. De todas formas, ciertos elementos tales como Cd, Pb y As están ya muy caracterizados por sus propiedades tóxicas y nocivas sobre el metabolismo humano. Puede decirse que con las solas excepciones del Fe y I, la importancia fisiológica de los demás elementos traza presentes en la dieta se está empezando a conocer recientemente. De hecho ciertas alteraciones de determinadas funciones fisiológicas se comienzan a asociar con deficiencias nutricionales de elementos traza específicos; por ejemplo, flúor y caries dental, cromo e intolerancia a la glucosa, cobre e hipercolesterolemia, etc. En este sentido, conviene siempre tener muy en cuenta los efectos de los tratamientos tecnológicos utilizados en la industria alimentaria (refinados, liofilizados, etc.) sobre el contenido de elementos traza (u oligoelementos) que, en última instancia, son consumidos por los individuos, para bien o para mal.

4.2. Clasificación de los elementos biogénicos.

Los bioelementos, según su abundancia en los seres vivos, se clasifican en tres grandes grupos, como se observa en las siguientes ilustraciones:

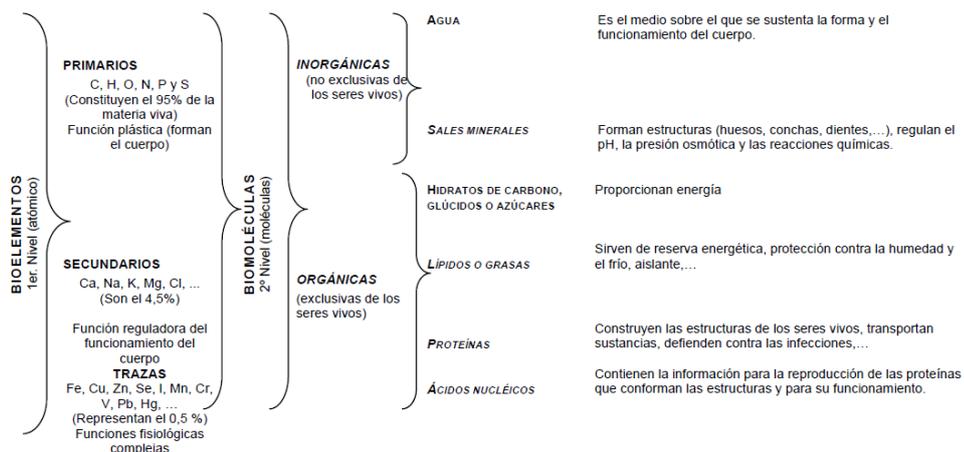


Ilustración 36. Composición química de los seres vivos.

The periodic table highlights bioelements as follows:

- Primary Bioelements (Yellow):** H, C, N, O, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Cs, Ba, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac.
- Secondary Bioelements in all organisms (Blue):** Li, Be, Na, Mg, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Cs, Ba, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac.
- Secondary Bioelements in some organisms (Pink):** B, C, N, O, F, B, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Ar, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Cs, Ba, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac.

Callout box for Zinc (Zn):

- Symbol: Zn
- Atomic Number: 30
- Name: Cinc

Ilustración 37. Tabla Periódica de los elementos químicos.

- **Bioelementos primarios o principales.** Son los elementos mayoritarios de la materia viva y constituyen el 95 % de la masa total de los seres vivos. Pertenecen a este tipo el carbono (C), el oxígeno (O), el hidrógeno (H) y el nitrógeno (N).
- **Bioelementos secundarios.** Son aquellos que se encuentran en una proporción del 4,5% formando parte de todos los seres vivos. Dentro de este grupo se incluyen el azufre (S), el calcio (Ca), el sodio (Na), el potasio (K) y el cloro (Cl).
- **Oligoelementos, micronutrientes o elementos traza.** Son un conjunto de elementos químicos que se encuentran en el organismo en cantidades muy pequeñas (mg/Kg o µg/L). sin embargo, muchos de ellos son nutrientes esenciales ya que desempeñan una serie de funciones indispensables para mantener la vida como el crecimiento o la reproducción normal de las diferentes especies, incluyendo al hombre [111]. Hasta la fecha, se han aislado unos 60 oligoelementos en los seres vivos, aunque únicamente 14 de ellos pueden considerarse comunes a todas las especies. Estos elementos son el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobre (Cu), el cinc (Zn), el flúor (F), el yodo, (I) el boro (B), el silicio (Si), el vanadio (V), el cromo (Cr), el cobalto (Co), el selenio (Se), el litio (Li), el molibdeno (Mo) y el estaño (Sn) [112].

4.3. Oligoelementos, micronutrientes o elementos traza.

4.3.1. Clasificación.

Los oligoelementos se pueden clasificar en función de diversos criterios. Según su frecuencia en el organismo, se clasifican en:

- **Invariables.** Son aquellos elementos que están presentes en todos los seres vivos, en concentraciones muy bajas (menos del 0.005 % del peso corporal). Dentro del grupo destacan el cinc, el cobre, el hierro, el manganeso, el yodo, el selenio, etc.
- **Variables.** Son aquellos elementos que se detectan en unos organismos y en otros no. Sus funciones todavía no son bien conocidas. Se encuentran incluidos en este grupo el litio, el rubidio, el germanio, el estaño, etc.

Según su significación biológica, se clasifican en:

- **Esenciales.** Son los elementos necesarios para mantener la vida. Mertz [113] señaló que cuando su aporte es deficiente determina invariablemente la disminución de una función de óptima a subóptima. Si se administra el elemento en cantidades fisiológicas adecuadas previene o cura esta alteración. Algunos de estos elementos son el cinc, el cobre, el hierro, el manganeso, el yodo, el molibdeno, el fósforo, el níquel, el estaño, el selenio, el silicio y el vanadio, entre otros.
- **Cotizas [114]** indicó que un elemento traza puede ser considerado esencial si cumple los siguientes requisitos:
 - Debe estar presente en todos los tejidos sanos de todos los organismos vivos.
 - Concentración en los tejidos debe ser relativamente constante.
 - Su carencia produce alteraciones ultraestructurales y fisiológicas similares (y/o reproducibles) en las diferentes especies; es decir, que las alteraciones determinadas por la carencia del elemento son independientes de la especie estudiada.

- Su administración, en cantidades adecuadas, debe curar o prevenir estas alteraciones.
 - Las alteraciones o lesiones producidas por la carencia se acompañan de cambios bioquímicos pertinentes y específicos.
 - Estos cambios bioquímicos se deben evitar o corregir, cuando la carencia se previene o se trata.
- Posibles esenciales. Son aquellos elementos cuyas concentraciones y/o funciones todavía no están claramente establecidas, como es el caso del cromo, del níquel o del arsénico; otros que sólo son esenciales para algunas especies como el boro o el bromo y algunos cuya esencialidad aún es objeto de controversia, como es el caso del litio, el cadmio o el estaño.
 - No esenciales. Son elementos que se encuentran en los tejidos vivos en concentraciones variables. Se adquieren del medio ambiente en cantidades que dependen de su concentración en el mismo, de la intensidad y la duración del contacto (tiempo de exposición). Son un reflejo de la interacción del organismo vivo con el medio ambiente. Entre estos cabe mencionar el aluminio, el antimonio, el mercurio, el germanio, el rubidio, la plata, el oro, el plomo, el bismuto, el titanio y el circonio.
 - Tóxicos. La catalogación de algunos elementos como el plomo, el cadmio o el mercurio como tóxicos se justifica para algunos por sus propiedades dañinas o potencialmente perjudiciales a concentraciones relativamente bajas [115].

4.3.2. Toxicidad y biocinética de los elementos.

Todos los elementos traza son tóxicos, o potencialmente tóxicos, si se ingieren o se inhalan en cantidades muy elevadas durante largos periodos de tiempo [116]. La toxicidad de un metal o de sus compuestos, depende de las propiedades físicas y químicas del metal, las cuales difieren de acuerdo a su posición en la tabla periódica y de su carácter electroquímico. En el caso de que un elemento traza se encuentre en exceso en el organismo, se pueden producir:

- Alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares y de los organoides subcelulares.
- Alteraciones en la estructura y en la función de los ácidos nucleicos y de las proteínas.
- Liberación de sustancias, como la histamina.
- Síntesis incrementada de ciertas hormonas.
- Cambios en las actividades enzimáticas tisulares.
- Cambios en la composición electrolítica de los diferentes espacios corporales.

El efecto dosis-dependencia, conocido desde hace años, se presenta en forma de curva con dos máximos [117] [118], como se muestra en el ejemplo para el caso del cinc:

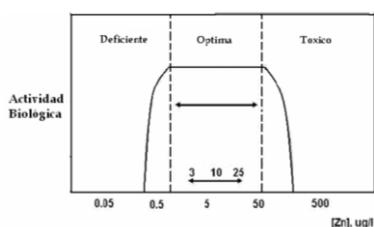


Ilustración 38. Curva dosis-dependencia del cinc.

La primera parte de la curva, que se incrementa, al aumentar las concentraciones del elemento traza hasta alcanzar la meseta, expresa la *acción biológica* del elemento. Por su parte, la meseta indica la suplementación óptima y la función normal; su ancho está determinado por la capacidad homeostática del organismo. Al aumentar más la dosis se produce la *acción farmacológica* del elemento traza. En esta fase, el oligoelemento actúa como un fármaco estimulando o inhibiendo una función determinada. A dosis aún más elevadas aparecen los signos y síntomas de la intoxicación, expresión de la *acción toxicológica* o tóxica del micronutriente. Las dosis a las cuales estas diferentes fases se hacen aparentes, así como el ancho de la meseta, varían ampliamente en los micronutrientes y dependen de la presencia de otros elementos o compuestos en el organismo y de la dieta que se consume.

El organismo posee poderosos mecanismos que mantienen constante la meseta de función óptima en la curva dosis-respuesta biológica, a pesar de los amplios rangos de variación alimentaria y ambiental de estos elementos [119]. Estos mecanismos se ponen en juego cuando la capacidad reguladora de los procesos de absorción y excreción de los elementos traza ha sido vencida. En unión a los mecanismos característicos de regulación del medio interno, la velocidad con que se eliminan los elementos traza del organismo, representa un potente método de monitoreo del control homeostático.

Es un hecho conocido que tanto los aportes carenciales como los excesivos de los elementos traza pueden producir alteraciones metabólicas, que preceden a la aparición de trastornos estructurales o funcionales celulares. En un momento determinado, éstos pueden ser los únicos indicadores reconocibles de la deficiencia de los elementos traza.

4.3.3. Carencia de un oligoelemento.

Se pueden distinguir cuatro fases o periodos en el desarrollo de la carencia de un elemento traza:

- La **fase de agotamiento inicial**, que está determinada por el ingreso inadecuado de un elemento traza y se caracteriza por los cambios en su metabolismo.
- La **fase de deficiencia compensada**, que se caracteriza por el deterioro de las funciones bioquímicas que dependen del oligoelemento, pero sin ningún cambio cuantificable en el nivel y en el metabolismo de los sustratos influenciados por estas funciones. Por ejemplo, los neozelandeses que residen en ambientes pobres en selenio, presentan una actividad reducida de la enzima *glutación-peroxidasa sérica*, pero no muestran signos perceptibles de daño oxidativo debido a otras funciones que no dependen del selenio [120] [121].
- La **fase de deficiencia metabólica**, corresponde a la forma descompensada de la carencia y se caracteriza por cambios notables en los sustratos y en las reacciones metabólicas dependientes de los elementos traza. Es un verdadero peligro para el organismo e incluye la aparición de enfermedades aparentemente no relacionadas con los disturbios metabólicos preexistentes (la carencia de Cr provoca concentraciones elevadas de insulina e intolerancia a la glucosa, la carencia de selenio se considera un factor de riesgo para la aparición del cáncer,...).
- La fase de deficiencia clínica, se caracteriza por el empeoramiento de los trastornos metabólicos y la aparición de lesiones estructurales y funcionales que determinan una enfermedad grave [122].

CAPÍTULO

5

El Aluminio en los Sistemas Biológicos

5.1. Introducción. Breve historia.

El aluminio es un elemento químico, de símbolo Al y número atómico 13. Se trata de un metal no ferroso. Es el tercer elemento más común encontrado en la corteza terrestre, después del oxígeno y sílice. Los compuestos de aluminio forman el 8% de la corteza de la tierra y se encuentran presentes en la mayoría de las rocas, de la vegetación y de los animales. En estado natural se encuentra en muchos silicatos (feldespatos, plagioclasas y micas).

Sin embargo, el aluminio es un elemento muy reactivo y nunca se encuentra en forma de metal en la naturaleza. Generalmente, se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno, sílice y flúor, que se encuentran comúnmente en el suelo, en minerales (por ejemplo zafiros, rubíes, turquesas), rocas (especialmente rocas ígneas) y arcillas. Éstas constituyen formas naturales de aluminio.

Como metal se extrae del mineral conocido con el nombre de bauxita, por transformación primero en alúmina mediante el proceso Bayer y a continuación en aluminio mediante electrólisis.

Este metal posee una combinación de propiedades que lo hacen muy útil en ingeniería mecánica, tales como su baja densidad (2700 kg/m^3) y su alta resistencia a la corrosión. Mediante aleaciones adecuadas se puede aumentar sensiblemente su resistencia mecánica (hasta los 690 MPa). Es buen

conductor de la electricidad, se mecaniza con facilidad y es relativamente barato. Por todo ello es desde mediados del siglo XX²⁶ el metal que más se utiliza después del acero.

Tanto en Grecia como en la Antigua Roma se empleaba el alumbre (del latín *alumen*²⁷), una sal doble de aluminio y potasio como mordiente en tintorería (fijar los colores en los textiles) y astringente en medicina, uso aún en vigor.

Fue en 1807 cuando el inglés *Humphrey Davy* descubrió el aluminio y propuso el nombre *aluminum* para este metal aún no descubierto; más tarde decidió cambiarlo por *aluminium* por coherencia con la mayoría de los nombres de elementos, que usan el sufijo -ium. De éste derivaron los nombres actuales en inglés y en otros idiomas; no obstante, en los EE UU con el tiempo se popularizó el uso de la primera forma, hoy también admitida por la IUPAC aunque se prefiere la otra [123].

En Les Baux, en 1821, el francés *Berthier* encontró la bauxita²⁸, la materia prima de la fabricación de aluminio industrial.

El químico danés *Hans Christian Oersted* aisló el aluminio por primera vez en 1825, de forma impura (contenía niveles de plomo), por medio de un proceso químico que utilizaba una amalgama de potasio y cloruro de aluminio. El principal inconveniente para su obtención reside en la elevada cantidad de energía eléctrica que requiere su producción. Este problema se compensa por su bajo coste de reciclado, su dilatada vida útil y la estabilidad de su precio.

El químico alemán *Friedrich Woehler de Göttingen* fue quien aisló por vez primera partículas de aluminio puro, en 1845, y determinó sus principales propiedades (densidad, conductividad, resistencia a la corrosión, etc.), es decir, entre 1827 y 1845, mejoró el proceso de *Oersted* utilizando potasio metálico y cloruro de aluminio.

Cuando fue descubierto se encontró que era extremadamente difícil su separación de las rocas de las que formaba parte, por lo que durante un tiempo fue considerado un metal precioso, más caro que el oro. A mitad del siglo XIX, en 1854, *Henri Sainte-Claire Deville* obtuvo pequeñas cantidades del metal en Francia reduciendo cloruro de aluminio con sodio basándose en los trabajos de *Oersted* y *Woehler*. Con el apoyo financiero de Napoleón III, *Deville* estableció una planta experimental a gran escala, y en la Exposición Universal de París de 1855 exhibió el aluminio puro junto con las joyas de la corona de Francia y se dijo que Napoleón III había encargado un juego de platos de aluminio para sus más ilustres invitados.

En 1882 el aluminio era considerado un metal de asombrosa rareza del que se producían en todo el mundo menos de 2 toneladas anuales. En 1884 se seleccionó el aluminio como material para realizar el vértice del Monumento a Washington, en una época en que la onza (30 gramos) costaba el equivalente al sueldo diario de los obreros que intervenían en el proyecto [124] y tenía el mismo valor que la plata.

²⁶ Referido al volumen, el aluminio había sobrepasado a finales de 1930 a todos los metales no férreos, pero si se considera en masa, esto tiene lugar hacia finales de la décadas de 1960.

²⁷ Palabra que los romanos designaban a las sustancias con propiedades astringentes.

²⁸ Es el tercer elemento más común en la corteza terrestre.

Sin embargo, con las mejoras de los procesos, los precios bajaron continuamente hasta colapsarse en 1889 tras descubrirse un método sencillo de extracción del metal aluminio. La invención de la dinamo por Siemens en 1866 proporcionó la técnica adecuada para producir la electrólisis del aluminio. En 1886 simultáneamente el norteamericano *Charles Martin Hall* y el francés *Héroult* descubrieron un método más simple para obtener aluminio, método que patentaron ese mismo año (método *Hall-Héroult*), el cual redujo considerablemente los costos de fabricación de este metal y su posterior uso masivo. Dos años más tarde Hall fundó la empresa Pittsburgh Reduction Company, la que en 1907 pasó a llamarse Aluminum Company of America (Alcoa).

El hallazgo de un proceso más simple de extracción del aluminio junto con el proceso Bayer²⁹, permitió que se extendiera su uso hasta hacerse común en multitud de aplicaciones. Sus aplicaciones industriales son relativamente recientes, produciéndose a escala industrial desde finales del siglo XIX. Ello posibilitó que el aluminio pasara a ser un metal común y familiar [125]. Para 1895 su uso como material de construcción estaba tan extendido que había llegado a Sídney, Australia, donde se utilizó en la cúpula del Edificio de la Secretaría.

La producción mundial alcanzó las 6700 toneladas hacia 1900, 700.000 en 1939 y en 1943 llegó a los dos millones debido al impulso de la II Guerra Mundial. Desde entonces la producción se ha disparado hasta superar la de todos los demás metales no férreos.

Desde los inicios de su producción hasta hoy en día, el aluminio ha pasado de ser un costoso metal a convertirse en un producto versátil y de extensa utilización, el cual posee un sin número de propiedades, tales como ser un metal ligero, de buena conductividad, reciclable y muy abundante en la tierra.

Actualmente el proceso ordinario de obtención del metal consta de dos etapas, la obtención de alúmina por el proceso Bayer a partir de la bauxita, y posterior electrólisis del óxido para obtener el aluminio.

La recuperación del metal mediante un proceso de reciclado, a partir de chatarra, materiales viejos o deshechos, era una práctica conocida desde principios del siglo XX. Sin embargo, es a partir de los años 1960 cuando se generaliza, más por razones medioambientales que estrictamente económicas, ya que el reciclaje consume el 5% de lo que consume la producción metalúrgica a partir del mineral.

5.2. Toxicidad.

El aluminio es uno de los metales más ampliamente usados y también uno de los más frecuentemente encontrados en los compuestos de la corteza terrestre. Debido a este hecho, el aluminio es comúnmente conocido como un compuesto inocuo para los seres humanos. Debido a esta suposición se fabricaron de forma masiva utensilios de aluminio para cocinar alimentos, envases para alimentos, y papel de aluminio para el embalaje de alimentos frescos. La toxicidad del aluminio ha sido muy estudiada y actualmente es uno de los elementos que más interesan desde el punto de vista de la especiación. Su impacto sobre los sistemas biológicos ha sido objeto de mucha controversia en las

²⁹ Método, inventado por Karl Bayer en 1889, utilizado para producir óxido de aluminio puro a partir de bauxita.

décadas pasadas y una profusa investigación ha demostrado que puede producir efectos adversos en plantas, animales acuáticos y seres humanos [126], por lo que cada vez se tiene más claro la importancia que presenta este metal sobre los sistemas biológicos.

En las muestras biológicas el aluminio se encuentra únicamente con valencia +3. Las formas de este elemento unido a ligandos orgánicos son mucho menos tóxicas que cuando se encuentra unido a ligandos inorgánicos. Las especies de interés medioambiental del aluminio son: Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})^{4-}$ y $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$.

Esta incorporación se hace con la etapa previa de formación de minerales arcillosos que se transforman en óxidos e hidróxidos de aluminio solubles. Este efecto puede estar, y de hecho lo está, favorecido por la acción antropogénica, así, por ejemplo, el aluminio puede existir en altas concentraciones en los alrededores de zonas donde se producen vertidos de ciertas industrias, refinерías, fundiciones, canteras y minas. Además, las tierras dedicadas a la agricultura tienen la suficiente acidez como para que el 70% de las mismas origine problemas de toxicidad debido a la solubilización del aluminio. En este punto, las lluvias ácidas juegan un papel importantísimo en el proceso de movilización del aluminio desde las rocas hasta la disolución del suelo (zonas vadasas). En efecto, en el medio ambiente el aluminio produce problemas de acidificación, puede acumularse en las plantas y causar problemas de salud a animales que consumen esas plantas. Se ha observado que las cáscaras de los huevos de aves son mucho más finas cuando existe contaminación de este elemento en el medio donde habitan. Algunos estudios han demostrado que el aluminio se encuentra en la nieve formando acuocomplejos o complejos simples con ligandos inorgánicos. En los ríos se encuentra generalmente unido a macromoléculas o en sustancias coloidales.

Debido a que la fracción tóxica del aluminio corresponde a su ión libre y sus acuocomplejos, los métodos analíticos se han encaminado a la discriminación de estos complejos de aluminio con respecto a complejos con sulfato, fluoruro y también con la materia orgánica. Para ello se han estudiado numerosos reactivos coloreados que reaccionan con las distintas especies tóxicas de aluminio para su posterior determinación por espectrofotometría, como por ejemplo el aluminón o hidroxiquinona. Sin embargo, a pesar de que los reactivos que se han probado no reaccionan con los complejos de fluoruro, sí que lo hacen con los complejos de aluminio con sulfato y con materia orgánica, teniendo lugar por tanto errores importantes en la medida de estas especies tóxicas de aluminio mediante espectrofotometría.

Muchos trabajos han relacionado el aluminio como agente etiológico en enfermedades de tipo neurodegenerativo como el Alzheimer, la demencia senil o el Parkinson. Algunos estudios sugieren que tanto la forma como la vía de entrada del aluminio son fundamentales para determinar los efectos que este metal pudiera ocasionar en el organismo. En otros trabajos se señala cómo lo importante no es la forma en la que el aluminio penetra en el organismo, sino la posterior liberación de iones de aluminio libres, es decir, de la biodisponibilidad de este elemento, que está influida por muchos y muy variados parámetros, tanto factores físicos como químicos [127].

La actividad química del aluminio es de vital importancia en los humanos. La especialización del aluminio puede ser considerada como el mecanismo por el cual este metal desata una respuesta biológica. Las distintas formas en las que se puede suministrar el aluminio (citrato, fosfato, cloruro o

hidróxido, entre otros) determinan tanto el destino como la proporción de aluminio que actuará modificando el metabolismo. De esta forma, la toxicidad del metal dependerá de la molécula a la que se halle ligado, y la capacidad tóxica de dicho metal dependerá de la cantidad de aluminio disponible en un determinado órgano o fluido biológico. Tanto es así, que algunos estudios demuestran que, por ejemplo, la ingesta de cerveza con alcohol y a dosis moderada alta, parece influir en la toxicocinética del aluminio presente en la dieta a través de su contenido en silicio, limitando su absorción e incrementando su excreción por vía fecal [128].

Debido a la importancia de la biodisponibilidad del aluminio, se han desarrollado estudios de especiación de este metal en humanos. En estos estudios generalmente se emplea la ultrafiltración, diálisis, filtración con geles, HPLC, etc. Las especies que se estudian en este tipo de muestras son la fracción separada por ultrafiltración, proteínas de aluminio, especies de bajo peso molecular de aluminio y complejos de aluminio con Deferoxamina (DFO), que es un fármaco utilizado para solucionar problemas de exceso de Al. Mediante estudios de este tipo, se ha confirmado que la transferrina es la única proteína que se encuentra unida al aluminio en el hombre.

La exposición al aluminio por lo general no es dañina, pero a altos niveles puede causar serios problemas para la salud. En efecto, la toxicidad del aluminio puede evaluarse desde dos puntos de vista, dependiendo del grado de contaminación. Bajos niveles de aluminio derivados del entorno (agua,...) han sido asociados con demencias seniles (Alzheimer, el Parkinson, la demencia y la esclerosis lateral amiotrófica), mientras que niveles altos de aluminio originados por algún tipo de terapia (diálisis,...) pueden inducir síntomas diferentes y de forma más acusada [129].

Cualquier persona puede intoxicarse con aluminio o sus derivados (ingesta, respiración, contacto dérmico,...), pero algunas personas son más propensas a desarrollar toxicidad por aluminio [130]. La exposición a concentraciones significativas de aluminio puede causar un efecto serio en la salud como daño al sistema nervioso central, demencia, pérdida de la memoria, etc. El aluminio también puede causar problemas en los riñones de los pacientes, cuando entra en el cuerpo durante el proceso de diálisis [131] [132]. Por muchos años ha sido señalado como causante de daños óseos [133] y neurológicos: encefalopatías y enfermedades óseas como la enfermedad adinámica del hueso asociada a baja reconversión y a bajos contenidos de Al, la osteítis fibrosa asociada a la alta reconversión, hipertiroidismo y altos contenidos de Al [134], las patologías respiratorias por exposición al Al [135]. Además, se ha comprobado que el aluminio puede ser potencialmente dañino en pacientes que requieren de forma sistemática tratamientos vía parenteral [136].

Hay muchos factores que determinan si la exposición al aluminio será perjudicial o no, como son la dosis (la cantidad), la duración (por cuánto tiempo) y la manera como entró en contacto con esta sustancia, así como la edad, sexo, dieta, características personales, estilo de vida y condición de salud. La exposición al aluminio se produce principalmente por:

- *Exposición ambiental.* El Al natural se encuentra en el suelo formando parte de la estructura química de los aluminosilicatos presentes en muchos minerales y rocas. Estos compuestos son muy estables y, por lo tanto, insolubles en el medio ambiente natural. La acción combinada de factores atmosféricos promueve cambios físicos y químicos que suscitan la ruptura de las rocas

superficiales. Así se originan minerales arcillosos que luego se transforman en óxidos e hidróxidos de aluminio, más solubles. Por otra parte, debe considerarse que, debido a la acción del hombre, el Al puede existir en altas concentraciones en los alrededores de los sitios donde se desechan residuos de ciertas industrias, refinerías, fundiciones, canteras y minas. Se ha calculado que un 70% de las tierras cultivables tienen suficiente acidez como para ocasionar problemas de toxicidad originada por la solubilización de Al.

El polvo desprendido de los minerales y materiales rocosos es la fuente más grande de partículas portadoras de Al en la atmósfera. Por el contrario, las concentraciones en el agua natural no presentan variaciones importantes, con excepción de aquellas zonas en las que las lluvias ácidas modifican el pH de lagos y aguas subterráneas, provocando aumento en la concentración de Al.

La lluvia ácida constituye un aporte significativo de aluminio al medio ambiente, jugando un papel importantísimo en el proceso de movilización del Al desde las rocas hasta la disolución del suelo (zonas vadosas).

En términos de contaminación ambiental, es importante resaltar que, desechar una lata, significa generar un residuo por 500 años. En cambio, el proceso de reciclado del metal reduce en un 95% la contaminación ambiental generada durante su fabricación y requiere menos del 10% del consumo eléctrico necesario para obtener la misma cantidad de Al a partir de bauxita.

- *Exposición por la dieta.* Es importante resaltar que el aluminio no es un nutriente. Aunque no es un metal pesado, es altamente tóxico para todos los seres vivos. El aluminio está difundido en nuestra agua, en la tierra, en el aire y por lo tanto en pequeñas cantidades, en nuestros alimentos también. Se cree que una persona promedio consume entre 3 y 10 miligramos de aluminio al día. En la actualidad, se sabe que el aluminio se absorbe y se acumula en nuestro cuerpo [137].

Un miligramo por cada kilo de masa corporal a la semana es la cantidad que los expertos de la EFSA (European Food Safety Authority) han establecido como "tolerable" para la ingesta de aluminio a través de la dieta. Tras una evaluación exhaustiva, han determinado un límite semanal en lugar de una ingesta diaria, y advierten de que en algunos casos este límite podría superarse. Así lo demuestran varios estudios realizados en países como Hungría, Alemania, Suecia o Italia, según los cuales los adultos podrían llegar a ingerir entre 0,2 y 1,5 miligramos por cada kilo de masa corporal, y los niños entre 0,7 y 2,3 miligramos [138].

Muchos vegetales incorporan aluminio del suelo en el que son cultivados. Cuando el pH del suelo es menor que 5, este metal es solubilizado en el agua y absorbido por las raíces de las plantas. El contenido de Al en los comestibles es altamente variable debido a su empleo generalizado no sólo en la manufactura sino también durante el almacenamiento en latas y envoltorios. Los alimentos que contribuyen en mayor proporción al aluminio dietario son cereales, quesos procesados y sal, ya que contienen compuestos de Al agregados como aditivos. Durante el procesamiento industrial de conservas de frutas y cerveza se agregan ciertas sales de Al, las que también son componentes habituales de polvos de hornear, conservantes, aditivos y agentes emulsionantes.

La presencia de Al en el agua de bebida deriva de su fuente natural y de los métodos empleados para la potabilización que incluyen una etapa de clarificación química con aluminato de sodio, aluminato de amonio o sulfato de Al. La cantidad del metal que permanece en disolución en el agua de la red urbana depende no sólo de la concentración residual sino también de otras variables regionales como el pH y la coexistencia de otras sustancias. A pesar de que, en

comparación con otras, esta fuente de exposición representa una pequeña proporción de la ingesta diaria de Al (aproximadamente 0.1 mg/L), la presencia de un porcentaje elevado de especies solubles del metal, de bajo peso molecular, químicamente reactivas y, posiblemente, más fácilmente absorbibles, sería responsable de la mayor disponibilidad del catión en ese medio. Esta misma indicación se puede hacer en referencia al agua reutilizada para el riego tras la depuración, si no se eliminan convenientemente los contenidos altos de aluminio, cuando se emplea procesos de coagulación química, este catión se incorpora al suelo agrícola y, de ahí, a las plantas, con lo que tendríamos al aluminio introducido en la cadena trófica. Este mismo problema se produciría en el medio hídrico si el aluminio se vehiculiza hacia los acuíferos de la zona.

Los niveles de aluminio en el aire oscilan generalmente entre 0.005 y 0.18 μg de aluminio por metro cúbico de aire (0.005–0.18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), dependiendo de la localidad, las condiciones climáticas y el nivel de actividad industrial en el área. La mayor parte del aluminio en el aire se encuentra en la forma de pequeñas partículas de polvo suspendidas en el aire. Los niveles de aluminio en áreas urbanas e industriales pueden ser más altos y pueden oscilar entre 0.4 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En general, la cantidad de aluminio que se respira en un día es mucho menor que la que consume en los alimentos.

La gente también se expone al aluminio en medicamentos tales como antiácidos y aspirina con cubierta entérica. Los antiácidos contienen entre 300 y 600 mg de hidróxido de aluminio (aproximadamente 104 a 208 mg de aluminio) en cada tableta o cápsula, o en cada 5 mililitros, en el caso de líquidos. La aspirina con cubierta entérica puede contener 10 a 20 mg de aluminio por tableta.

Las fórmulas infantiles a base de soja contienen niveles de aluminio más altos que las fórmulas a base de leche de vaca o que la leche materna. En fórmulas a base de soja se han detectado concentraciones medias de aluminio entre 0.46 y 0.93 mg/L, mientras que en fórmulas a base de leche de vaca la concentración media oscilan entre 0.058 y 0.15 mg/L. En la leche materna, las concentraciones típicas de aluminio varían entre 0.0092 y 0.049 mg/L.

- *Exposición iatrogénica.* En los pacientes en estado terminal de enfermedad renal, tanto la ingestión de compuestos de Al, prescritos para contrarrestar la hiperfosfatemia, como la hemodiálisis utilizando agua con elevado contenido del metal, han sido asociadas con alteraciones óseas y con la aparición de signos de anemia y demencia. Si bien en la actualidad se tiende a disminuir la concentración de Al en los líquidos de diálisis a través del tratamiento del agua por ósmosis inversa, numerosos pacientes manifiestan aún síntomas de "demencia aluminica". Asimismo, el Al continúa siendo uno de los mayores agentes causantes de alteraciones óseas en estos pacientes. Por otra parte, el riesgo de toxicidad por Al no está limitado a los pacientes con enfermedad renal terminal, ya que otros pacientes con función renal normal, y aún individuos sanos, están expuestos al metal. El motivo principal de esta exposición se halla en el extenso uso del elemento en medicina, en la industria farmacéutica, en la elaboración de vacunas, disoluciones nutritivas, etc.

Entre los medicamentos que contienen Al figuran antiácidos, aspirinas con regulador de pH, suplementos de calcio, productos antidiarreicos y antihemorroidales, muchos de ellos de venta

libre, los cuales son comúnmente usados y pueden contribuir a la severidad de la exposición al metal.

Las vacunas que proveen inmunidad contra difteria, tétanos, hepatitis, rabia y ántrax contienen como adyuvante compuestos de aluminio.

Como contaminante, el catión se encuentra, frecuentemente, en disoluciones intravenosas y parenterales. Las víctimas más vulnerables de la intoxicación aguda con el metal se hallan entre los neonatos prematuros alimentados por vía intravenosa y los pacientes que han sufrido graves quemaduras sometidos a nutrición parenteral.

Aunque mucho se ha avanzado en la identificación del impacto del Al sobre la salud humana, lo concreto es que se desconocen los límites de seguridad para la ingestión oral o administración endovenosa de compuestos de Al, y la circunstancia más preocupante es que tampoco existen pautas indicativas del control del metal en las diferentes fuentes de exposición.

- *Exposición ocupacional.* La exposición a Al es inevitable debido al incremento de su uso en la vida diaria y en las industrias. El riesgo es potencialmente mayor entre ciertos grupos ocupacionales como, por ejemplo, trabajadores de refinerías, fundiciones, canteras, minas, imprentas, concesionarias de automotores, estaciones de servicio y personal involucrado en la fabricación de productos metálicos. La exposición se produce en estos casos por el ingreso del metal a través de la piel o por inhalación de polvos, vapores y humos.
- *Otras fuentes de exposición.* La exposición a Al también puede ser el resultado del uso de compuestos del metal en la manufactura de cosméticos y productos de higiene personal. El lactato de Al es utilizado en cremas dentales para dientes sensibles. El clorhidrato de Al, ampliamente usado en la composición de antitranspirantes, actúa suprimiendo el sudor por formación de un precipitado de hidróxido o desnaturalizando queratina en la capa córnea que rodea los ductos de las glándulas.

5.3. Efectos en el organismo debido a la exposición por aluminio (alteraciones patofisiológicas inducidas por aluminio).

Debido a la abundancia natural del Al y a su creciente utilización, es prácticamente improbable no encontrar trazas de Al en alguna célula de un ser vivo. La biodisponibilidad del metal y, en consecuencia, su toxicidad, se ven influenciadas por la identidad química de la especie reactiva (dependiente del pH del medio) y por la capacidad de otros ligandos para interferir en la esfera de hidratación del ión metálico. El pH fisiológico del entorno celular de los mamíferos oscila levemente alrededor de 7,4. Por lo tanto, los conceptos de biodisponibilidad y toxicidad potencial del Al sólo tienen sentido a la luz del conocimiento del comportamiento químico del metal en soluciones acuosas neutras. En el medio extracelular, el Al forma complejos con especies de bajo peso molecular que poseen átomos de oxígeno donantes de electrones, entre ellas, citrato, hidróxido, fosfato, ADP y ATP. Estos ligandos mantienen en estado soluble al catión en suficiente cantidad y por el tiempo necesario para producir una respuesta tóxica, a nivel celular primero y en todo el organismo luego.

En el caso particular de los seres humanos, dado el extraordinario incremento del uso del Al, es de esperar que la exposición al metal aumente a medida que se eleva el promedio de vida de la población. Debido a la creciente biodisponibilidad del metal y a sus efectos sobre los seres vivos (de los cuales sólo unos pocos han sido mostrados en este artículo), surge la necesidad de investigar los

mecanismos por los cuales el Al es incorporado a diferentes células, modificando su metabolismo y morfología, así como también determinar cuáles son las especies del catión involucradas en tales acciones. Los estudios podrían revelar, en los próximos años, importantes interacciones de este elemento no esencial para el organismo con mecanismos de organización y funcionamiento celular, permitiendo así conformar un panorama más completo de la actividad del Al en los seres vivos. Mientras tanto, conviene evitar o disminuir al mínimo la exposición al metal.

5.3.1. Aluminio y sistema eritropoyético.

Las primeras observaciones que permitieron asociar la sobrecarga de Al con el desarrollo de anemia fueron detectadas en pacientes con encefalopatía dialítica. La anemia fue inducida experimentalmente mediante la administración de compuestos de Al. Cuando ratas y ratones, sin carencia de hierro, fueron sobrecargados oralmente con citrato de Al de forma crónica, los animales mostraron inhibición del desarrollo de células progenitoras eritroides de médula ósea [139]. La observación de que el metal se deposita en el tejido óseo sustenta la hipótesis de un efecto citotóxico local lento sobre células progenitoras eritroides en su nicho habitual de la médula ósea.

Los efectos perjudiciales del Al sobre el sistema eritropoyético trascienden su acción sobre las células inmaduras, manifestándose también en eritrocitos maduros de sangre periférica. Ya en 1929, se reportaron cambios morfológicos en glóbulos rojos de conejos que habían sido sobrecargados con el catión y, recientemente se ha observado por microscopía electrónica de barrido, las alteraciones inducidas por el metal en glóbulos rojos de ratas tratadas crónicamente, a las cuales se les administró citrato de Al en forma oral, así como en glóbulos rojos humanos sometidos a un proceso de envejecimiento *in vitro* en presencia de compuestos de Al [139] [140].

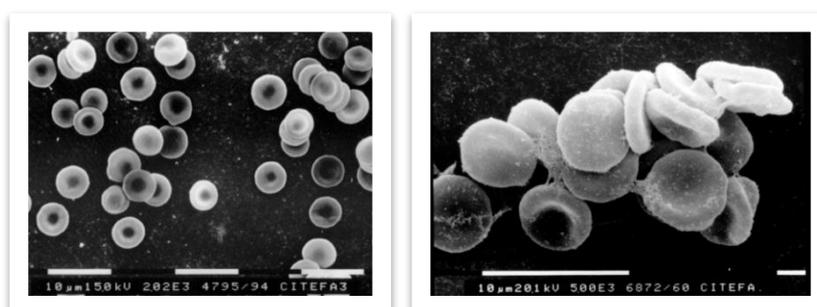


Ilustración 39. Morfología normal de los glóbulos rojos.

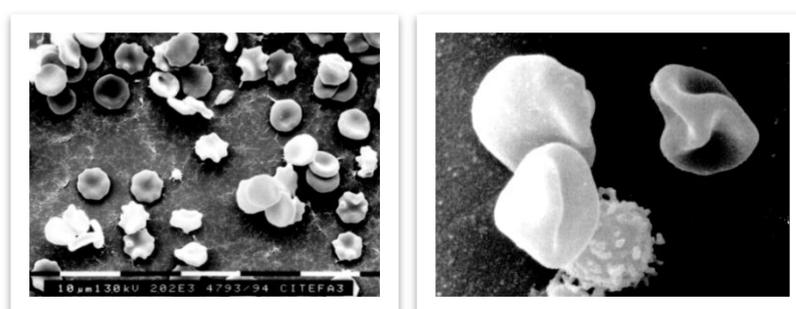


Ilustración 40. Morfología de los glóbulos rojos "in vivo" sometidos a la acción del aluminio.

En vista de las alteraciones hematológicas detectadas, se diseñaron experimentos para determinar los mecanismos mediante los cuales el metal ejerce su toxicidad, observándose una asociación entre alteraciones de la integridad de proteínas de la membrana eritrocitaria y la aparición de anomalías morfológicas [140]. Por otra parte, se ha demostrado que el Al, el cual comparte con el hierro la proteína de transporte transferrina, interfiere con los mecanismos celulares de captación de hierro y con la síntesis de hemoglobina [141] [142].

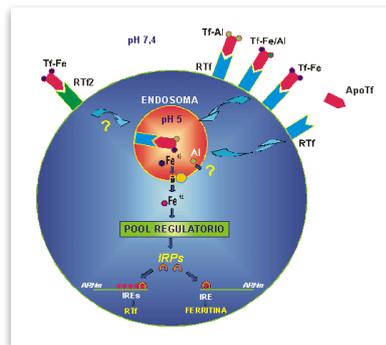


Ilustración 41. Captación de Fe por células de la línea eritroleucémica humana K562 en presencia de Al.

Uno de los mecanismos por los cuales el Fe es incorporado a la célula es mediado por receptores específicos para transferrina (**RTf**, **RTf2**). Una vez en el citoplasma, el Fe^{2+} puede ser almacenado en la ferritina, ser utilizado para la síntesis de proteínas que lo contienen o formar parte de un *pool* regulatorio. Las proteínas **IRP** (*iron regulatory protein*) detectan el contenido celular de Fe y regulan la síntesis de proteínas involucradas en su metabolismo (RTf, ferritina) mediante su interacción con secuencias regulatorias **IRE** (*iron responsive element*) localizadas en los ARNm respectivos.

Los complejos Tf-Al y Tf-Fe compiten por la unión a los RTf. Independientemente de que la Tf transporte Al o Fe, la afinidad de la unión a los RTf no se modifica. En consecuencia, la captación celular de Fe mediada por Tf disminuye en presencia de Al.

Los resultados de diversos estudios sugieren que, una vez en el interior de la célula, el Al interferiría con mecanismos de utilización del Fe y/o de síntesis de hemoglobina.

5.3.2. Aluminio y sistema nervioso.

Actualmente, se considera que el cerebro constituye un sitio importante de acumulación de Al, independientemente de la vía por la cual el mismo ingresa al organismo. Diversas manifestaciones neurológicas en el ser humano han sido atribuidas a la intoxicación por Al: pérdida de la memoria, temblores, depresión de la movilidad motora, pérdida de la curiosidad, ataxia y convulsiones generalizadas con estado epiléptico. Por esta razón, el Al es considerado un elemento neurotóxico. En niños pequeños, la neurotoxicidad se manifiesta por regresión de las aptitudes verbales y motoras.

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales han sugerido una posible conexión entre la neurotoxicidad producida por Al y la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Aunque esta relación todavía es motivo de controversia, no se puede ignorar la participación de la intoxicación aluminica en el desarrollo de severas manifestaciones neurológicas [143].

5.3.3. Aluminio y los líquidos de hemodiálisis.

5.3.3.1. Introducción.

Aunque la toxicidad neurológica del aluminio ya se conocía desde antiguo, pues *Kopeloff y cols* en 1942 obtuvieron un síndrome epileptiforme al aplicar directamente hidróxido de aluminio en tejido cerebral [144] y *Klatzo y cols* desarrollaron en 1965 de forma progresiva una encefalopatía por inyección repetida subaracnoidea de sales de aluminio [145], no es hasta 1976 cuando se empieza a relacionar la presencia de una demencia en dializados con la existencia de acumulación de aluminio en el sistema nervioso central [146].

En efecto, fue *Alfrey y cols* quienes sugieren la hipótesis del origen de esta demencia a partir de unos estudios previos realizados por estos mismos autores en 1972 [147] y por *Berlyne y cols* dos años antes [148]. *Alfrey y cols* publicaron por primera vez en 1972 casos de demencia en dializados que fueron relacionados con los estudios de *Berlyne* sobre niveles séricos anormalmente elevados de pacientes que presentaban insuficiencia renal crónica y que de forma regular tomaban geles de aluminio para disminuir la hiperfosfatemia presente en estos enfermos. Igualmente y como un nuevo aporte a todos estos estudios *Yates y cols* en 1976 publicaron un estudio sobre degeneración neurofibrilar por cloruro de aluminio [149].

Así pues, en pacientes que presentan fallo renal crónico y que por tanto deben sufrir un tratamiento con hemodiálisis se observan niveles anormalmente elevados de aluminio en sangre y tejidos debido a que dichos pacientes están sometidos a un importante nivel de exposición a este metal principalmente debido a la ingestión de antiácidos que contienen aluminio con el fin de disminuir la absorción de fosfatos en el intestino y por ende la hiperfosfatemia, así como y de forma importante en los últimos años, la presencia de niveles de aluminio en el agua para hemodiálisis.

Las tres alteraciones que hoy en día aparecen asociadas íntimamente a la toxicidad por aluminio en pacientes sometidos a hemodiálisis son demencia por diálisis, degeneración ósea y anemia [150] [151] [152] [153] [154] [155] [156] [157] [158].

La primera de ellas es la “demencia por diálisis”, también llamada “encefalopatía por diálisis” [159], y los pacientes que mueren por esta causa presentan con frecuencia niveles elevados de aluminio en tejido y cerebro.

La segunda es una progresiva degeneración ósea conocida con el nombre de “enfermedad del hueso” [160].

Finalmente la tercera lesión observada más recientemente afecta a los glóbulos rojos y es una anemia microcítica que se observa en estos pacientes en presencia de cantidades adecuadas de hierro [160].

5.3.3.2. Toxicidad por aluminio en hemodializados: demencia por diálisis.

La demencia por diálisis o también encefalopatía por diálisis, es una alteración progresiva y normalmente mortal [147] [161] del sistema nervioso central que se presenta en personas dializadas

generalmente un mínimo de 2 años antes de aparecer los primeros síntomas [162] [163] y que se caracteriza por trastornos en el hablar, trastornos del conocimiento y del movimiento [151].

Aparece disartria que inicialmente puede mejorarse con inyecciones de diazepam aunque más tarde se vuelve rebelde también a este fármaco [151].

También aparecen cambios de la personalidad entre los que se incluyen psicosis que terminan en demencia, mioclonía y ataque focales [151].

El trastorno del habla se caracteriza por unos síntomas característicos como balbuceo y tartamudeo que aparecen relativamente pronto y se intensifican en el curso de la enfermedad [164]. La enfermedad suele ser fatal entre los 6 y 9 meses después de aparecer los primeros síntomas [150] [164].

Según *Dennis L. Andress* y *Donald J. Sherrard* en estudios realizados en pacientes con este tipo de demencia, el 90 % de ellos sufrió de trastornos del habla, en el 80 % apareció demencia, trastornos motores en el 75 % y convulsiones entre el 60 y 90 % [150].

El electroencefalograma muestra brotes multifocales de actividad delta con ondas de elevada amplitud en espiga, más prominentes en los lóbulos frontales [164] [165] [166].

Se producen cambios en la personalidad hasta que los pacientes terminan mudos e incapaces de realizar movimientos voluntarios [164].

Etiología de la demencia.

En la actualidad parece bastante probado el origen del aluminio como causa de ciertas demencias. Se han observado niveles elevados de este metal en pacientes que presentaban diferentes patologías como encefalopatía hepática, enfermedad de Alzheimer, cáncer con diversas metástasis y demencia por diálisis [167] [168].

Merece la pena destacar aquí la confusión que en ocasiones se ha producido entre la demencia por diálisis y el mal de Alzheimer o dicho de otra manera, como si la encefalopatía provocada por exceso de aluminio en pacientes dializados produjera mal de Alzheimer.

Sin embargo en la actualidad esto parece estar descartado teniendo en cuenta que si bien en la enfermedad de Alzheimer parece haber niveles elevados de aluminio en el sistema nervioso central [169] [170], los cambios neurofibrilares y las alteraciones bioquímicas son diferentes lo que indicaría una distinta metabolización del aluminio en las dos enfermedades. Igualmente las placas degenerativas que son comunes en la enfermedad de Alzheimer no se han observado en intoxicaciones experimentales de aluminio [169] [170].

El examen por microanálisis con rayos X de los cerebros de pacientes que fallecieron de encefalopatía por diálisis reveló concentraciones muy elevadas en los lisosomas, cosa que se encontró también en los cerebros de ratas inyectadas sistémicamente con cloruro de aluminio [171] [172].

Esto podría ser debido a que en esta enfermedad se vería dificultado el acceso del aluminio al núcleo celular o bien que este metal sería secuestrado rápidamente en compartimentos celulares como los lisosomas nombrados anteriormente, antes de que pudiera alcanzar el núcleo [173].

Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que el contenido en aluminio de las fracciones nucleares y de cromatina de pacientes con enfermedad de Alzheimer eran mayores que los fallecidos por otros desórdenes incluyendo encefalopatía por diálisis [174] [175].

Además hay que indicar que el contenido de aluminio en el cerebro de personas muertas por demencia por diálisis es superior al contenido observado en enfermos de Alzheimer, si bien en este último caso el metal no se localiza principalmente en las neuronas sino más bien en las células gliales y en las paredes de los vasos sanguíneos [150] [176].

En resumen, el aluminio debe ser considerado neurotóxico para los mamíferos, se acumula en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y con demencia por diálisis aunque su localización parece ser diferente. Además el contenido en aluminio de pacientes con demencia por diálisis parece ser superior a la de los enfermos de Alzheimer.

En general niveles por encima de 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso de tejido cerebral seco suelen ser asociados con la encefalopatía por diálisis mientras que niveles por debajo de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ se encuentran dentro de la normalidad [150].

Posibles mecanismos responsables de la demencia por diálisis.

Hoy en día no parece existir ya dudas sobre la responsabilidad de la intoxicación aluminica en este tipo de demencia [177].

Se han postulado diversos mecanismos como causa de la toxicidad del aluminio en el sistema nervioso central. Ya *Alfrey* en 1980 publicó en una revisión de diversos trabajos de investigación que iones tales como el Mg^{2+} , Cu^{2+} o Ca^{2+} eran desplazados por el Al^{3+} de diversos enzimas y de otras proteínas para la función cerebral y que quedaban así inactivadas [178].

Otra causa ya sugerida por *Alfrey y cols* en 1980 y descrita por *Altmann y cols* en 1987 es la inhibición por parte del aluminio de la enzima dihidropteridina reductasa [179] [180]. Esta es una enzima necesaria para el funcionamiento del cerebro debido a que es la responsable de que se alcancen en él las concentraciones adecuadas de tetrahidrobiopterina, sustancia necesaria para la síntesis de neurotransmisores como la tirosina y la acetilcolina.

Altmann y cols encontraron que en pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis los niveles de actividad de la dihidropteridina reductasa en eritrocitos eran menores que los valores esperados correlacionándolos con los niveles de aluminio en plasma.

Aunque los niveles de actividad de la enzima en el cerebro no fueron estudiados, se sugirió que los altos niveles de aluminio en el cerebro deberían conducir a una disminución de la disponibilidad del enzima en dicho órgano. Sin embargo esto todavía se encuentra en discusión.

En cuanto al mecanismo de entrada del aluminio en el cerebro, éste no se conoce todavía. Autores como *López-Hilker y cols* sugieren más recientemente que en el plasma de pacientes dializados el aluminio se encuentra unido a proteínas de alto peso molecular así como a una proteína de bajo peso molecular que podría ser la responsable de la neurotoxicidad [181].

Otros autores como *Farrar y cols* indican que incluso a niveles elevados de aluminio en sangre, la mayor parte del aluminio se encontraría unido a la transferrina [182]. Sin embargo es posible que pacientes con demencia por diálisis tengan menos capacidad de enlazar el metal con la proteína o bien menos transferrina o una mayor densidad de receptores de transferrina. Con todo, hasta la fecha estas cuestiones todavía no se han estudiado suficientemente y constituyen líneas de investigación futura muy interesantes.

Otros autores como *Matsimoto y Joshida* sugieren que el paso al sistema nervioso central se haría no sólo a través de la transferrina sino también por medio de los macrófagos para terminar en el líquido cefalorraquídeo.

Tipos de demencia por diálisis.

A pesar de todo lo dicho y de todos los estudios realizados hasta la fecha, el conocimiento último de la aparición de este síndrome así como los motivos bioquímicos y fisiopatológicos responsables del mismo permanecen bastante oscuros.

Si bien los informes iniciales publicados sobre la demencia por diálisis fueron todos de pacientes que habían sido sometidos a hemodiálisis crónica durante más de 2 años antes de la aparición de los síntomas, a partir de finales de los 80 se descubrió una forma aguda de neurotoxicidad en pacientes urémicos [183] [184] [185] [186]. Este proceso ocurre bajo 3 diferentes condiciones:

- Diálisis realizadas con dializados altamente contaminados con aluminio.
- Administración oral de citratos en asociación con compuestos de aluminio.
- Marcada elevación de los niveles de aluminio en plasma como incluso tras la terapia con deferroxamina.

También se ha observado demencia en niños que no han sufrido diálisis pero que por presentar insuficiencia renal precisaron de tratamiento intravenoso y hospitalización. Tales niños sometidos a este tratamiento pudieron haber adquirido la enfermedad de productos intravenosos contaminados con niveles elevados de sales de aluminio [187] [188]. Esto explicaría la existencia de este síndrome en niños no dializados.

También se ha observado un síndrome similar en niños y adultos con niveles elevados de uremia tratados con medicamentos orales a base de citrato y aluminio [185] [186] [187] [189].

En resumen, la demencia por diálisis probablemente represente el punto final de un proceso de etiología múltiple, aunque cada vez está más confirmado el papel fundamental del aluminio en estos procesos.

La introducción de tratamientos adecuados del agua y la sustitución parcial del aluminio por sales de calcio, si bien han disminuido notablemente este tipo de síndromes, todavía existe un importante

número de individuos con sobrecarga aluminica, como lo demuestra el que durante 1994 fueron diagnosticados de este problema 209 pacientes en España [190].

Este problema es importante porque todavía hoy no existe un tratamiento satisfactorio en pacientes con intoxicación aluminica por diálisis. El uso de deferroxamina (DFO) que en un comienzo se pensó podría ser una importante

solución⁴⁶, está hoy en entredicho como lo demuestra una reciente encuesta en nuestro país relacionada con este asunto⁴⁵, en el que sólo un 45% de los pacientes diagnosticados de intoxicación aluminica reciben tratamiento con DFO. El otro 55% no se tratan con este quelante sino que prefieren emplear soluciones con una muy baja concentración de aluminio.

Además un 11% de los centros que en España emplean DFO informaron haber suspendido en algún momento este tratamiento debido a la aparición de efectos indeseables.

Por último, en los últimos años se está estudiando el empleo de la deferiprona L1 como sustitución de la DFO [191] [192], ya que aquella muestra una mayor capacidad de desplazar al aluminio de las proteínas séricas (80%) frente a la DFO (60%) a concentraciones equivalentes.

5.3.3.3. Osteodistrofia renal o enfermedad del hueso por intoxicación aluminica.

Además de la neuropatía producida por el aluminio en pacientes dializados existe otra patología de interés como es la osteodistrofia renal, problema existente en enfermos sometidos a diálisis periódicas, consecuencia de las alteraciones del metabolismo del calcio-fósforo derivados del fallo renal y del tratamiento con sales de aluminio, precisamente para evitar calcificaciones metastásicas derivadas del uso de sales de calcio como acomplejante del fósforo.

La toxicidad en el esqueleto producida por el aluminio se caracteriza por osteomalacia resistente a la vitamina D, disminución o ausencia de formación del hueso y bajos niveles de hormona paratiroidea (PTH).

Las primeras evidencias de que el aluminio causaba enfermedad ósea en pacientes urémicos dializados surgieron de estudios epidemiológicos en los que se pudo comprobar la asociación de la encefalopatía por diálisis y osteomalacias producidas en pacientes urémicos sometidos a diálisis en los que se empleaba agua con niveles elevados de aluminio [193] [194] [195].

Igualmente está documentada la relación existente entre estas alteraciones y la absorción oral de aluminio [196] [197], por lo que actualmente se tiende a disminuir la dosis oral de compuestos de este metal asociándolos con otros ligantes del fósforo como son los derivados del calcio.

Además de los datos epidemiológicos, se ha podido comprobar experimentalmente en ratas, perros y cerdos [198] [199] cómo la toxicidad ósea del aluminio proviene de un elevado aumento de los niveles de este metal en los huesos, frente a otras osteodistrofias renales de diferente origen. *Danton* y *McClure* encontraron cantidades de 8.2 mg/kg de hueso fresco que llegaban hasta los 51 mg/kg si había osteomalacia [200].

Parece ser que la hormona PTH juega un papel protector de la osteomalacia producida por aluminio. Así, se ha podido comprobar que pacientes con hiperparatiroidismo no desarrollaban osteomalacia incluso cuando eran dializados con productos conteniendo niveles elevados del metal. Además, se ha observado cómo en enfermos dializados a los que se les extirpó el paratiroides por presentar hiperparatiroidismo secundario a lesiones óseas, desarrollaron osteomalacia.

Inversamente, se ha sugerido que un paciente podría desarrollar hiperparatiroidismo tras la terapia de quelación del aluminio en enfermos con osteomalacia.

Sin embargo, en lo que se refiere a la acumulación del aluminio en el cerebro parece ser que un exceso de PTH, junto a la administración oral de este metal conduciría a un mayor aumento de su presencia en la corteza cerebral incluso en ausencia de fallo renal, como parece probado en el caso de ratas a las que se administró exceso de PTH y sales de aluminio.

El diagnóstico de esta complicación de la diálisis se hace en base a una serie de síntomas característicos como dolor de huesos y fracturas principalmente de costillas y cuello del fémur.

Esta enfermedad se confirma tras los análisis óseos donde se pueden apreciar niveles elevados de aluminio especialmente en las zonas de unión entre los osteoblastos y el hueso mineralizado [201], además los niveles de aluminio en plasma están igualmente elevados.

Los mecanismos por los cuales el aluminio causa daño al hueso todavía no están totalmente aclarados, aunque sí se conocen varias causas de daño óseo por parte de este metal. Así por ejemplo, el aluminio se ha utilizado en la industria de cueros por favorecer las uniones entre las fibras de colágeno y en enfermos dializados con lesiones óseas por aluminio se ha visto cómo este metal actuaba precisamente en este sentido.

Por otra parte y puesto que el aluminio se encuentra presente entre las zonas calcificadas y no calcificadas del hueso, esto podría explicar por qué el hueso no se calcifica a pesar de los niveles adecuados de vitamina D y de un elevado producto calcio-fósforo.

Además también se ha demostrado que el aluminio es un potente inhibidor de las fosfatasa y es capaz de depositarse en las mitocondrias de los osteoblastos lo que podría igualmente impedir la formación del hueso.

5.3.3.4. Toxicidad hematológica.

El aluminio también es tóxico para el sistema eritropoyético. En los seres humanos produce una anemia microcítica e hipocrómica que suele ser reversible tras la eliminación del aluminio [202] [203] [204]. Más recientemente se ha podido comprobar cómo el aluminio es capaz de bloquear la respuesta a la eritropoyetina [205].

La acción tóxica del aluminio sobre las células rojas se ha podido evidenciar porque la anemia mejora notablemente tras la supresión del aluminio o su eliminación por quelación [203] [204].

No obstante todos estos datos, debemos decir que los mecanismos específicos de la anemia asociada al aluminio no están todavía suficientemente aclarados. Lo que sí parece, es que el metabolismo del

hierro y del aluminio están muy relacionados, pues como el hierro, el aluminio probablemente también es transportado por la transferrina, lo que indicaría que la inducción de anemia por el aluminio sería debida a la descarga de este metal en aquellos lugares biológicos donde debería depositarse el hierro. Por último, el aluminio también actúa inhibiendo las actividades de la ferroxidasa y la ceruloplasmina, con lo que se ve afectado el metabolismo del hierro en el organismo [206].

5.3.3.5. Prevención de la intoxicación aluminica en pacientes dializados.

Desde que en 1976 *Alfrey* y colaboradores hablan del aluminio como posible agente tóxico en personas sometidas a diálisis [207], las técnicas de control de todo el proceso así como los equipos empleados han mejorado notablemente, consiguiéndose de esta forma una mayor seguridad, rapidez y comodidad en el tratamiento. Y todo ello a pesar del tratamiento extracorpóreo de la sangre y de las manipulaciones propias de esta técnica tanto del personal sanitario, como de los propios enfermos. Según recientes estudios la muerte accidental durante la hemodiálisis es un hecho que ocurre en una proporción de 1 frente a 76138 dializados.

Las principales causas de intoxicación accidental de los pacientes durante la hemodiálisis se producen por sobrecalentamiento del dializado o bien por contaminación química con ácidos, hipoclorito sódico o formaldehído (usado para la limpieza de los dializadores) y cloraminas empleadas para la purificación del agua.

También se han descrito intoxicaciones debidas a sustancias hasta ahora desconocidas procedentes principalmente de los tubos de plástico de los dializadores. Tal es el caso de plastificantes como el dietilhexilftalato que se añade a los tubos de polivinilcloruro para aumentar su flexibilidad a bajas temperaturas y que podrían ir a los líquidos circulantes durante la hemodiálisis.

Todos estos plastificantes son altamente tóxicos, pudiendo producir vasculitis cutánea necrotizante e incluso hepatitis [207].

De forma muy ocasional se han podido producir accidentes debidos a supresión por error de los sistemas de alarma de los equipos con las consiguientes consecuencias de subidas o bajadas importantes de la temperatura del dializado o de la exposición de la sangre a líquidos de hemodiálisis de muy baja o muy alta concentración [207].

Muy rara es también la pérdida de sangre del paciente por malas condiciones de los tubos del dializador [207].

Sin embargo de todos estos casos merece destacarse de forma muy importante la contaminación procedente del agua y de los líquidos de hemodiálisis.

5.3.3.6. Importancia de la cantidad de líquido de hemodiálisis en contacto con el enfermo dializado.

El agua es un vehículo de transporte de numerosos productos que en cantidades anormalmente elevadas pueden dar lugar a importantes intoxicaciones. Tales elementos incluyen moléculas inorgánicas como los fluoruros que se añaden al agua de bebida para prevenir la aparición de caries

pero que podrían producir problemas óseos en pacientes dializados sometidos a elevadas cantidades [207].

Los sulfatos y nitratos son contaminantes procedentes de la combustión y los abonos. Las bacterias pueden convertir los nitratos en nitritos que producirán nitrosaminas cancerígenas al contacto con moléculas conteniendo grupos amino tales como el amoniaco o las proteínas.

Las sustancias orgánicas nitrogenadas pueden también combinarse con el cloro añadido para desinfectar el agua, formando cloraminas capaces de producir hemólisis al entrar en contacto con la sangre.

Componentes habitualmente presentes en importantes cantidades en el organismo como el calcio y magnesio pueden producir, en altas concentraciones en el líquido de hemodiálisis el síndrome del agua dura [207], caracterizado por náuseas, vómitos e hipertensión seguido de letargia, debilidad muscular y síntomas agudos relacionados con el sistema nervioso central que recuerdan a la demencia por diálisis.

Sin embargo tiene especial interés destacar aquí la presencia en el agua de elementos en cantidades trazas habitualmente procedentes de la contaminación industrial y que son potencialmente tóxicos especialmente si se somete al paciente a tratamientos prolongados y por tanto a una elevada exposición.

Entre tales elementos se incluyen el cadmio, mercurio, arsénico, cromo, plomo, plata, níquel, boro, talio, estaño, manganeso, estroncio, vanadio y aluminio [208].

Algunos de estos elementos han sido ya investigados en órganos esenciales como el cerebro, mientras que otros todavía no lo han sido:

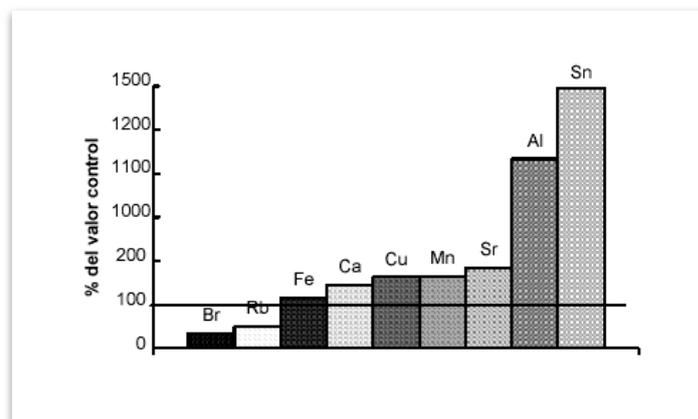


Ilustración 42. Contenido de la corteza cerebral de 9 elementos traza en pacientes con demencia por diálisis. Tomado de A.I. Arieff, Neurological Complications of Uremia. In Diseases of the Kidney, 5th Edition.

Tal es el caso del cadmio, mercurio, níquel, talio, vanadio o boro [207]. Como se observa en la figura, la línea continua (100% de los valores control) representa el valor control para cada elemento. Además del aluminio se encontraron otros ocho elementos traza anormalmente presentes en el tejido cerebral de pacientes con demencia por diálisis.

La medida de la importancia del riesgo potencial del líquido de hemodiálisis en producir intoxicación al paciente, puede suponerse teniendo en cuenta que la diálisis consta de 3.5 a 4 horas de duración por sesión.

Presenta una velocidad de flujo del dializado de 500 a 800 mL/minuto. Esto significa que la sangre del paciente “ve” entre 120 y 190 litros de líquido de hemodiálisis durante una sesión estándar de 4 horas, lo que supone casi 100 veces la ingestión diaria media de agua por individuo [207].

De esta manera, un contaminante presente en este líquido a una concentración de 10 µg/L daría lugar a un total de 1200 a 1800 µg (ó 1.2-1.8 mg) del tóxico en contacto con la sangre por cada sesión. Suponiendo un total de 12 a 18 horas semanales de diálisis y 52 semanas al año, tendremos que la sangre estaría anualmente en contacto con 187.2 a 280.8 mg del producto susceptible de incorporarse al organismo (tejido óseo, cerebro, etc.), pudiendo eventualmente causar toxicidad con el consiguiente aumento del riesgo de muerte o deterioro orgánico del enfermo.

Así pues, en el caso del aluminio, el contenido medio en el cerebro humano es de 230 µg por kg de órgano fresco [209], mientras que en pacientes hemodializados con encefalopatía por diálisis, diversos autores como *Platts* [210] y *Elliot* [211] hablan de 12 veces esa cantidad. Sin embargo posteriormente *Arieff* publicó un estudio realizado sobre 22 pacientes con demencia por diálisis en el que el contenido medio de aluminio fue de 22 mg por kg de peso seco.

Teniendo en cuenta que el peso normal del cerebro humano es de 1500 g y de que un 80% es agua, el peso seco es de unos 300 g, por lo que el contenido en aluminio por kg de órgano fresco fue de unos 7 mg [212], aproximadamente dos veces y media lo estudiado por *Platts* y *Elliot*.

No obstante también hay que indicar que el origen de este exceso de aluminio en cerebro no está totalmente claro, pues algo de aluminio también parece que se absorbe tras la administración oral de antiácidos conteniendo sales de este metal [213] [214].

Además, la retención de aluminio después de la administración oral de sus sales es mayor en pacientes con fallo renal que en sujetos sanos donde la absorción parece ser mínima [213] [214] [215] [216].

De todos modos estas cantidades aparentemente tan elevadas se cubren de sobra con la ingesta diaria media que viene a ser de 10 a 100 mg de este metal [217].

5.3.3.7. Niveles máximos de aluminio admitidos en los líquidos concentrados de hemodiálisis y en el agua para diluirlos.

Como hemos visto hasta ahora, el aluminio en pacientes dializados es un factor de riesgo importante capaz de producir diferentes lesiones en el sistema nervioso central, huesos y sangre principalmente.

Por este motivo, las autoridades sanitarias, los organismos internacionales y las farmacopeas más importantes, empiezan a establecer niveles máximos admitidos de diversos elementos trazas tanto en los líquidos concentrados de hemodiálisis como en el agua que debe emplearse para diluir dichos concentrados. Seguidamente se relacionan los límites oficiales habitualmente más empleados:

Niveles de la association for the advancement of medical instrumentation (AAMI-USA)

Los niveles máximos propuestos por esta asociación americana para el agua utilizada en hemodiálisis son:

CONTAMINANTES	Mg/L	µg/mol
Aluminio	0.010	0.37
Arsénico	0.050	0.70
Bario	0.100	0.70
Cadmio	0.010	0.09
Calcio	10	250.00
Cloraminas	0.100	2.00
Cloro	0.500	7.00
Magnesio	4.000	167.00
Nitratos	2.000	32.00
Plomo	0.050	0.24
Sulfato	100.000	1042.00

Tabla 16. Niveles máximos para el agua utilizada en hemodiálisis.

El aluminio se resalta en negrita, con un nivel máximo admitido de 0.010 mg/L (10 µg/L o ppbs).

Farmacopea americana 1990 (USP XXII)

En la edición de esta farmacopea no figura la monografía del líquido concentrado de hemodiálisis ni el agua para diluirlo.

Farmacopea americana 2000 (USP XXIV)

En esta edición sí que figura una monografía del aluminio dentro del capítulo “Caracteres Generales, donde hace referencia a la determinación del metal por espectroscopía de absorción atómica en aquellas “sustancias destinadas a usarse en hemodiálisis”. No fija los límites e indica que las concentraciones de las disoluciones empleadas deberán ser las adecuadas para que sean adaptables al rango lineal o de trabajo del instrumento”.

Farmacopea británica. Edición 1988.

En esta edición de la Farmacopea Británica aparece la monografía de Soluciones Concentradas de Hemodiálisis donde no se cita nivel alguno de metales en cantidades trazas.

Además figura un Anexo bajo el título “Water for diluting concentrated haemodialysis solutions” donde aunque se indica que se debe prestar particular atención a la posible presencia en el agua de residuos y elementos en cantidades trazas, no aparece ningún nivel máximo admitido. Entre estos elementos se citan especialmente el aluminio, mercurio, estaño, zinc, fluoruros, fosfatos y sulfatos. Igualmente se especifica que será también deseable que el agua esté libre de cloro y ozono.

Sin embargo, se admite que en el caso de que no se disponga de agua recientemente destilada o purificada, podrá utilizarse agua potable en la que se prestará especial atención a los posibles elementos presentes en cantidades trazas.

Merece la pena destacar este aspecto, pues los niveles máximos admitidos para aquellos elementos habitualmente presentes en muy pequeñas cantidades como pueda ser el aluminio, aunque para el consumo de bebida habitual no presentan ningún peligro, son muy elevados frente a las características de calidad que se exigen hoy en día para los concentrados de hemodiálisis y para el agua empleada en su dilución.

En efecto, en la legislación española [218] se especifica como Nivel Guía para el aluminio en aguas potables de consumo público 50 ppbs y como concentración máxima admisible 200 ppbs. Es decir, 5 y 20 veces respectivamente la cantidad máxima que actualmente se admite como contenido máximo de aluminio en el agua para diluir soluciones concentradas de hemodiálisis y cuyo valor máximo admitido es de 10 ppbs.

Farmacopea británica. Edición 1993.

En esta edición ya se refleja el problema de la intoxicación alumínica por diálisis pues en las monografías de ese año acerca de las soluciones concentradas de hemodiálisis y del agua precisa para su dilución, se recogen niveles máximos admisibles.

Así pues, la cantidad máxima de aluminio admitida en los concentrados de hemodiálisis es de 100 ppbs, mientras que en el agua para diluir estos concentrados se especifican 10 ppbs, cosa lógica teniendo en cuenta que la proporción de este agua en los tratamientos de hemodiálisis es muy superior a la del concentrado.

En el addendum de 1995, aparecen nuevas monografías para los líquidos concentrados y para el agua para hemodiálisis, pero en ambas los niveles máximos admitidos son los mismos que en 1993.

Farmacopea francesa 10ª edición.

La última monografía referente al líquido para hemodiálisis es de 1989 y en ella se fijan los niveles máximos de aluminio en estos preparados, que no deberán exceder de 100 ppbs.

En el caso del agua para diluir soluciones concentradas de hemodiálisis, debemos decir que hasta el suplemento de enero de 1989, los niveles máximos fijados de aluminio eran de 30 ppbs, sin embargo en la revisión de enero de 1993 los niveles se reducen a 10 ppbs igualándose al resto de las farmacopeas que estamos comentando.

Farmacopea europea 2ª edición.

Esta farmacopea incluye tanto en su edición de 1988 como en su revisión de 1991 una monografía de "Solutiones Ad Haemodialysum" en donde se hace referencia a que el agua para diluir las disoluciones concentradas deberá ser "agua de calidad apropiada".

Sin embargo, al describir las características que deben reunir las disoluciones concentradas para hemodiálisis, no figura el aluminio ni ningún otro metal traza y por tanto no designa niveles máximos admitidos de este elemento en estas preparaciones.

Por el contrario, en la monografía de “Agua para diluir disoluciones concentradas para hemodiálisis” aparecida en esta farmacopea en su revisión de 1992, sí se fija ya un nivel máximo de aluminio y de otros metales y no metales que pudieran estar presentes en este agua, así como ensayos específicos para todos ellos.

En el caso del aluminio, esta cantidad máxima admitida es de 10 ppbs que es el nivel que actualmente se exige en el agua empleada tanto para preparar los concentrados como para diluirlos.

Farmacopea europea 3ª edición.

En la Farmacopea Europea 3ª Edición (1997), aparece una modificación de la monografía “Soluciones Ad Haemodialysum” de 1992, donde ya se indica que el nivel máximo de aluminio admitido para estas disoluciones concentradas es de 100 ppbs. La monografía correspondiente al Agua Para Diluir Líquidos Concentrados De Hemodiálisis, fija los mismos límites (10 ppbs) que en la 2ª Edición.

Finalmente indicar que en la monografía “Soluciones para Hemofiltración” presente en la BP 93 y en la Farmacopea Europea 3ª Edición (1997), el límite máximo admitido de aluminio es de 10 ppbs.

Real farmacopea española 1997.

En esta Farmacopea, la monografía 0128 (pag. 1064) Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis, fija un nivel máximo de 100 ppbs (100µg/mL) y en la monografía 1167 (pag. 375) Agua para Dilución de Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis, el nivel máximo admitido de aluminio es de 10 ppbs.

En el Suplemento 2000 de esta Farmacopea, el nivel máximo fijado para el aluminio en las revisiones de ambas monografías es el mismo, 100 ppbs para las Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis (pag. 2051 del Suplemento) y 10 ppbs para el Agua para Dilución de Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis (pag. 1896 del Suplemento).

CAPÍTULO

6

Bibliografía

1. *Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits.* **DAHLIN, C., et al.** 1989, Int-J-Oral-MaxillofacImplant, pp. 19-25.
2. *Effects of drill cooling and bone structure on IMZ implant fixation.* **HAIDER, R., WATZEK, G. and PLENK, H.** 1993, Int J Oral Maxillofac Implants, pp. 83-91.
3. *The advantages of coated titanium implants prepared by radiofrequency sputtering from hydroxyapatite.* **COOLEY, D. R., et al.** 1992, J Prosthet Dent, pp. 93-100.
4. *Comparative implant research in dogs: A prosthodontic model.* **PARR, G. R., et al.** 1992, J Prosthet Dent, pp. 509-514.
5. **GETTY, R. Sisson & Grosman and Tomo II, 5.** *Anatomía de los animales domésticos.* 5ª Edición. s.l. : W.B. Saunders, 1999. Vol. II.
6. *Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants.* **LYNCH, S. E., et al.** 1991, J Periodontol , pp. 710-716.
7. *Evaluation of titanium dental implant osseointegration in posterior edentulous areas of micro swine.* **HALE, T. M., et al.** 1991, J. Oral. Implantol, pp. 118-124.
8. *Osseointegration and its experimental background.* **BRÄNEMARK, P.** 1983, J Prosthet Dent , Vol. 50, pp. 399-410.

9. **Materiales implantarios de uso más frecuente en el territorio oro-maxilo-facial. SANTAMARÍA, J., MARTÍNEZ, R. and GOIRIENA, F. J.** 1989, RevEur-Odontoestomatol., Vol. 2, pp. 101-104.
10. **Bone repair in implant models: a review with emphasis on the harvest chamber for bone regeneration studies. ALBREKTSSON, T., et al.** 1989, Int-JOral-Maxillofac-Implants, Vol. 4, pp. 45-54.
11. **Evaluation of titanium dental implant osseointegration in posterior edentulous areas of micro swine. HALE, T. M., et al.** 1991, J. Oral. Implantol., Vol. 17, pp. 118-124.
12. **The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. XIANG, W., et al.** 1993, J Oral Maxillofac Surg, Vol. 51, pp. 647-651.
13. **Maxillary and mandibular titanium implants 1 year after surgery: histologic examination in a cadaver. ROHRER, M. D., BULARD, R. A. and PATTERSON, M. K.** 1995, Int J Oral Maxillofac Implants , Vol. 10, pp. 466-473.
14. **Comparative study of hydroxyapatite and titanium dental implants in dogs. KOHRI, M., et al.** 1990, J Oral Maxillofac Surg, Vol. 48, pp. 1265-1273.
15. **Technique for press-fit implants. GOLEC, T.S.** 1990, JADA, Vol. 121, pp. 409-412.
16. **In-vivo comparisons of clot formation on titanium and hydroxyapatite-coated titanium. STEINBERG, A. D., WILLEY, R. and DRUMMOND, J. L.** 1992, J Periodontol, Vol. 63, pp. 990-994.
17. **Regí, María Vallet. Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos.** Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid : s.n., 2000.
18. http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil_ginebra_planell-es. [Online]
19. **Cameron L., John R., y Skofronick J.G. Medical Physics.** s.l. : Ed. John Wiley & Son, 1978.
20. **Paschoal A.L., Vanâncio E.C., Franceschini Canale L.C., Lopes da Silva O., Huerta-Vilca D., and Motheo A.J.** 2005, Artificial Organ, Vol. 27, p. 461.
21. **A. Norlin, J. Pan and C. Leygraf, J.** 2005, Electrochem. Soc, p. 7.
22. **Cyster L.A., Grant D.M., Parker K.G. and Parker T.L.** 2002, Biomolecular Engineering, Vol. 19, p. 171.
23. **Mechanisms of spinal cord stimulation in painful syndromes: role of animal models. Linderoth B, Foreman RD.** 2006, Pain Med, Vol. 7, pp. S14-26.
24. **Martínez Rodríguez, E., Paz Jiménez, J. Biomateriales en cirugía.** Universidad de Oviedo. s.l. : Servicio de Publicaciones, 1998.
25. **Webster, J.G., Cook A.M., Tompkins W., comps. Electronic devices for rehabilitation.** Gran Bretaña : G. C. Vanderheiden, Chapman and Hall Medica, 1985.

26. **Marion J., Jerry B.** *General physics with bioscience essays*. s.l. : John Wiley & Son Inc, 1978.
27. **Hoening, Stuart A., Daphne H., Scout N.** *Aparatos médicos eléctricos*. México : Ed. limusa, 1981.
28. **Seagrave, R.C.** *Biomedical applications of heat and mass transfer*. Iowa : Iowa State U. P, 1971.
29. **Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons.** *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2004.
30. **Clynes, M., y Milsum J.H.** *Biomedical engineering systems*. Nueva York : McGraw-Hill, 1970.
31. *A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal – results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits.* **Peuster M., Wohlsein P., Brüggmann M., Ehlerding M., Seidler K. and Fink C. et al.** 2001, *Heart*, Vol. 86, pp. 563–569.
32. *Are resorbable implants about to become a reality?* **Peuster M., Beerbaum P., Bach F.W. and Hauser H.** 2006, *cardiol in the young*, Vol. 16, pp. 107–116.
33. *Control of smooth muscle cell proliferation by ferrous iron.* **Mueller P.P., May T., Perz A., Hauser H. and Peuster, M.** 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2193–2200.
34. *Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta.* **Peuster M., Hesse C., Schloo T., Fink C., Beerbaum P. and Schnakenburg C.V.** 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 4955–4962.
35. <http://www.opti.org/PDFS/SECTORIALES/BioMaterialesCompleto.pdf>. [Online]
36. **Kokubo T., Kim H. M., Kawashita M., Nakamura T., Mater J.** 2004, *Sci Mat. Med*, p. 99.
37. **Souto R.M., Burnstein G.T., Mater J.** 1996, *Sci: Mater. Med.*, Vol. 7, p. 337.
38. **Kokubo T., Miyaji F., Kim H.K., Am J.** 1996, *Ceram. Soc.*, Vol. 79, p. 1127.
39. **D.F., Williams.** *Materials science and technology*. New York : Editado por R. W. Cahn, Weinheim, 1992. Vol. 14.
40. **D.I., Bardos.** *Handbook of stainless steels*. Nueva York : Ed D. Peckner e I.M. Bernstein. MCGraw-Hill, 1977.
41. *Development of degradable Fe-35Mn Alloy for biomedical application.* **Hermawan H., Dubé D. and Mantovani D.** 2007, *Adv Mater Res*, pp. 107–112.
42. *Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology?* **Heublein B., Rohde R., Kaese V., Niemeyer M., Hartung W. and Haverich A.** 2003, *Heart*, Vol. 89, pp. 651–656.
43. *In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response.* **Witte F., Kaese V., Switzer H., Meyer-Lindenberg A., Wirth C.J. and Windhag H.** 2005, *Biomaterials*, Vol. 26.

44. *Influence of heat treatment on degradation behavior of bio-degradable die-cast AZ63 magnesium alloy in simulated body fluid.* Liu C.L., Xin Y.C., Tang G.Y. and Chu P.K. 2007, Mater Sci Eng A, pp. 350–357.

45. *In vitro degradation and mechanical integrity of calcium-containing magnesium alloys in modified-simulated body fluid.* R.K.S., Kannan M.B. and Raman. 2008, Biomaterials, Vol. 29, pp. 2306–2314.

46. **A, Agulyansky.** *Chemistry of tantalum and niobium fluoride compounds.* 2004. pp. 1-10.

47. *The quantitative separation and determination of tantalum and niobium using anion exchange chromatography.* Cabell M. J., Milner I. 2001, Analytica Chimica Acta, Vol. 13, pp. 258-267.

48. *Extraction of niobium and tantalum from hydrofluoric acid solutions with diantipyrylmethans.* R., Caletka. 1981, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, Vol. 43, pp. 1619-1624.

49. *Professor Sir John Charnley.* B.M, Wroblewski. s.l. : Heberden Historical, Series editor, 2002, Rheumatology, pp. 824-825.

50. **W.T, Stillwell.** *A history of hip replacement surgery.* New York : Ed. Springer, 1999. pp. IX-XII.

51. *Survival of lubinus straight and curve total hip prostheses in 543 patients after 4-13 years.* Savilahti S., Myllyneva I., Pajanaki K.J., Lindholm Y.S . 1997, Arch. Orthop. Trauma Surg., Vol. 116, pp. 10-13.

52. *Stanmore compared with Charnley total hip replacement: a prospective study of 413 arthroplasties.* Marston R.A., Cobb A.G., Bentley G. 1996, J.Bone Jt. Surg., pp. 178-184.

53. *Long term results of Charnley total hip replacement. Review of 92 patients at 15 to 20 years.* Neumann L., Freund K.G., Sorenson H.K. 1994, J.Bone Jt. Surg., Vols. 76-B, pp. 245-251.

54. **Van Blitterswijk C.A., Grote J.J., Kuijpers W., Daems W.T., De Groot K.A.** 1986, Biomaterials, Vol. 7, p. 553.

55. *Exposure of plasma proteins on Dacron and ePTFE vascular graft material in a perfusion mode.* Falkenback D, Lundberg F, Ribbe E, Ljungh A. 2000, Eur J Vasc Endovasc Surg, Vol. 19, pp. 468-475.

56. *Small diameter polyurethane-polydimethylsiloxane vascular prostheses made by spraying, phase-inversion process.* Soldani G, Panol G, Sassen HF, Goddar MB, Galletti PM. 1993, J Mat Sci Mat Med, pp. 106-113.

57. **Pedro Vera, Juan V. Hoyos, Justo Nieto.** *Biomecánica del Aparato Locomotor. Fundamentos.* Valencia : Martín Impresores , 1985.

58. *Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products.* STM F2150-02e1 .

59. **De Palacios J., Hernández C., Olaguibel J., Rohde M., Fernández M.** *Bases biomecánicas y metalúrgicas de los implantes utilizados en cirugía ortopédica y traumatología.* Londres : Editorial Garsi, 1979.

60. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. **J., Black**. Nueva York, EEUU : Marcel Dekker INC., 1992. ISBN 0-8247-8439-1.
61. *Corrosion resistance and biocompatibility of physical vapour deposition coatings for dental applications*. **H., Brauner**. 1993, Surface and coatings technology, Vol. 62, pp. 618-625.
62. **D.F., Williams**. *Toxicology of implanted metals, Fundamental aspects of biocompatibility*. Boca Raton, USA : Ed. CRC Press Inc., 1981. pp. 45-61.
63. *Metal ion release from metal implants*. **T., Hanawa**. 2004, Mater Sci Eng, pp. 745–752.
64. *In vitro and in vivo biocompatibility testing of absorbable metal stents*. **Loos A., Rohde R. and Haverich Barlach A.** 2007, Macromol Symp , Vol. 253, pp. 103–108.
65. **Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons**. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2004. p. p.37.
66. **Coca Cebollero P., Rosique Jiménez J.** *Ciencia de materiales. Teoría – Ensayos - Tratamientos*. Madrid : Ediciones Pirámide, S.A. , 1985.
67. *Standard practice for polarized light detection of flaws in aerospace. Transparency heating elements*. s.l. : ASTM F319-91a, 2003.
68. **S, Hobo, E, Ichida and L.T., Garcia**. *Osteointegración y rehabilitación oclusal*. Suecia : s.n., 1995.
69. *A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro*. **Keeting P.E., Oursler M.J., Wiegand K.E., Bonde S.K., Spelsberg T.C. and Riggs B.L., Zeolite V.** 1992, J Bone Miner Res, Vol. 7, pp. 1281–1289.
70. *Hampson orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro*. **Reffit D.M., Ogston N., Jugdaohsingh R., Cheungb H.F.J., Evansc B.A.J. and Thompsona R.P.H. et al.** Bone, Vol. 32, p. 127.
71. **Hobo S., Ichida E., García L.T.** *Osteointegración y rehabilitación oclusa*. Tokio, Japón : Editado por Quintessence Publishing Co., 1997.
72. **Sohwenk, Von Beckmann W. y.** *Handbook of cathodic protection*. s.l. : Portcullis Press, Redhill Surrey, 1975.
73. **Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P. and Huang N.** 2002, Mater. Sci. Eng. , Vol. 36, pp. 143–206.
74. **D., Rodríguez-Rius**. *Ph.D. Dissertation*. Universitat Politècnica de Catalunya. España : s.n., 2000.
75. *Thin solid films*. **Leng Y.X., Chen J.Y., Zeng Z.M., Tian X.A., Yang P., Huang N., Zhou Z.R. and Chu P.K.** 2000, pp. 377–378/573–577.
76. **Fouquet V., Pichon L., Drouet M. and Straboni A.** 2004, Appl. Surf. Sci. , Vol. 221, pp. 248–258.

77. **Mändl S., Sader R., Thorwarth G., Krause D., Zeilhofer H.F., Horch H.H. and Rauschenbach B.** 2002, *Biomol. Eng.*, Vol. 19, pp. 129–132.
78. *Final Project Report, Phase 1.* Materials Technology Institute of the Chemical Process Industries. 2003. ASTM Strength Revision Project 151-02.
79. **P.K, Chu, J.Y, Chen and N., Wang L.P and Huang.** 2002, *Mater. Sci. Eng R*, pp. 143-206.
80. **G, Welsh, R, Boyer and E.W., Collins.** *Material properties handbook: Titanium alloys.* [ed.] ASM. Ohio : s.n., 1994.
81. **I.J., Polmear.** *Light alloys, metallurgy of the light metals.* 3rd edition. s.l. : Ed. Arnold, 1995. pp. 248-314.
82. *Journal of dental education.* **B.E., Balkin.** 1988, Vol. 52, p. 683.
83. **T.D.** *“Journal of the california dental association.* 1987.
84. *Biomaterials for dental surgical implants.* **J.E., Lemons.** 1993, *Materials Technology*, Vol. 8, pp. 22-25 .
85. *Light alloys, metallurgy of the light metals (3rd edition).* **I.J., Polmear.** Great Britain : ed. Arnold, 1995, pp. 248-314. ISBN 0-340-63207-0.
86. *All at sea with titanium: its role in offshore applications.* **D., Peacock.** 1996, *Materials World*, Vol. 12, pp. 696-698.
87. *Use of a titanium nitride for electrochemical inactivation of marine-bacteria.* **Nakayama T., Wake H., Ozawa K., Kodama H., Nakamura N., Matsunaga T.** 1998, *Environmental Science & Technology*, Vol. 32, pp. 798-801.
88. **Kubli j., Luckey T.** *Titanium alloys in surgical implants.* USA : s.n., 1983. ASTM STP 796.
89. *Titanium: a technical guide.* **M., Donachie.** Ohio, USA : ASM, 1989. ISBN 0-87170-309-2.
90. *Material properties handbook: Titanium alloys.* **Welsh G., Boyer R., Collins E.W.** Ohio, EE.UU. : ASM, 1994.
91. *Human fibroblast reactions to standard and electropolished titanium and Ti–6Al–7Nb, and electropolished stainless steel.* **D. Osian Meredith, Lukas Eschbach, Mairead A. Wood, Mathis O. Riehle, Adam S.G. Curtis, R. Geoffrey Richards.** 2005, Wiley InterScience.
92. *In Vitro and In Vivo Biocompatibility Testing of Ti-6Al-7Nb Alloy with and without Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating.* **I. C. Lavos-Valereto, S. Woly nec, M. C. Z. Deboni, B. König, Jr.** s.l. : John, 2001, Inc. J Biomed Mater Res (Appl Biomater), Vol. 58, pp. 727-733.
93. *Microvascular response of striated muscle to common arthroplasty-alloys: A comparative in vivo study with CoCrMo, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb.* **Clayton N. Kraft, Björn Burian, Oliver Diedrich, Jan**

- Gessmann, Markus A. Wimmer, Peter H. Pennekamp. 2005, Wiley InterScience, Inc. J Biomed Mater Res, pp. 31-40.
94. *Towards the design of dynamically loaded titanium engineering components.* Bell T., Morton P.H., Bloyce A. 1994, Materials Science and Engineering, Vol. A184, pp. 73-86.
95. *Wear protection of titanium alloys, surface performance of titanium.* A., Bloyce. s.l. : ed. ASM-TSM, 1997, pp. 155-169 . ISBN 0-87339-402-X.
96. *Histologic, biochemical and ion análisis of tissue and fluids retirved during total hip arthroplasty.* Dorr L.D., Bloebaum R., Emmanuel J., Meldrum R. 1990, Clinical Orthopaedics and Related Research, Vol. 261, pp. 82-95.
97. *The in vitro response to particulate titanium alloy. Medical applications of titanium and its alloys.* Rogers S.D., Howie D.W., Haynes D.R., Percy M.J. [ed.] Lemons J.E. editors Brown S.A. USA : ed. ASTM, 1996, pp. 297-305. ISBN 0-8031-2010-9.
98. *A tribological study of retrieved hip prostheses.* Isaac G.H., Wroblewski B.M., Atkinson J.R., Dowson D. 1992, Clinical Orthopaedics and Related Research, Vol. 276, pp. 115-125 .
99. *Histiocyte reaction in rabbit femurs to UHMWPE, metal and ceramic particles in different sizes.* Kubo T., Sawada K., Hirakawa K., Shimizu C., Takamatsu T. 1999, Journal of Biomaterials Research, Vol. 45, pp. 363-369.
100. *Characterization and comparison of wear debtris from failed total hip implants of different types.* Hirakawa K., Bauer T.W., Stulberg B.N., Wilde A.H., Secic M. 1996, Journal of Bone and Joint Surgery, Vol. 78A, pp. 1235-1243 .
101. *Effects of particles of fibroblast proliferation and bone resorption in vitro.* Shanbhag A.S., Jacobs J.J., Black J., Galante J.O., Glant T.T. 1997, Clinical Orthopaedics, Vol. 342, pp. 205-217.
102. *Semlitsh M., Willert H.G. Clinical wear behaviour of UHMWPE cups paired with metal and ceramic ball heads in comparison to metal-on-metal pairings of hip joint replacements.* s.l. : Proceedings of the Institute of Mechanical Engineers Part H. pp. 73-88 .
103. *Analysis of 118 second-generation metal-on-metal retrieved hip implants.* Sieber H.P., Rieker C.B., Köttig P. 1999, The Journal of Bone & Joint Surgery, Vol. 81B, pp. 46-50.
104. *Griest A.I, Moorhead P.E., Frost P.D., Jackson J.H. Surface hardening of titanium by carburizing and induction heat treatment.* s.l. : Transactions ASM, 1954. pp. 257-276.
105. *Surface treatments for improving the wear-resistance and friction properties of titanium and its alloys.* Mitchell E., Brotherton P.J. Journal of the Institute of Metals, Vol. 93, pp. 381-386-1964-1965.
106. *Surface engineering of titanium with nitrogeN.* Bell T., Bergmann H.W., Lanagan J., Morton P.H., Staines A.M. 1986, Surface Engineering, pp. 133-143 .

107. *New surface modification for Ti6Al7Nb alloy: oxygen diffusion hardening (ODH)*. **Streicher R.M., Weber H., Schön R., Semlitsch M.** 1991, *Biomaterials*, Vol. 12, pp. 125-129 .
108. **EJ., Baran.** *Química Bioinorgánica*. Madrid : McGraw-Hill Interamericana, 1994.
109. **OM., Alarcón.** *Elementos Biogénicos*. Mérida : Talleres Gráficos Universidad de los Andes, 2000.
110. **Santidrián Alegre, Santiago. and N. Munro, Hasmin.** *Nutrición. Aspectos bioquímico metabólicos y clínicos* . s.l. : EUNSA, 1988. pp. 189-192, 206-212.
111. **E., Herrera.** *Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas*. Mexico DF : Interamericana McGraw-Hill, 1991.
112. **EJ., Underwood.** *Trace elements in human and animal nutrition*. 4. New York : Academic Press, 1997.
113. *The essential trace elements*. **W., Mertz.** 1981, *Science*, Vol. 213, pp. 1132-1138.
114. *Importance of trace substances in environmental health as exemplified by manganese*. **G., Cotizas.** Columbia (USA) : s.n., 1997. 1st Ann Conf Trace Subst Environ Health.
115. **Luckey TD., Venugopal B.** *Physiological and Chemical Basis for Metal Toxicity: Metal Toxicity in Mammals*. New York : Plenum Press, 1997. Vol. 1.
116. *Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients*. **Gaetke LM., Chow CK.** 2003, *Toxicology*, Vol. 189, pp. 147-163.
117. **OM., Alarcón.** *Elementos Biogénicos*. 2. Mérida : Talleres Gráficos Universidad de los Andes, 2000.
118. *Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: case studies*. **Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerrer NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Woodrow Setzer R, Swenberg JA, Wallace K.** 2004, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 201, pp. 226-294.
119. **Nelson DL., Cox MM., Cuchillo CM.** *Principios de la Bioquímica*. 3. Barcelona : Omega, 2001.
120. *Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand*. **Thomson CD., Robinson MF.** 1980, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 33, pp. 303-323.
121. *Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects*. **Keen CL., Hanna LA., Lanoue L., Uriu-Adams JY., Rucker RB., Clegg MS.** 2003, *Journal of Nutrition*, Vol. 133, pp. 1477S-1480S.
122. *Role of environmental pollution with heavy metals in chronic pulmonary diseases pathogenesis in north regions*. **AF., Kolpakova.** 2004, *Med Tr Prom Ekol*, Vol. 56, pp. 14-19.
123. http://old.iupac.org/index_to.html. [Online]

124. *The Point of a Monument: A History of the Aluminum Cap of the Washington Monument*. **Binczewski, George J.** 1995, JOM, Vol. 47, pp. 20-25.
125. **autores, Varios.** *Enciclopedia de Ciencia y Técnica. Aluminio*. s.l. : Salvat Editores S.A., 1984. Vol. 1. ISBN 84-345-4490-3.
126. *Aluminio ¿culpable o inocente?* **Alcira Nesse, Graciela Garbossa, Gladys Pérez, Daniela Vittori, Nicolás Pregi.** Abril 2003, Revista Química Viva, Vol. 2.
127. *ESTUDIO DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL ALUMINIO EN EL ORGANISMO. INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA HEXOQUINASA.* **Rodríguez-Mateo, L.A, et al.** Madrid : s.n.
128. *Posible efecto protector de la cerveza sobre la toxicidad del aluminio.* **A. Peña, I. Meseguer y M.J. González.** Madrid : s.n.
129. *Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity.* **Berthon, Guy.** s.l. : Elsevier, 2002, Vol. 228, pp. 319-341.
130. <http://www.upmc.com/healthAtoZ/Pages/HealthLibrary.aspx?chunkid=177911>. [Online]
131. *The role of trace elements in uraemic toxicity.* **al., R. Vanholder et.** 2002, Nephrol Dial, Vol. 17.
132. *Neurotoxicidad y enfermedades óseas provocadas por la contaminación con aluminio de soluciones de diálisis renal.* **BARQUERO-QUIROS, Miriam, VARGAS-ROJAS, Rosario y BLANCO-SAENZ, Rigoberto.** 2001, Rev. costarric. cienc. méd, Vol. 22, pp. 179-189. ISSN 0253-2948.
133. *Aluminio y enfermedad ósea urémica. Utilidad diagnóstica del aluminio sérico y del test de la deferoxamina (DFO).* **C. Jarava, J. R. Armas* y A. Palma.** 2, 2001, Nefrología.
134. *Neurotoxicidad y enfermedades óseas provocadas por la contaminación con aluminio en las soluciones de diálisis renal.* **M. Barquero Quirós, R. Vargas Rojas, R Blanco-Sáenz.** 2001, Rev. Costarricense de Ciencias Médicas, Vol. 22, pp. 177-179.
135. *Aluminio en el Tracto Respiratorio Bajo de Residentes de la Ciudad de México.* **Adelaida R.I. Manquián-Tejos, Luis R. Tovar-Gálvez y Gabriel Yáñez-Canal.** 2008, REVISTA DE SALUD PÚBLICA, Vol. 10, pp. 452-461.
136. *Trace elements in parenteral micronutrition.* **Leung, Fred Y.** 6, USA : s.n., 1995, Clinical Biochemistry, Vol. 28, pp. 561-566.
137. **Solorzano, Héctor E.** <http://hector.solorzano.com.mx/articulos/aluminio.html>. [Online]
138. **Chavarrías, Marta.** <http://www.elarmonista.com/ws/salud/39-salud/85-aluminio>. [Online]
139. *Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long term ingestion of aluminium.* **Vittori D, Nesse A, Pérez G, Garbossa G.** 1999, Journal of Inorganic Biochemistry, Vol. 76, pp. 113-120.

140. *Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein.* **Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Pérez G, Nesse A.** 2002, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1558, pp. 142-150.
141. *Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukemia K562 cells.* **Pérez G, Garbossa G, Sasseti B, Di Risio C, Nesse A.** 1999, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 76, pp. 105-112.
142. *Disturbance of cellular iron uptake and utilisation by aluminium.* **Pérez G, Garbossa G, Di Risio C, Vittori D, Nesse A.** 2001, *J Inorg Biochem*, Vol. 87, pp. 21-27.
143. *Aluminium and biological systems: an introduction.* **Williams, R.J.P.** Oxford : Elsevier, 1995.
144. *Recurrent convulsive seizures in animals produced by immunologic and chemical means.* **Kopeloff L.M., Barrera S.E., Kopeloff N.** 1942, *Am. J. Psychiatry*, Vol. 98, pp. 881-902.
145. *Experimental production of neurofibrillary degeneration I. Light microscopic observations.* **Klatzo Y., Wisniewsky H., Streicher E.** 1965, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Vol. 24, p. 187.
146. *The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication.* **Alfrey, A. C., LeGendre, G. R., Kaehny, W D.** 1976, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 294, pp. 184-188.
147. *Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis.* **Alfrey A.C., Mishell J.M., Burls J.S., Contiguelia S.R., Rudolph H., Lewin E., Holmes J. H.** 1972, *Trans Am Soc Artif Intern Org*, Vol. 18, pp. 257-261.
148. *Hyperalbuminaemia from aluminum resins in renal failure.* **Berlyne GM, Ben-Ari J, Pest D, Weinberger J, Stern M, Levine R, Gilmore GR.** Septiembre 1970, *Lancet*, Vol. 2, pp. 494-496.
149. *Neurofibrillary degeneration induced in the rabbit by aluminum chloride: aluminium neurofibrillary tangles.* 1976, *Neuropathology and Applied Neurobiology* , Vol. 2, pp. 131 - 144.
150. *Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis.* **Alfrey AC, Mishell JM, Burks J, Contiguglia SR, Rudolph H, Lewin E, Holmes JH.** 1972, *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, Vol. 18, pp. 257-261.
151. *Calcium metabolism of brain in acute renal failure. Effects of uremia, hemodialysis, and parathyroid hormone.* **Arieff A.I., Massry S.G.** 1974, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 53, pp. 387-392.
152. *Encephalopathy in children with chronic renal failure.* **Baluarte HR, Gruskin AB, Hiner LB, Foley CM, Grover WD.** 1977, *Proc Clin Dial Transplant Forum*, Vol. 7, pp. 95-97.
153. *Role of aluminum in dialysis dementia.* **Dunea G, Mahurkar SD, Mamdani B.** 1978, *Apr, Ann Intern Med*, Vol. 88, pp. 502-504.
154. *Fracturing dialysis osteodystrophy and dialysis encephalopathy. An epidemiological survey.* **Parkinson IS, Ward MK, Feest TG, Fawcett RW, Kerr DN.** 1979, *Lancet*, pp. 406-409.

155. *Hemodialysis encephalopathy with osteomalacic fractures and muscle weakness.* **Pierides AM, Edwards WG Jr, Cullum UX Jr, McCall JT, Ellis HA.** 1980, *Kidney Int*, Vol. 18, pp. 115-124.
156. *Dialysis encephalopathy and osteomalacic bone disease.* **Prior, J.C., Cameron, E.C., Knickerbocker, W.J., Sweeney, V.P., Suchowersky, O.** 1982, *Am. J. Med.*, Vol. 72, pp. 33–42.
157. *Progressive encephalopathy in children with chronic renal insufficiency in infancy.* **Rotundo A, Nevins TE, Lipton M, Lockman LA, Mauer SM, Michael AF.** 1982, *Kidney Int* , Vol. 21, pp. 486–491.
158. *Osteomalacic dialysis osteodystrophy: Evidence for a Water-borne aetiological agent, probably aluminum.* **Ward MK, Feest TG, Ellis HA, Parkinson IS, Kerr DNS, Herrington J, Goode GL.** 1978, *Lancet* , Vol. 1, pp. 841–845.
159. **D.J., Andress D.L.y Sherrar.** Uremic Syndrome. *Diseases of the kidney.* Boston : Little Brown and Company Editores, 1990.
160. **Frieman E.A., Lundin A.P.** Magement of End-satge Renal failure. *Diseases of the kidney.* Boston : Little Brown and Company Editore, 1990.
161. *Dialysis dementia.* **Mahurkar SD, Dhar SK, Salta R, Meyers L jr, Smith EC, Dunea G.** 1973, *Lancet* , Vol. 1, pp. 1412–1415.
162. **A.I., Arieff.** Neurological Complications of Uremia. *The Kidney.* Philadelphia : B. M. Brenner y F.C. Rector, Jr Editores., 1986.
163. *Pathogenesis of dialysis encephalopathy.* **Arieff A.I, Mahoney C.A.** 1983, *Neurobehavioral toxicology and teratology* , Vol. 5, p. 641.
164. **A.C., Alfrey.** Nutrition, drugs and the kidney. *Diseases of the kidney.* Boston : Little Brown and Co. Eds., 1990.
165. *Experimental dialysis disequilibrium syndrome: Prevention with glycerol.* **Arieff AI, Lazarowitz VC, Guisado R.** 1978, *Kidney Int*, Vol. 14, pp. 270–278.
166. *Role of aluminum in dialysis dementia.* **Dunea G, Mahurkar SD, Mamdani B, Smith EC.** 1978, *Annals of Internal Medicine*, Vol. 88, pp. 502–504.
167. **Dunea G., Mahurkar S.D., Mamdami B.** 1978, *Annals of Internal Medicine*, Vol. 88, pp. 502-504.
168. *Dementia, renal failure, and brain aluminum.* **Arieff AI, Cooper JD, Armstrong D, Lazarowitz VC.** 1979, *Annals of Internal Medicine*, Vol. 90, pp. 741-747.
169. **A.C., Alfrey.** Nutrition, drugs and the kidney. *Diseases of the kidney.* Boston : Little Brown and Co., 1990.
170. *Aluminum chloride induced neurofibrillary changes in the developing rabbit a chronic animal model.* **Wisniewski HM, Sturman JA, Shek JW.** 1980, *Annals of Neurology*, Vol. 8, pp. 479–490.

171. *Accumulation of Aluminum in a Nondialyzed Uremic Child Receiving Aluminum Hydroxide.* **W. R. Griswold, V. Reznik, S. A. Mendoza, D. Trauner, A. C. Alfrey.** 1983, *Pediatrics*, Vol. 71, pp. 56-58.
172. *Encéphalopathie myoclonique progressive des dialysés: présence d'aluminium en forte concentration dans les lysosomes des cellules cérébrales.* **Galle P, Chatel M, Berry JP, Menault F.** Diciembre 1979, *Nouv Presse Med*, Vol. 8, pp. 4091–4094.
173. *Progressive dialytic encephalopathy. Role of the aluminium and neurological study. One case (author's transl.* **Buge A, Escourolle R, Poisson M, Gray F, Bleibel JM, Jaudon MC.** 1979, *Nouv Presse Med*, Vol. 8, pp. 1071-1074. ISSN: 0301-1518.
174. **Sturman J.A., Wisniewski H. M.** *Metal Neurotoxicity.* Boston : Stephen C. Bondy Editor, 1988.
175. *Intranuclear aluminum content in Alzheimer's disease, dialysis encephalopathy, and experimental aluminum encephalopathy.* **Crapper DR, Quittkat S, Krishnan SS, Dalton AJ, De Boni U.** 1980, *Acta Neuropathol*, Vol. 50, pp. 19-24.
176. **Good P.F., Perl D.P.** 1988, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Vol. 47, p. 321.
177. **Álvarez Grande J., Gago González E.** *Hemodiálisis, problemas clínicos y diálisis en casa. Tratado de nefrología.* 2. Madrid : Ediciones Norma, 1993, p. 950.
178. *Aluminum metabolism in uremia.* **AC., Alfrey.** 1980, *Neurotoxicology*, Vol. 1, pp. 43-53.
179. *Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure.* **Alfrey A.C., Hegg A., Craswell P.** 1980, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 33, pp. 1509-1516.
180. *Serum aluminum levels and erythrocyte dihydropteridine reductase activity in patients on hemodialysis.* **Altman P, Al-Salihi F, Butter K, Cutler P, Blair J, Leeming R, Cunningham J, Marsh F.** 1987, *New England Journal of Medicine*, Vol. 317, pp. 80–84.
181. *Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol.* **López-Hilker S., Dusso A., Rapp N., Martin K. J., Slatopolsky E.** 1990, *American Journal of Physiology*, Vol. 259, pp. 432-437.
182. *Defective gallium-transferrin binding in Alzheimer disease and Down syndrome: possible mechanism for accumulation of aluminium in brain.* **Farrar G, Altmann P, Welch S, Wychrij O, Ghose B, Lejeune J, Corbett J, Prasher V., Blair JA.** 1990, *Lancet*, Vol. 335, pp. 747-750.
183. **Dunea G., Mahurkar S.D. y Mamdami B.** 1978, *Ann. Intern. Med.*, Vol. 88, p. 502.
184. **Felndring J.A., Kruis H., y Das H.A.** 1976, *Lancet*, Vol. 1, p. 1235.
185. **Bakir A.A., Hryhorczuck D.O. y Berman E.** 1986, *Am. Soc. Artif. Organs*, Vol. 32, p. 171.
186. **A.C., Kirschbaum G.G. y Schoolwerth.** 1989, *Am. J. Med. Sci.*, Vol. 297, p. 9.
187. **Griswold W.R., Reznik V. y Mewndoza S.A.** 1983, *Pediatrics*, Vol. 71, p. 56.

188. **Sedman A.B., Klein G.L. y Merritt R.J.** 1985, N. Engl. J. Med. , Vol. 312, p. 1337.
189. **Sedman A.B., Miller N.I.L., y Worady B.A.** 1984, Kidney Int, Vol. 26, p. 201.
190. **Grosso S., Fernández Martín J.L., Gómez Alonso C., Barreto S., Díaz Cortes C. y Cannata J.B.** 1996, Nefrología, XVI, Vol. 2.
191. **Ellorriaga R., Fernández Martín J.L., Menéndez Fraga P., Naves M.L. y Cannata J.B.** 1992, Drugs today , Vol. 28, p. 177 .
192. **Fernández Martín J.L. Menéndez Fraga P., Canteros A., Díaz López J.B. y Cannata Audia J.B.** 1994, Clin. Chem. Acta , Vol. 230, p. 137.
193. **Platts M.M., Goode G.C., y Hislop J.S.** 1977, Br. Med. J., Vol. 2, p. 657.
194. **Hudson G.A., Milne F.J. y Meyers A. M.** 1980, Kidney int., Vol. 17, p. 532.
195. **Parkinson I.S., Word M.K. y Feast T.G.** 1979, Lancet , Vol. 1, p. 406.
196. **C.J., Chan Y-L. Furlong T.J. y Cornish.** 1985, Medicine, Vol. 64, p. 296.
197. **Lach F., Felsenfeld A.J. y Coleman M.D.** 1986, Kidney Int., Vol. 29, p. 574.
198. **Ott. S.M., Maloney N.A. y Coburn J.W.** 1982, N. Engl. J. Med., Vol. 307, p. 709.
199. **Goodman W.G., Henry D.A. y Horst R.** 1984, Kidney Int., Vol. 25, p. 379.
200. **M., Domínguez Carmona.** *“Metales, Aluminio y Salud.* Madrid : Ediciones Instituto de España Real Academia de Farmacia, 1990.
201. **S.G., Arieff A.I. y Massry.** 1974, J. Clin. Invest, Vol. 53, p. 387.
202. **O’Hare J.A., y Murnaghan D.J.** 1982, N. Engl. J. Med., Vol. 306, p. 654.
203. **Short A.I.K., Winney R.J., y Robsop J.S.** 1980, Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc., Vol. 17, p. 226.
204. **Tonam M., Martínez F. y Lacour B.** 1983, Clin. Nephrol., Vol. 19, p. 295.
205. **Casati S., Castelnovo C. y Campise M.** 1990, Nephrol. Dial. Transplant., Vol. 5, p. 441.
206. **Huber C.T., y Frieden E.** 1970, J. Biol. Chem., Vol. 245, p. 3979.
207. **Alfrey A.C., Legendre G.R. y Kaenney W.D.** 1976, N. Engl. J. Med., Vol. 294, p. 184.
208. **B., Weiss.** 1978, Fed. Proc, Vol. 37, p. 22.
209. **D., Hoguenoer J.M. y Furon.** *Toxicologie et Higiene Industriale 1ere Partie.* Paris : Editorial Technique et Documentation, 1981. p. 368.

210. *Toxicologie et Hygiene Industriale 1ere Partie*. Paris : Editorial Technique et Documentation, 1981. p. 369.

211. *Toxicologie et Hygiene Industriale 1ere Partie*. Paris : Editorial Technique et Documentation, 1981. p. 371.

212. **A.I., Arieff**. 1980, Georgetown University Press, Vol. 2, p. 55.

213. **Berlyne G.M., Ben Ari J. y Pest D.** 1970, Lancet, Vol. 2, p. 494.

214. **Kaehny W.D., Hegg A.P. y Alfrey A.C.** 1977, N. Engl. J. Med., Vol. 296, p. 1389 .

215. **Berlyne G.M., Ari J.B. y Knopf E.** 1972, Lancet, Vol. 1, p. 564.

216. **J., Florez**. *Metales, toxicología y antídotos. Farmacología Humana*. 2ª. Barcelona : Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Masson-Salvat Medicina, 1992. p. 906.

217. **Campbell I.R., Cass J.S. y Cholek J.** 1957, AMA Arch. Indust. Health, Vol. 15, p. 359.

218. *R.D. 1138/1990 de 14 de septiembre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas residuales de consumo público*. s.l. : Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno. BOE 226, 1990.



II

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos, Útiles de Laboratorio y Técnicas Aplicadas

CAPÍTULO 7. EQUIPOS Y ÚTILES DE LABORATORIO	141
CAPÍTULO 8. MÉTODO DE TRABAJO	155
CAPÍTULO 9. TÉCNICAS APLICADAS	173
CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA	267

Índice Parte Experimental

CAPÍTULO 7. EQUIPOS Y ÚTILES DE LABORATORIO	141
7.1. INTRODUCCIÓN	141
7.2. SIERRA LINEAL DE PRECISIÓN	141
7.3. PRENSA METALGRÁFICA (EMPASTILLADORA)-RESINA	142
7.4. PULIDORA-ESMERILADORA METALGRÁFICA.....	143
7.5. MICROSCOPIO METALGRÁFICO.....	143
7.6. BALANZAS.....	144
7.7. ESTUFAS.....	145
7.8. EQUIPO DE ULTRASONIDO.....	147
7.9. PLACA ELÉCTRICA.....	148
7.10. EQUIPO DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	149
7.10.1. Especificaciones técnicas de la cámara de grafito, GTA-120.....	150
7.10.2. Características de la lámpara de cátodo hueco de aluminio.....	151
7.10.3. Características del software SpectrAA worksheet.....	151
7.11. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE, SEM).....	152
7.12. MÁQUINA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	152
7.13. SOPORTE INFORMÁTICO.....	153
CAPÍTULO 8. MÉTODO DE TRABAJO	155
8.1. INTRODUCCIÓN.....	155
8.2. ELECCIÓN DE UN MODELO ANIMAL Y ESTUDIO BIOMECÁNICO.....	156
8.3. DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE IMPLANTACIÓN, SEGUIMIENTO Y RESCATE.....	159
8.4. DISEÑO MECÁNICO DE LOS ELEMENTOS PROTÉSICOS A IMPLANTAR.....	160
8.5. FABRICACIÓN DE LOS IMPLANTES.....	162
8.6. DESCRIPCIÓN DE PROCESO DE IMPLANTACIÓN.....	165
8.7. RESCATE DEL MATERIAL PROTÉSICO.....	171
CAPÍTULO 9. TÉCNICAS APLICADAS.....	173
9.1. GENERALIDADES.....	173
9.2. CONDICIONES DE TRABAJO.....	175
9.2.1. Selección de las muestras.....	176
9.2.2. Preparación de las muestras.....	177
9.3. DESARROLLO DEL MÉTODO DE TRABAJO.....	178
9.3.1. Corte de las muestras.....	179
9.3.2. Montaje de las muestras en resina.....	180
9.3.3. Lijado.....	181
9.3.4. Pulido.....	182
9.3.5. Defectos de preparación.....	184
9.4. ANÁLISIS METALGRÁFICOS. MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	189
9.4.1. Generalidades.....	189
9.4.2. Breve historia.....	190
9.4.3. Descripción y principios en los que se basa.....	191
9.4.4. Fundamentos teóricos.....	195

9.4.5.	<i>Instrumentación.</i>	197
9.4.6.	<i>Aplicaciones.</i>	202
9.4.7.	<i>Interferencias.</i>	205
9.5.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ALUMINIO EN LAS MUESTRAS.	208
9.5.1.	<i>El aluminio en los sistemas biológicos.</i>	208
9.5.2.	<i>Procedimientos para la medida directa del contenido de aluminio.</i>	209
9.5.3.	<i>Método analítico para la medida del contenido de Al en fluidos biológicos (minipig).</i>	217
9.6.	ESTUDIOS HISTOLÓGICOS. MÉTODO DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM).	228
9.6.1.	<i>Generalidades.</i>	228
9.6.2.	<i>Breve historia.</i>	229
9.6.3.	<i>Descripción y principios en los que se basa (SEM).</i>	236
9.6.4.	<i>Características del microscopio electrónico de barrido (SEM).</i>	247
9.6.5.	<i>Instrumentación.</i>	248
9.6.6.	<i>Evolución del microscopio electrónico de barrido (SEM).</i>	249
9.6.7.	<i>Aplicaciones.</i>	252
9.7.	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y TOPOGRÁFICAS DE LAS MUESTRAS	255
9.7.1.	<i>Introducción.</i>	255
9.7.2.	<i>Métodos de estudio de los tejidos biológicos.</i>	255
9.7.3.	<i>Técnicas de preparación de muestras para observarlas al microscopio.</i>	261
9.7.4.	<i>Procedimiento para determinar características morf. y topog. de las muestras.</i>	263
CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA		267

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1.	Sierra lineal de precisión utilizada en el laboratorio Buehler.	141
Ilustración 2.	Máquina empastilladora.	142
Ilustración 3.	Calefactor, Refrigerador, Cilindros de montaje y termómetro	142
Ilustración 4.	Esmeriladora metalográfica.	143
Ilustración 5.	Microscopio metalográfico utilizado y la cámara incorporada.	143
Ilustración 6.	Balanza de precisión utilizada en el laboratorio.	144
Ilustración 7.	Balanza analítica modelo COBOS XT 220A.	145
Ilustración 8.	Estufa digital de secado y esterilización modelo RAYPA DRYING OVEN DIGIT, DOD-20.	146
Ilustración 9.	Estufa para cultivos de sobremesa, modelo SELECTA INCUBAT ANALÓGICA 2000206.	147
Ilustración 10.	Equipo para realizar baños por ultrasonidos RAYPA UCI-200.	148
Ilustración 11.	Placa eléctrica modelo SALCO SKP-11	149
Ilustración 12.	Espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN AA-240Z	149
Ilustración 13.	Microscopio electrónico de barrido HITACHI S4800 de cátodo frío.	152
Ilustración 14.	Articulaciones: humano, cabra, oveja, cerdo, perro, conejo, rata y ratón.	157
Ilustración 15.	Esqueleto de un cerdo.	157
Ilustración 16.	Rodilla de un cerdo.	158
Ilustración 17.	Anatomía extremidad trasera porcina	158
Ilustración 18.	Situación de la placa en una cabeza tibial porcina.	158
Ilustración 19.	TAC de una cabeza tibial de cerdo y dibujo aproximado del área de trabajo de la placa.	161
Ilustración 20.	Diseño de la placa tibial.	161
Ilustración 21.	Montaje de la placa implantada sobre una TAC de minipig.	161
Ilustración 22.	Placa tibial recortada.	162

Ilustración 23. Corte del lingote en bloques y mecanizado de una cara.	162
Ilustración 24. Primera fase terminada y mecanizado de la segunda cara.	162
Ilustración 25. Mecanizado del espesor de la aleta y de la zona de sujeción al hueso.....	163
Ilustración 26. Dando la forma final a la aleta.	163
Ilustración 27. Acabado superficial: Pulido y vibradora.	163
Ilustración 28. Acabado superficial: baño de ultrasonidos.	164
Ilustración 29. Placas terminadas.	164
Ilustración 30. Comparación de ambas placas tibiales.	164
Ilustración 31. Placa tibial recortada.	164
Ilustración 32. Instrumental de apoyo a las intervenciones. Retractor.	165
Ilustración 33. Posición de la meseta tibial y el lugar de implantación.....	166
Ilustración 34. Incisión en la cabeza tibial mediante sierra oscilante. Colocación de la placa.....	166
Ilustración 35. Taladrado de los agujeros para los tornillos y colocación de los tornillos de esponjosa....	166
Ilustración 36. Identificación del animal.	167
Ilustración 37. Colocación de vías intravenosas para la administración de sedación.	168
Ilustración 38. Intubación para administración de anestesia inhalatoria.	168
Ilustración 39. Monitorización de las constantes vitales del animal.....	168
Ilustración 40. Preparación del animal para la intervención. Afeitado y limpieza.	168
Ilustración 41. Instrumental quirúrgico e implante (placa tibial).	169
Ilustración 42. Localización de la zona de la meseta tibial donde se va a implantar la placa.	169
Ilustración 43. Incisión en la cabeza tibial mediante sierra oscilante. Colocación de la placa.....	169
Ilustración 44. Taladrado de agujeros y colocación de los tornillos de fijación del implante.	170
Ilustración 45. Proceso de sutura de la herida y vendaje.	170
Ilustración 46. Colocación de parche de antibiótico.....	170
Ilustración 47. Radiografía posterior a la intervención para asegurar la buena implantación.	170
Ilustración 48. Recuperación de implantes.	171
Ilustración 49. Plan de cortes en el modelo virtual.	172
Ilustración 50. Cortes virtuales.	172
Ilustración 51. Resina de montaje, Struers.	180
Ilustración 52. Papel abrasivo preparado para el lijado en el taller.....	182
Ilustración 53. Pulidora/Lijadora automática del laboratorio, Struers.	183
Ilustración 54. Aum 200 x. Rayas producidas tras el pulido fino. Metalog guide Struers.....	185
Ilustración 55. Aum 200x. Líneas de deformación afiladas. Metalog guide Struers.	185
Ilustración 56. Aum 500x. Inclusiones arrancadas.	186
Ilustración 57. Aum 100 x. Separación entre la resina y la muestra. Metalog guide Struers.	186
Ilustración 58. Aum 500 x. Superaleación después de 5 minutos de pulido. Metalog guide Struers.....	187
Ilustración 59. Aum 200x. Colas de cometa. Metalog guide Struers.....	187
Ilustración 60. Aum 200x. Partículas de cobre retenidas entre la matriz de aluminio,	188
Ilustración 61. Defecto superficial en una muestra de Ag-Pd. 600x.....	188
Ilustración 62. Defectos superficiales en una muestra de Ag-Pd tras el lapeado 600x.....	188
Ilustración 63. Esquema de funcionamiento del FAAS.	191
Ilustración 64. Esquema funcional del GFAAS.	192
Ilustración 65. Esquema funcional del ICP.	192
Ilustración 66. Esquema funcional del ICP de masa.....	193
Ilustración 67. Tabla periódica que muestra las técnicas a usar para cada elemento.....	193
Ilustración 68. Componentes básicos de un equipo de absorción atómica.	197
Ilustración 69. Proceso de Atomización.	200

Ilustración 70. Proceso de congelación de las muestras.....	219
Ilustración 71. Detalle de todos los tipos de muestras tomados	219
Ilustración 72. Proceso de descongelación en cámara a 4 °C.	220
Ilustración 73. Proceso de triturado de la muestra.	220
Ilustración 74. Proceso de tarado del recipiente.....	220
Ilustración 75. Proceso de tarado de la muestra.....	221
Ilustración 76. Proceso de secado de la muestra.	221
Ilustración 77. Muestras después del proceso de secado.....	221
Ilustración 78. Proceso de tarado de la muestra seca.	222
Ilustración 79. Preparación de la disolución, ultrasonidos y calentamiento en placa eléctrica.....	222
Ilustración 80. Proceso de enrasado de la disolución en un matraz de 50 ml.	222
Ilustración 81. Espectrofotómetro Varian AA 240Z con horno de grafito GTA-120 y PSD-120.	223
Ilustración 82. Lámpara de cátodo hueco de aluminio.....	224
Ilustración 83. Posiciones en el inyector automático PSD-120.	224
Ilustración 84. Características del patrón de aluminio.	225
Ilustración 85. Recipiente donde se realizan las limpiezas automáticas e inyector, respectivamente.	225
Ilustración 86. Proceso de inyección de muestras con el inyector automático PSD-120.....	226
Ilustración 87. Esquema básico de un microscopio electrónico de barrido.	238
Ilustración 88. Microscopio electrónico de barrido, SEM.	238
Ilustración 89. Esquema básico de la obtención de la imagen en un SEM.	239
Ilustración 90. Esquema general del efecto del haz de electrones s	241
Ilustración 91. Microscopio óptico de campo brillante.	257
Ilustración 92. Microscopio electrónico de transmisión.	259
Ilustración 93. Muestras de porción ósea con implantes.	264
Ilustración 94. Muestras empastilladas de porción ósea con implantes.....	265

Índice de Tablas

Tabla 1. Animal Models used in the assessment of cartilage repair.	156
Tabla 2. Planificación de las intervenciones y el rescate de los implantes en los minipigs.	160
Tabla 3. Límites de detección (mg/L) de llama y horno de grafito.	204
Tabla 4. Modificadores de matrices potenciales para EAAE.....	207
Tabla 5. Concentraciones de Al en plasma o suero de sujetos no laboralmente expuestos.	218
Tabla 6. Programa de temperatura del horno de grafito.....	224
Tabla 7. Ejemplo de una curva de calibrado para una muestra concreta.....	226
Tabla 8. Comparativa entre el microscopio óptico y el electrónico.	240

Índice de Ecuaciones

$E = E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$ Ecuación 1. Ecuación de Planck.	195
$D_n = B_{ij}/2p$ Ecuación 2	196
$\Delta v = \frac{2v_e \sqrt{(2 \ln 2) RT}}{M}$ Ecuación 3.....	196

$\Delta v = \sigma^2 N \frac{\sqrt{2RT(M_1+M_2)}}{M_1 M_2 \pi}$ Ecuación 4	197
$-\frac{dm}{dt} = \frac{4\pi r \lambda}{c_p} \ln \left[1 + \frac{c_p(T-T_b)}{L} \right]$ Ecuación 5.....	199
$Al_2O_3 (s/l) + 1.5 AlC_2 (g) \rightarrow 3,5 Al (g) + 3 CO$ Ecuación 6	212
$AlC_2 (g) + 2 AlO (g) \rightarrow 3 Al (g) + 2CO$ Ecuación 7	212
$Al (g) + 2 C(s) \rightarrow AlC_2 (g)$ Ecuación 8	212
$2Al (g) + O_2 \rightarrow 2 AlO (g)$ Ecuación 9	213
$Al_2O_3 (s/l) + Al_2C (g) \rightarrow 2 Al_2O (g) + CO$ Ecuación 10.....	213
$Al_2O (g) + 2 C(s) \rightarrow Al_2O (g) + 2CO$ Ecuación 11	213
$Al_2O_3(s/l) + 2 C(s) \rightarrow Al_2O (g) + 2 CO$ Ecuación 12	213
$2 Al_2O_3 (s) + 3 C(s) \rightarrow Al_4O_4C(s) + 2 CO (g)$ Ecuación 13	214
$Al_4O_4C(s) + 6 C(s) \rightarrow Al_4C_3(s) + 4 CO (g)$ Ecuación 14	214
$2 Al_2O_3 (s) + 9 C(s) \rightarrow Al_4C_3(s/l) + 6 CO (g)$ Ecuación 15	214
$Al_4C_3 (g) \rightarrow 4 Al (g) + 3 C (s)$ Ecuación 16.....	215
$Al_2O_3 (s) + 4 Al (g) \rightarrow 3 Al_2O (g)$ Ecuación 17	215
$Al_2O_3(s) + Al (g) \rightarrow 3 AlO (g)$ Ecuación 18.....	215
$3 Al_2O (g) + 3 C(s) \rightarrow 6 Al (g) + 3 CO (g)$ Ecuación 19	215
$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$ Ecuación 20	230
$A = n \cdot \sin \sigma$ Ecuación 21	236
$n (aire) = 1, n (agua) = 1,33, n(aceite de inmersión) = 1,52$ Ecuación 22.....	236
$R = \frac{\lambda}{2N.A}$ Ecuación 23.....	237

CAPÍTULO

7

Equipos y Útiles de Laboratorio

7.1. Introducción.

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado una serie de equipos y aparatos ubicados en su mayor parte en el laboratorio y taller de materiales del Departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Para la realización de algunos ensayos como la microscopía electrónica de barrido, la difracción de rayos X y la absorción atómica se han utilizado máquinas externas a este departamento (Centro de Ingeniería Avanzada de Superficies, Asociación de la Industria Navarra AIN, Pamplona).

7.2. Sierra lineal de precisión.

La sierra lineal de precisión de la firma BUEHLER, modelo ISOMET®4000 es una sierra lineal automática de uso fácil que incluye el sistema SMART CUT de ajuste automático de la velocidad de avance, que permite realizar cortes consistentes, de calidad y evitar daños a la máquina y a la muestra. Un sistema de posicionamiento de muestras de 2 μm permite realizar aplicaciones de precisión y posibilita el corte de muestras delicadas sin peligro de deformación.



Ilustración 1. Sierra lineal de precisión utilizada en el laboratorio Buehler.

La máquina consta de un mandril de sujeción con sus correspondientes bridas, unas mordazas adaptables a las piezas de corte y una serie de accesorios adicionales indispensables para realizar la función; tanto los discos de corte, el refrigerante y el goniómetro de precisión son accesorios externos al montaje principal de la máquina.

7.3. Prensa metalográfica (empastilladora)-Resina.

La empastilladora de la firma Metalograf, modelo Metalopres-I, es un aparato del tipo de moldeo cerrado en caliente, con las siguientes características:

- Posee amplia base con puentes de trabajo deslizante sobre robustas columnas y mandado por bomba hidráulica de empuje manual, cuya presión máxima es 400 kg/cm².



Ilustración 2. Máquina empastilladora.

- Posee amplia base con puentes de trabajo deslizante sobre robustas columnas y mandado por bomba hidráulica de empuje manual, cuya presión máxima es 400 kg/cm².
- La cabeza del aparato, de robusto diseño, lleva incorporada, el eyector de molde, el husillo desplazable de ajuste de altura de moldeo, los cáncamos de sujeción de horno y el equipo de medición de temperatura.
- El equipo de calefacción es de calentamiento extra-rápido, llevando incorporado una resistencia intercambiable monobloc de 400W a 220V, alcanzando una temperatura máxima de 200°C.
- El equipo de moldeo está compuesto por un molde completo para obtener pastilla de 30 y 25 mm de diámetro. Construido de acero indeformable con posterior rectificado y lapeado de las superficies de contacto con unas tolerancias muy estrechas y consta del cilindro, cámara y pistón.
- El equipo de refrigeración es de aleación ligera con aletas y gran superficie refrigeradora para la evacuación del calor.



Ilustración 3. Calefactor, Refrigerador, Cilindros de montaje y termómetro utilizado en la prensa del laboratorio.

7.4. Pulidora-Esmeriladora Metalográfica.

La pulidora Micropol II de la firma Metalograf, presenta las siguientes características:

- Dos velocidades de esmerilado/pulido a 200 y 400 r.p.m.
- Motor trifásico de 0.65 HP a 380 tropicalizado.
- Trasmisión de velocidad por unidades autónomas de motorreducción por engranajes con sus correspondientes equipos eléctricos.
- Equipos hidráulicos compuestos de llave de regulación para la toma de difusión o servicio del aparato, con drenaje y conducción a la parte posterior.
- Aparato pintado en esmalte acrílico de secado a alta temperatura y elementos mecánicos y móviles protegidos con tratamiento de níquel químico.



Ilustración 4. Esmeriladora metalográfica.

7.5. Microscopio metalográfico.

El microscopio metalográfico es de la marca Olympus Japan, modelo PME3-ADL 3.3x/10x, con esta entrada de 220/240 V en corriente alterna, 50/60 Hz, 0.32/0.29 A, y con salida de 12 V a 50W. Lleva incorporada una cámara de la marca ELMO color CCD TV Cámara, modelo TPC5502EX.



Ilustración 5. Microscopio metalográfico utilizado y la cámara incorporada.

Este microscopio y la cámara que lleva acoplada, tienen como principales características las siguientes:

- Microscopio dotado de lentes capaces de proporcionar una visión óptica de 150. 300. 600. 1200. 3000 aumentos
- Bandeja de trabajo situada en la parte superior del equipo con capacidad para desplazarse longitudinal, vertical y horizontalmente.
- Se encuentra conectado a un ordenador con algo de antigüedad. Pentium IV a 2,6 Ghz y 256 Mb de RAM.
- La cámara está alimentada a 230 V, 10%, 0.03 A, en corriente alterna.
- Tiene la siguiente resolución: 480 TV lines (H), 420 TV lines (V)
- Tiene la siguiente salida de video: VBS 10vp-p 75Ω, BNC conector.
- Las condiciones de temperatura ambiente de funcionamiento oscilan entre los -10 °C hasta los 50 °C.
- Las condiciones de humedad ambiente de funcionamiento suelen darse entre 30% y 90%.
- Dimensiones 60x60x120 mm y peso 80g

7.6. Balanzas.

En este proyecto, se han empleado distintas balanzas en función del trabajo a realizar. Por un lado, se ha usado la balanza de precisión marca Sartorius modelo PT 2100-00V1, cuyas características son las siguientes:

- Rango de medida:
- 0.1g – 310 g
- Precisión: ± 0.1 g
- Balanza alimentada con una tensión de 220 Voltios a 50 Hz.



Ilustración 6. Balanza de precisión utilizada en el laboratorio.

Por otro lado, se ha empleado la Balanza analítica modelo COBOS XT 220A con calibración interna automática con las siguientes especificaciones técnicas:

- Panel con 10 teclas para una cómoda utilización.
- Autocalibración con SCS, calibración automática programable de tiempo y temperatura de 2°C.
- Determinación de la densidad.
- RS232C bidireccional interface de serie.
- Excelentes prestaciones y muchas aplicaciones:

- Conversión programas para cualquier factor de conversión.
- Cuentapiezas.
- Porcentaje.
- Factor de multiplicación.
- Diferentes unidades de peso: gr, ct, lb, ozt, Kg, mg, %, etc...
- Formulación.
- Peso por totalización.
- Pesaje de animales vivos.
- Densidad de la determinación de los combustibles sólidos, líquidos y materiales porosos.
- Estadísticas.
- Más / menos verificación de peso.
- Cumple con las normas GLP (Good Laboratory practice).
- Carcasa metálica.
- Capacidad máxima: 200 g
- Precisión: 0.1 mg
- Diámetro del plato de acero inoxidable de 80.



Ilustración 7. Balanza analítica modelo COBOS XT 220A.

7.7. Estufas.

Estufa digital de secado y esterilización modelo RAYPA DRYING OVEN DIGIT, referencia DOD-20. con las siguientes especificaciones técnicas:

- Características generales.
 - Mueble exterior metálico pintado al horno con resina epoxi.
 - Cubeta interior, doble cámara y contrapuerta en acero inox. AISI 304.
 - Junta elástica de silicona.
 - Dispositivo de aireación regulable.
 - Termómetro electrónico a microprocesador con selección y lectura digital de la temperatura. Tiempo de espera a la puesta en marcha programable desde 0 hasta 99,50

- horas. Tiempo de mantenimiento de la temperatura, programable desde OFF hasta 99,50 horas.
- Sensor de temperatura PT 100 DIN.
 - Calefacción eléctrica con resistencias montadas en cámara independiente, lo que permite una óptima estabilización de la temperatura.
 - Se suministran con 2 bandejas perforadas en acero inoxidable AISI 304, ajustables en altura, con sistema anti-vuelco.
- Características técnicas.
- Estufa con convección natural de aire.
 - Temperaturas regulables desde 40 °C hasta 250 °C.
 - Homogeneidad de la temperatura $\pm 2\%$.
 - Estabilidad de la temperatura $\pm 0.25\%$.
 - Pruebas térmicas de homogeneidad y estabilidad de la temperatura según norma DIN-50011
 - Seguridad según normas EN-61010-1, EN-61010-2-010.
 - Termostato de seguridad clase 2 incorporado de serie con lámpara de señalización de sobretemperatura.
 - Aislamiento térmico con lana mineral, de baja conductividad.
 - Teclado y pantalla del microprocesador con protección IP-54.
 - Dispositivo de bloqueo del termostato de seguridad que impide su giro involuntario.
 - Capacidad de 20 L.
 - Medidas interiores de 300 x 250 x 250 mm.
 - Medidas exteriores de 610 x 440 x 400 mm.
 - Potencia de 600 w.
 - Peso de 27 Kg.



Ilustración 8. Estufa digital de secado y esterilización modelo RAYPA DRYING OVEN DIGIT, DOD-20.

Estufa para cultivos de sobremesa, modelo SELECTA INCUBAT ANALÓGICA 2000206 con las siguientes especificaciones técnicas:

- Construcción.
 - Mueble exterior tratado y recubierto en epoxi, resistente a los ambientes corrosivos.

- Elementos interiores: doble cámara, recinto útil (de fácil limpieza), contrapuerta, soportes y bandejas ajustables en altura, contruidos en acero inox. AISI 304.
- Cámara independiente, dimensionada para facilitar el montaje de todo tipo de instrumentos para la regulación y control.
- Admisión de aire exterior regulable.
- Dispositivo flexible que aporta elasticidad en el ajuste de la contrapuerta flotante.
- Propiedades técnicas.
 - Excelente aislamiento que permite lograr una óptima relación entre capacidad calorífica y consumo, limitando la temperatura externa.
 - Calefactores montados al aire en cámara independiente que permiten obtener una distribución uniforme de la temperatura y una rápida estabilización.
- Puerta interior en cristal templado para los modelos bacteriológicos y de cultivos.
- Tecnología Original Selecta.
 - Dispositivo de inmovilización del mando del termostato (para modelos con regulador de temperatura analógico).
 - Soporte en cremallera con guías para bandejas regulables en altura.
 - Junta de cierre de la puerta con doble textura.
 - Contrapuerta flotante que presiona regularmente sobre la junta del recinto útil, absorbiendo las dilataciones térmicas.
 - Cierre regulable que permite ajustar la presión de la puerta.
- Rango de esterilización: ambiente + 5 °C hasta 80 °C.
- Capacidad: 36 L.
- Seguridad: si.
- Regulación: analógica.
- Distribución del calor: convección natural.
- Modalidad: bacteriológica.
- Regulación: temperatura.



Ilustración 9. Estufa para cultivos de sobremesa, modelo SELECTA INCUBAT ANALÓGICA 2000206.

7.8. Equipo de ultrasonido.

Equipo para realizar baños de limpieza por ultrasonidos RAYPA UCI-200. con las siguientes características técnicas:

- Generador productor de energía eléctrica a alta frecuencia, completamente transistorizado e incluido en el mismo mueble.
- Frecuencia de trabajo de 35 KHz.
- Cuba de acero inoxidable que 18/10 contiene el líquido de limpieza. La energía de los ultrasonidos transmitida por el líquido, engendra en todos los puntos de la superficie del objeto (poros, etc.) una cavitación que efectúa un cepillado de choque arrancando la suciedad.
- Mueble exterior en acero inoxidable AISI-316.
- Calefacción eléctrica con elementos adosados a la cubeta en todos los modelos.
- Regulación de la temperatura con termostato hidráulico.
- Reloj desconector regulable entre 0 y 15 minutos.
- Selector para onda completa y media onda. Con este sistema se consigue que el baño tenga menor consumo energético en algunas aplicaciones.
- Grifo de desagüe incorporado.
- Bajo consumo de energía eléctrica y de detergente, ya que éste se utiliza muy diluido.
- Ahorro de tiempo, ya que la limpieza por ultrasonidos evita el tener que cepillar manualmente y no precisa que la persona esté in situ y pueda realizar otras tareas.
- Máxima calidad y facilidad de trabajo, ya que los huecos y espacios de difícil acceso quedan inmejorablemente limpios en el baño de ultrasonidos, sin dejar restos de suciedad.
- Protección de los materiales que se someten al baño, que nunca podrán ser dañados.
- Capacidad para 12 L.
- Medidas interiores de 150 x 300 x 240 mm.
- Medidas exteriores de 310 x 330 x 270 mm.
- Potencia de 700 w.
- Peso de 14 Kg.
- Tapa superior en acero inoxidable TS-200.
- Cesto de alambre inoxidable CP-200.



Ilustración 10. Equipo para realizar baños por ultrasonidos RAYPA UCI-200.

7.9. Placa eléctrica.

Placa eléctrica modelo SALCO SKP-11 con las siguientes especificaciones técnicas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**):



Ilustración 11. Placa eléctrica modelo SALCO SKP-11

7.10. Equipo de Absorción Atómica.

El equipo de absorción atómica utilizado para la determinación de metales en las muestras en estudio es un espectrofotómetro VARIAN AA-240Z con corrección de fondo Zeeman, con cámara de grafito modelo GTA-120. y muestreador automático programable PSD-120. así como 4 posiciones para colocar lámparas de cátodo hueco UltrAA (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las características de las lámparas de cátodo hueco estarán en función del metal que se quiera analizar.

El equipo está controlado totalmente por PC y el tratamiento de los datos se realizó con un el software SpectrAA worksheet, versión 5.01 Pro.



Ilustración 12. Espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN AA-240Z con corrección de fondo Zeeman y con cámara de grafito modelo GTA-120.

Presenta un diseño de Zona de Temperatura Constante (CTZ) que se logra a partir de un cuidadoso desarrollo de la fuente de la cámara de grafito, GTA-120 que se ajusta a la baja masa y calentamiento por los extremos de los tubos de grafito. Esto proporciona un calentamiento rápido y homogéneo, para un rendimiento inigualable y bajos efectos de memoria. El GTA 120 CTZ proporciona diversos beneficios analíticos tales como:

- Excelentes Límites de Detección.
- Vida útil extendida de los tubos de grafito.
- Efectos de memoria reducidos.

El muestreador automático PSD-120 proporciona capacidad para hasta 50 muestras en viales descartables de 2 mL, más 5 viales centrales de 10 mL para el blanco, estándar, y modificadores químicos. Prepara automáticamente hasta 10 puntos de curva a partir de un estándar de partida con adición de hasta 3 modificadores químicos. Proporciona reducción automática de volumen para las muestras que salen del rango, inyecciones múltiples para concentración de la muestra, e inyección en caliente para un análisis rápido por horno. Está provisto de viales de 2 mL para las muestras, un recipiente para enjuague de 1 L, carrusel de muestras, cubierta para muestras, 5 recipientes de 10 mL para soluciones estándares, modificadores de matriz, controles de calidad, blancos y adiciones.

7.10.1. Especificaciones técnicas de la cámara de grafito, GTA-120.

La cámara de grafito GTA-120 consta de una unidad de control y la cámara de grafito propiamente dicha. Presenta las siguientes características técnicas:

- Suministro de energía.
 - Tensión: 240 v.
 - Frecuencia: 50-60 Hz \pm 1Hz.
 - Consumo normal: 130 VA.
 - Conexiones eléctricas:
 - Europe Kaiser CEBEC 616 VDE (cumple con DIN 49441R2).
 - 25 pin D-range type (para el dispensador automático) localizado en el compartimento IEEE-488 en la trasera del equipo.
 - Conexión CPC 14 para la cámara de grafito.
 - Fusibles.
 - T16AH 250V, IEC 127 sheet 5, 5 x 20 mm
 - T16AL 250V, IEC 127 sheet 3, 5 x 20 mm
 - T2.5AL 250V, IEC 127 sheet 3, 5 x 20 mm
 - 15 A long delayed action circuit breaker with a thermal cutout.
- Suministro de gas.
 - El gas usado es Argón con un 99,99% de pureza. Las condiciones de trabajo del gas son las siguientes:
 - Presión recomendada: 140 kPa.
 - Presión máxima de 350 kPa.
 - Condiciones normales del flujo: 0 – 3.5 L/min.
 - Conexión del gas: 6 mm (1/4") barb.

- Suministro de agua.
 - Temperatura máxima: 40 °C.
 - Rango de temperatura recomendado: 10–20 °C.
 - Tasa de flujo mínima requerida 20 °C: 15 L/min.
 - Tasa de flujo recomendada: 15–2.0 L/min.
 - Rango de presión recomendado para la unidad de control: 175–200 kPa.
 - Presión máxima en la unidad de control: 210 kPa.
 - Presión máxima en el regulador: 700 kPa.
 - Typically removes 950 W of heat at 20 °C.
 - Las conexiones de agua son de 6 mm (1/4") barb, tanto las conexiones de entrada como las de salida.
- Peso: 37 kg.
- Dimensiones
 - Unidad de control: 240 x 560 x 580 mm.
 - Cámara: 150 x 150 x 340 mm.
 - Paquete completo: 760 x 950 x 870 mm (incluido el inyector).
- La plataforma que incorpora el tubo de grafito fue suministrada con el equipo (referencia Varian 63-100011-00 y 4090-20).
- Modelo del sistema de refrigeración es de la empresa Gmbh (Van der Heijden Laboctechnik).

7.10.2. Características de la lámpara de cátodo hueco de aluminio.

Para la determinación de la concentración de aluminio en las muestras se empleó una lámpara de cátodo hueco de aluminio con las características siguientes:

- Longitud de onda, λ : 309,3 nm.
- Ranura o slit: 0.5 nm.
- Corriente recomendada, I: 10 mA.
- Corriente máxima, I: 15 mA.

7.10.3. Características del software SpectrAA worksheet.

El software SpectrAA Worksheet trabaja con el sistema operativo Windows[®] XP y se caracteriza por un diseño innovador, donde todos los instrumentos de control, resultados de las muestras, gráfico de señales, etc., son accesibles desde una única ventana.

La versión de este software con la que se han analizado las muestras es la 5.01 Pro, que presenta las siguientes características:

- Hoja de trabajo basada en la operación y el control.
- Controles de calidad básicos con 10 ensayos de control de calidad para la llama, el vapor, la cámara de absorción atómica, incluyendo los ensayos de control de calidad para el blanco, los patrones, control de muestras, duplicado, precisión, coeficiente de correlación y ensayos de límites de detección.
- Simultaneidad de operaciones con un solo ordenador.
- Operaciones secuenciales rápidas, determinación de multielementos.

- Correcciones internas de la llama, cuando opera en el modo Fast Sequential, mejorando la precisión y la exactitud.
- Operaciones avanzadas de control de calidad.
- Método de edición sencillo (modificación de parámetros,...).
- Variedad de resultados.
- Información sencilla.
- Etiquetado de muestras.
- Seguimiento del proceso.

7.11. Microscopio Electrónico de Barrido (*Scanning Electron Microscope, SEM*).

En lo que respecta a la caracterización del material se empleó un microscopio electrónico de barrido HITACHI S4800 de cátodo frío, con emisión de campo y con capacidad de resolución de estructuras de hasta 3 nanómetros, con detector de electrones secundarios y conversor de retrodispersadores *in-lens*. También está equipado con sistemas de análisis por microsonda (EDX) y de resolución de estructuras cristalinas superficiales (EBSD).

El microscopio electrónico de barrido, tiene altas prestaciones y permite trabajar en tres modos: alto vacío, bajo vacío y presión ambiental (ESEM) hasta 2667 Pa.

El tamaño de la cámara de muestra de este equipo permite introducir muestras de hasta 280mm de diámetro y dispone de monitorización de cinco ejes. Posee una resolución de 3,5nm en todos los modos de trabajo.



Ilustración 13. Microscopio electrónico de barrido HITACHI S4800 de cátodo frío.

7.12. Máquina de difracción de rayos X.

Para la resolución de estructuras cristalinas se utiliza la máquina asociada al microscopio electrónico de barrido HITACHI S4800, equipado con un sistema de análisis por EDX (Detector de electrones retrodispersados). El esquema general del equipo consta de las siguientes partes:

- Depósito de nitrógeno líquido.
- Dedo frío.

- Cámara.
- Tapa de apertura de objetivo móvil.
- Varilla de extracción de la muestra.
- Detector de electrones secundarios (Upper).
- Pantalla de televisión.
- Dispositivo de intercambio de la muestra.
- Cañón de electrones.
- Botones de control para la extracción de la muestra.
- Unidad principal.
- Detector EBSD.
- Detector de electrones secundarios (Lower).

7.13. Soporte Informático.

El software utilizado: Omnimet MHT (Micromet 5124), EC-Lab® V.9.55, EC-Lab® Express, AVer Media TV, Scan Soft OmiPage SE., CanonScan Toolbox., Google Picassa 3., Paint.NET, Microsoft Office Word 2007, Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office PowerPoint 2007, Adobe Acrobat 9.0. Google Chrome.

CAPÍTULO

8

Método de Trabajo

8.1. Introducción.

Este estudio se ha llevado a cabo en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, una vez examinada la documentación presentada, en cumplimiento de la ley de 17344 RD 214/1997.

Los animales que participan en este experimento proceden del único centro nacional encargado de la cría y suministro de minipigs, la Universidad de Córdoba, donde disponen de un Servicio Centralizado de Animales de Experimentación. Previo al traslado, los cerdos se someten a unas pruebas de saneamiento, presentando serología negativa y certificado correspondiente de animales libres de enfermedad infectocontagiosa alguna. Éstos son trasladados al Bioterio de la Unidad de Investigación del Negrín después del consentimiento de la Consejería de Ganadería de Las Palmas. En este proceso, se realizó un escrito formal comprometiéndonos a que el transporte de los animales fuera cerrado y homologado, y a que éstos no se iban a utilizar para reproducirse. Además, se prometió que los animales serían eutanasiados en un periodo máximo de 6-9 meses. Por tanto, estos animales que nacieron y se criaron en régimen de total confinamiento, se trasladaron en condiciones garantizadas y cerradas hasta el animalario del Negrín, donde los animales se mantuvieron con el mismo grado de confinamiento y aislamiento, siendo sólo atendidos por personal acreditado.

Los animales permanecieron estabulados en el animalario de la citada Unidad de Investigación durante el tiempo que duró el estudio, en condiciones de aislamiento y bajo control de las variables ambientales (temperatura, ventilación, humedad y luz), cumpliendo los puntos de la Directiva del Consejo 86/609/CEE respecto al bienestar animal.

Durante el periodo prequirúrgico, se ha supervisado y cuidado el estado físico óptimo de los animales. Del mismo modo, se ha realizado el control y seguimiento postoperatorio de los animales durante todo el experimento.

Una vez finalizado el periodo del uso de los elementos protésicos implantados en cada uno de los animales se procedió a la eutanasia reglada según el calendario de intervenciones. La eutanasia será de manera humanitaria mediante sobredosis de barbitúricos. Una vez eutanasiado cada animal se procederá al estudio macroscópico de las estructuras implantadas y se realizará el rescate de los implantes para el procesado adecuado de las muestras y su posterior estudio histológico.

El modelo animal elegido para las pruebas *in vivo* es el minipig ya que presenta algunas ventajas frente a otros modelos (madurez inmunológica a los nueve meses, manejables debido al tamaño, gran resistencia a las intervenciones quirúrgicas y a los periodos de convalecencia). El estudio se llevó a cabo con 11 hembras minipigs, entre 25-30 Kg de peso, y homogéneos somáticamente (igualdad de sexo, peso y edad) para asegurar una respuesta biológica estandarizada, fiable y reproducible, de los cuales a 10 se le implantaron placas y se reservó un minipig como blanco. El tiempo de implantación de las placas en el modelo animal fue aproximadamente de seis meses, y consumido éste, se eutanasiaron a los animales. Acto seguido, se rescataron los implantes y se comenzó a realizar la recogida de muestras de distintas partes del cuerpo del animal (hueso con implante, cerebro, hígado,...) para su posterior estudio.

8.2. Elección de un modelo animal y estudio biomecánico.

El modelo animal elegido para los ensayos *in vivo* es el minipig frente a otros modelos ya que, a pesar de que el minipig tiene un rango de movilidad de la rodilla muy inferior a otras especies animales cuadrúpedas, presenta algunas ventajas.

Species	Breed	Age at Skeletal Maturity (years)	Weight at Skeletal Maturity (kg)	Defect Commonly Used	Cartilage Thickness at Femoral Condyle (mm)	Critical Size Defect (mm)
Rabbit (Leporine)	New Zealand White	0.75	3-4	FC, TG, TP, P	0.25-0.75	3
Dog (Canine)	Mixed, Beagle	1-2	15-30	FC, TG, P	13	
Pig (Porcine)	Minipig	0.8-1	20-40	FC, TG		
Sheep (Ovine)	Suffolk, Texel	2-3	35-80	FC, TG	17	7
Goat (Caprine)	Dairy, Boer Cross, Spanish	2-3	40-70	FC, TG, TP, P	15-2	
Horse (Equine)	Mixed, Thoroughbred, Quarter Horse	2-4	400-500	FC, TG, RC	2-3	9
Human	N/A	16-21	70	FC	2-3	

Tabla 1. Animal Models used in the assessment of cartilage repair. FC- femoral condyle; TG trochlear groove; TP- tibial plateau; P- patella; RC- radial carpal

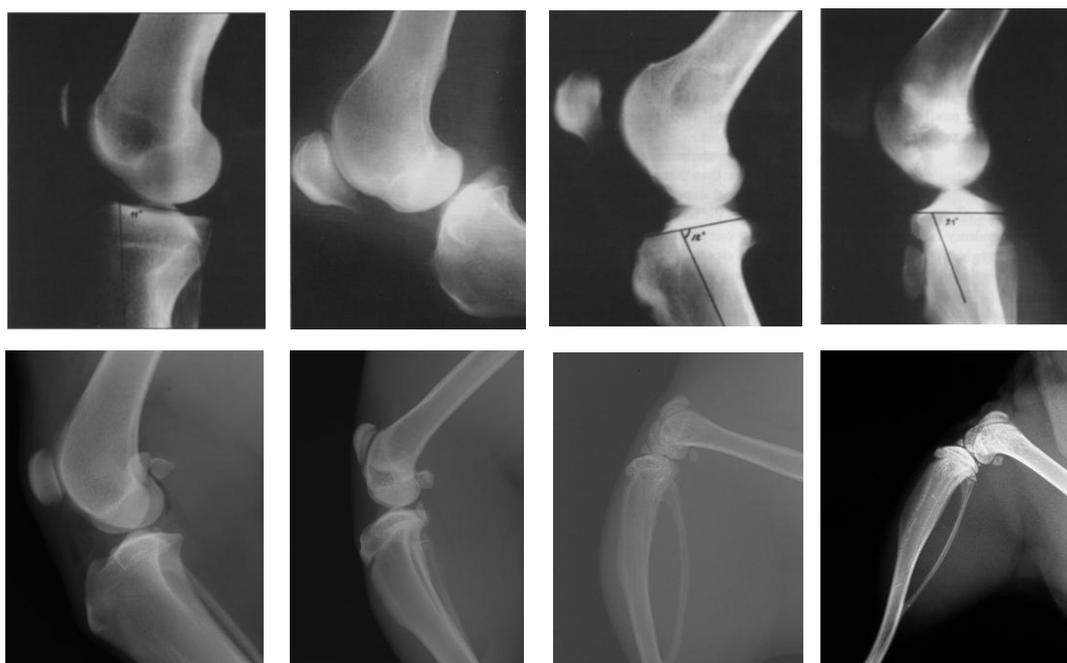


Ilustración 14. De izquierda a derecha y de arriba abajo, se exponen las siguientes articulaciones: humano, cabra, oveja, cerdo, perro, conejo, rata y ratón.

Son animales que alcanzan la madurez inmunológica a los nueve meses, frente a los casi tres años del resto de razas y son mucho más pequeños y manejables que los otros cerdos (40 Kg frente a los casi 100 de otras razas). Además, tienen gran resistencia a las intervenciones quirúrgicas y a los periodos de convalecencia. Aceptan perfectamente la anestesia y responden a las medicaciones. En otro tipo de razas se producen muertes repentinas en la fase operatoria.

Una vez escogido el animal, se inició el proceso de estudio de la anatomía porcina para decidir la metodología de implantación e identificar todos aquellos parámetros que podían ser críticos.

Tal y como se puede observar en la siguiente ilustración, el **abordaje** más sencillo es el **anteromedial**. La posición y geometría de la estructura ligamentosa, meniscos y cápsula nos **hace reconsiderar** la posibilidad de **implantar** una **prótesis articular de rodilla**, ante el riesgo de que dañara cualquiera de estas estructuras, con lo que distorsionaríamos la transmisión de carga que va a experimentar la prótesis durante la experimentación, al haber incapacitado parcial o totalmente al minipig para que camine.

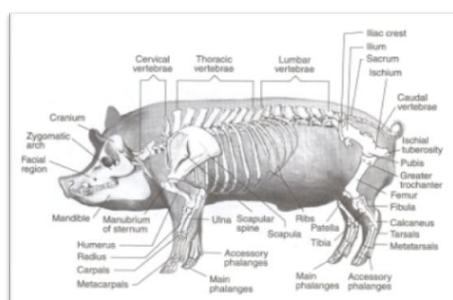


Ilustración 15. Esqueleto de un cerdo.

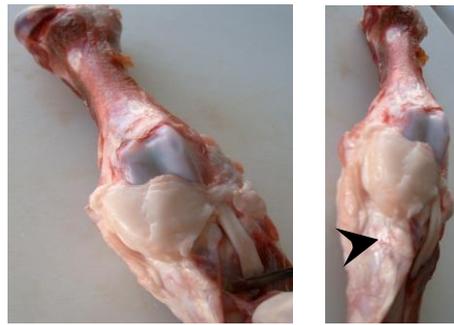


Ilustración 16. Rodilla de un cerdo.

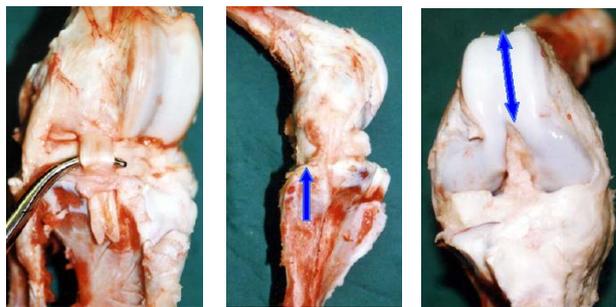


Ilustración 17. Anatomía extremidad trasera porcina.

Entre las diferencias morfológicas existentes con la especie humana, se incluye la existencia del tendón conjunto del tibial anterior y III peroneo, inexistente en la especie humana, que crea un surco en la cara anterior de la tibia (vertiente externa). Por otra parte evidenciamos un mayor ascenso de la cabeza del peroné que llega a articularse con el cóndilo femoral presentándose como prolongación del platillo tibial externo, así como la magnitud de la tróclea femoral debida a la hipertrofia del aparato extensor por hábito cuadrúpedo.

Tras analizar estas limitaciones, se decidió que la **estrategia idónea** sería **reproducir una osteotomía** en la **tibia** proximal e **insertar** una **placa** en la ranura realizada, no sólo por evitar los riesgos anteriormente mencionados, sino para asegurarnos una transferencia de carga al dispositivo implantado. Dicha osteotomía se realizará en la zona interna de la tibia, por presentar una zona plana ideal para fijar la placa.

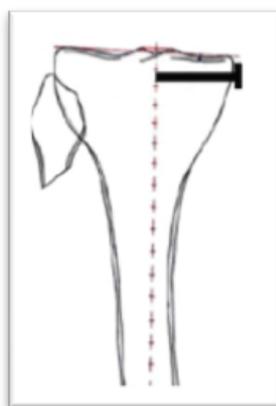


Ilustración 18. Situación de la placa en una cabeza tibial porcina.

8.3. Diseño de un protocolo de implantación, seguimiento y rescate.

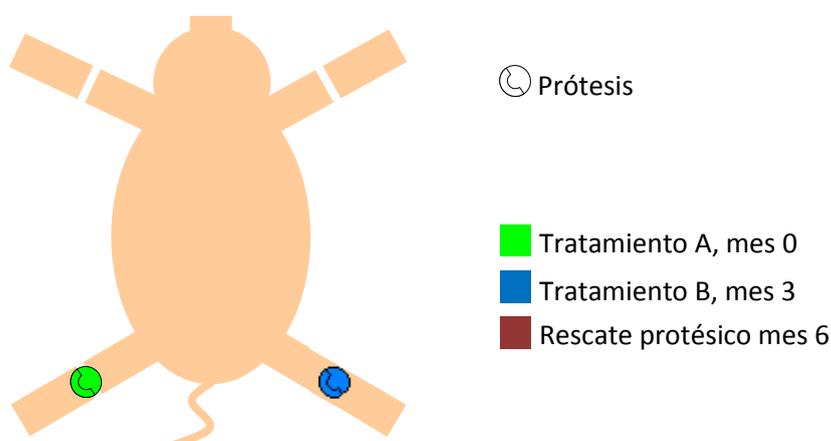
El estudio pretende **evaluar** el **comportamiento** de **dos tratamientos superficiales** (A y B) sobre una aleación de titanio (**Ti-6Al-7Ni**) *in vivo*, con el objetivo de analizar el **comportamiento osteinductivo** de los dos tratamientos superficiales en distintas condiciones fisiológicas y frente a distintas sollicitaciones mecánicas.

El tratamiento superficial A se realiza por ataque ácido más tratamiento térmico, mientras que el B se lleva a cabo mediante un tratamiento químico por inmersión, consistente en un tratamiento SBF más un tratamiento biovitrocerámico. Este tratamiento tarda 20 días en ser aplicado.

Con el objetivo de llevar un control de la implantación, a los implantes con el tratamiento A se le asignan números impares y al tratamiento B, números pares. Además, todos los implantes deberán arenarse con corindón, PK-150 para obtener una superficie rugosa.

Con el protocolo de implantación para el ensayo se pretende asegurar en el tiempo la buena fijación de los implantes y minimizar los tiempos de intervención de los animales al realizar las operaciones en dos grupos.

El ensayo tipo tiene una duración de seis meses e incluye una implantación protésica en la rodilla izquierda con el tratamiento A, y otra implantación en la rodilla derecha con el tratamiento B de cada minipig, como se observa en el esquema. El experimento se realizó sobre once animales, divididos en un animal de control (blanco) y dos grupos de cinco cerdos. Cada animal, menos el de control, será intervenido para implantar el material y sacrificado a los 6 meses para el rescate y el análisis del material implantado. Se realizará control radiográfico periódico del material implantado a los siguiente tiempos: post operatorio, 1 mes, 3 meses, 6 meses. El material implantado posteriormente a la primera intervención tendrá obviamente los controles radiográficos del tiempo que ha estado implantado. A continuación, se presenta un resumen de las intervenciones realizadas en cada animal y los tiempos de implantación.



Esquema 1. Diagrama de implantación.

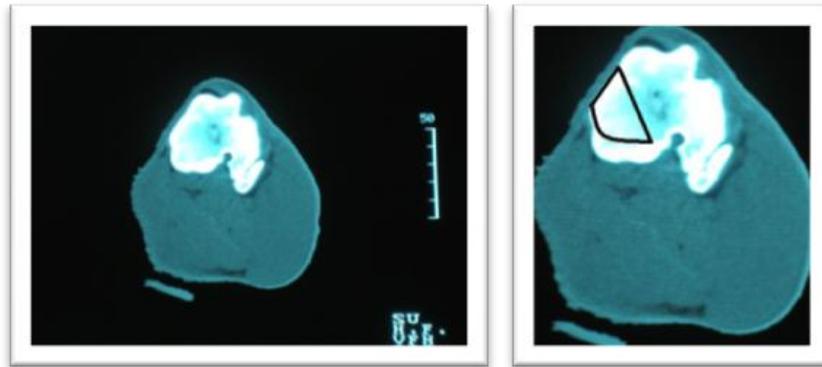


Ilustración 19. TAC de una cabeza tibial de cerdo y dibujo aproximado del área de trabajo de la placa.

Por tanto, el diseño final de la placa es triangular, con uno de los lados curvos. Presenta una zona perpendicular al corte, dotada de dos colisos de 4 mm de anchura, para permitir fijarla al hueso por medio de dos tornillos de $\varnothing 3.5\text{mm}$. A continuación, se muestran dos vistas del implante.



Ilustración 20. Diseño de la placa tibial.

En la siguiente ilustración vemos un montaje en el que se representa el aspecto final que tendrá la placa implantada sobre la rodilla del minipig, basándonos en una imagen tomada de una TAC (Tomografía axial computerizada).



Ilustración 21. Montaje de la placa implantada sobre una TAC de minipig.

En un paso posterior, cuando se realizó una prueba preliminar en un cerdo muerto, se decidió rediseñar la placa porque ésta era demasiado grande. El nuevo diseño se muestra en la siguiente imagen:



Ilustración 22. Placa tibial recortada.

8.5. Fabricación de los implantes.

Tanto las placas como los pines fueron fabricados a partir de dos lingotes de Ti6Al7Nb, proporcionados por la empresa S.C. ZIROM, S.A. Los lingotes se cortaron en bloques mediante una sierra de cinta. Posteriormente, mediante un centro de mecanizado, se talló la forma de la placa en cuatro operaciones.

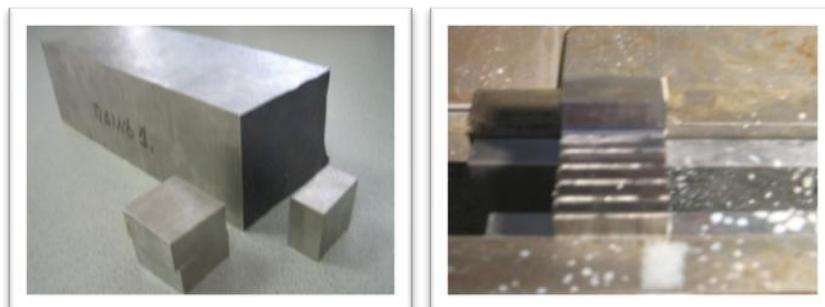


Ilustración 23. Corte del lingote en bloques y mecanizado de una cara.



Ilustración 24. Primera fase terminada y mecanizado de la segunda cara.

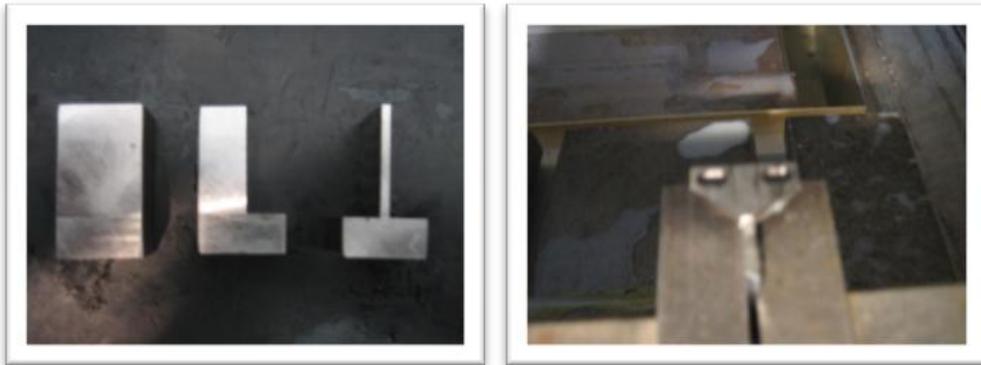


Ilustración 25. Mecanizado del espesor de la aleta. Mecanizado de la zona de sujeción al hueso, incluyendo los colisos.



Ilustración 26. Dando la forma final a la aleta.

Una vez obtenidas las placas se pulieron con una lijadora de banda las caras de la aleta para eliminar marcas, y después se introdujeron en una máquina vibradora con plaquitas de cerámica para eliminar las rebabas. El siguiente paso fue lavar las placas en un baño de ultrasonidos, con un poco de disolvente orgánico para eliminar cualquier resto de grasa. Posteriormente se les dio un acabado rugoso mediante una máquina de chorreo de arena, usando arena de corindón de un tamaño de grano de 150 micras.



Ilustración 27. Acabado superficial: Pulido y vibradora.



Ilustración 28. Acabado superficial: baño de ultrasonidos.



Ilustración 29. Placas terminadas.

Como se comentó, la placa tibial inicial hubo que recortarla porque era demasiado grande. Por tanto, se procedió a recortarlas según el nuevo diseño. Nuevamente se lavan en baño de ultrasonidos para eliminar cualquier rastro de polvo. El último paso fue clasificarlas y marcarlas con láser, a fin de identificarlas.



Ilustración 30. Comparación de ambas placas tibiales.



Ilustración 31. Placa tibial recortada.

Para once animales se necesitan veintidós placas (dos implantes por animal, cada placa con un tratamiento distinto), pero se decide fabricar más para prever que alguna se caiga al suelo durante la operación y haya que sustituirla. Se hicieron un total de cuarenta (40) placas, de las cuales sólo treinta (30) fueron viables. Las placas viables se marcaron consecutivamente, del 01 al 30.

Durante la operación realizada al cerdo muerto, se detectó la necesidad de fabricar una pieza de instrumental que, a su parecer, ayudaría a realizar las operaciones. Tal y como vemos en la ilustración, se trata de modificar el retractor para que el vástago del instrumento presente una cierta curvatura o ángulo (cercano a los 45º) de forma que, con un pequeño desplazamiento del mango, se consiga un mayor movimiento del hueso. Esta pieza de instrumental ayuda a para insertar la placa tibial y los tornillos que la sujetan.



Ilustración 32. Instrumental de apoyo a las intervenciones. Retractor.

La esterilización de las placas fabricadas para su implantación en los minipigs, se llevó a cabo en un autoclave de la Unidad Experimental del Hospital Universitario Doctor Negrín por personal cualificado, así como su empaquetado en un blíster sellado.

8.6. Descripción de proceso de implantación.

Con el objetivo de realizar una planificación adecuada de las intervenciones y una puesta a punto de la metodología a seguir, se realizó una prueba preliminar sobre un cerdo muerto en la que se concluyó colocar la placa tibial en la cabeza tibial en posición medial. De esta forma se aborda la cabeza tibial desde su parte interna, carente de musculatura y vasos importantes.

Las placas se fijaron con tornillos comerciales de titanio, de la aleación Ti6Al4V, ya que no hay documentados casos de corrosión por par galvánico al poner esta aleación en contacto con la Ti6Al7Nb, que es la que se va a implantar.

También se detectó la necesidad de disminuir el tamaño de la placa y de fabricar un instrumental, retractor, de ayuda a la implantación de la placa.



Ilustración 33. Marca que indica la posición de la meseta tibial y el lugar donde se va a implantar la placa. Incisión en la piel para acceder al hueso.



Ilustración 34. Incisión en la cabeza tibial mediante sierra oscilante. Colocación de la placa.

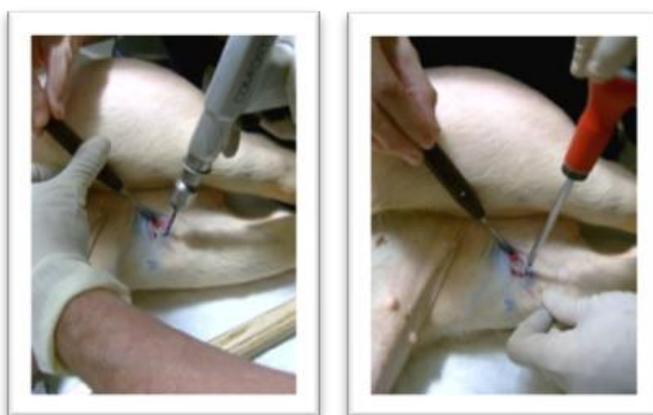


Ilustración 35. Taladrado de los agujeros para los tornillos y colocación de los tornillos de esponjosa.

Todos los animales de experimentación fueron sometidos al mismo tipo de intervención quirúrgica, realizando rigurosamente la misma secuencia de actos que se detallan a continuación. El quirófano respetaba todas las normas de asepsia y antisepsia respecto al animal, los medios materiales empleados y respecto al cirujano y ayudantes.

Enseguida, describimos el proceso llevado a cabo durante la intervención de uno de los minipigs escogidos en este estudio.

En primer lugar se lleva a cabo la identificación del cerdo que se va a intervenir y, aproximadamente una hora antes¹, se le administra sedación vía oral con el objetivo de que el animal se deje manipular posteriormente para llevarlo a quirófano.

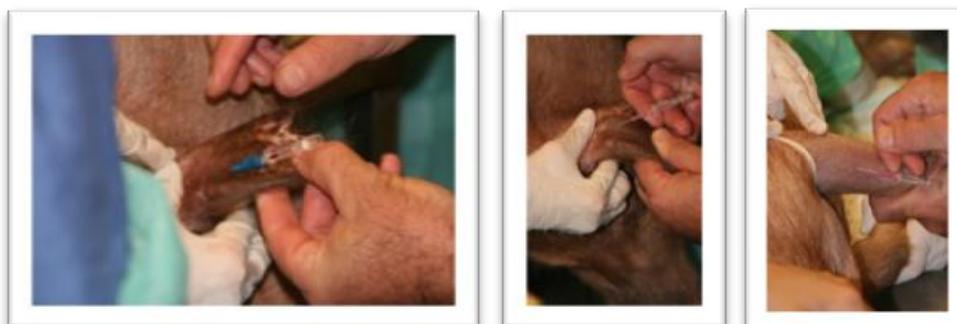


Ilustración 36. Identificación del animal.

Durante todo el procedimiento quirúrgico de este estudio se garantizó la correcta anestesia de los animales y su monitorización completa, estableciendo un protocolo anestésico apropiado para cada animal en aras de asegurar la máxima supervivencia de los individuos del experimento. Los animales fueron tratados de la manera más indolora posible y se utilizó anestesia inyectable para la inducción y anestesia inhalatoria para el mantenimiento del animal con la administración de agentes analgésicos necesarios para evitar el sufrimiento innecesario de los animales. Concretamente, se empleó *xilacine* y *ketamina* para la sedación, *sodio thiopental* para la inducción e *isofluorano* para el mantenimiento. La ventilación es espontánea.

Además, para el control del dolor intraoperatorio se administró una disolución de dos compuestos, *IV fentanyl slow infusion* más *midazolam*; en la postinducción se administró *IV antibiotherapy sodium cefazoline*. En el postoperatorio, a los cinco días, inyección con *ceftiur (naxcel)*.

Una vez colocado el animal en la mesa de quirófano, se procede a la selección de las venas adecuadas para coger las vías, generalmente en la parte posterior de la oreja y en el miembro inferior, para la administración de anestesia durante la operación.



¹ Hay que advertir que la duración de este proceso depende del animal, necesitando algunos más sedación que otros.

Ilustración 37. Colocación de vías intravenosas para la administración de sedación.

Acto seguido, se intuba el animal para la administración de anestesia inhalatoria y se monitorizan sus constantes vitales con el objetivo de tener un control mayor de la intervención y de la vida del animal.

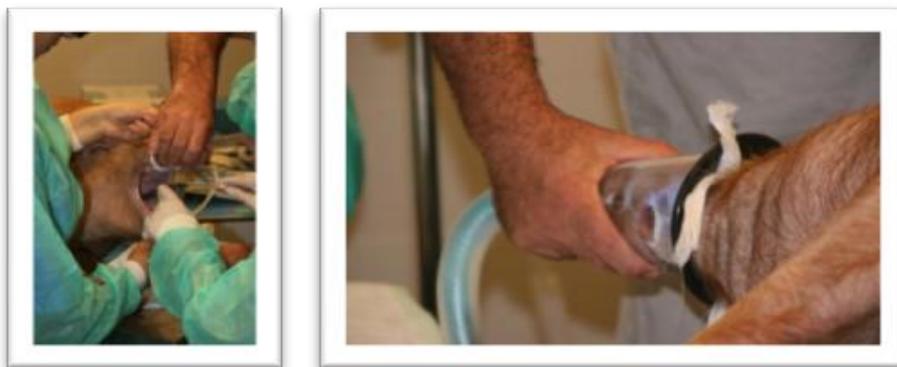


Ilustración 38. Intubación para administración de anestesia inhalatoria.



Ilustración 39. Monitorización de las constantes vitales del animal.

Después se procede a realizar la asepsia de la zona quirúrgica eliminando el pelo y limpiando dicha zona con agua jabonosa.



Ilustración 40. Preparación del animal para la intervención. Afeitado y limpieza.

Terminado el proceso de preparación del animal, se prepara el instrumental quirúrgico esterilizado y el implante. Además, se toman los datos del cerdo y la referencia de la placa y se rellena la hoja de *Control de la Intervención*. También se tomaron datos de la hora de inicio y finalización de la intervención.

También se prepara el instrumental convenientemente esterilizado y la placa con los tornillos que se van a implantar.

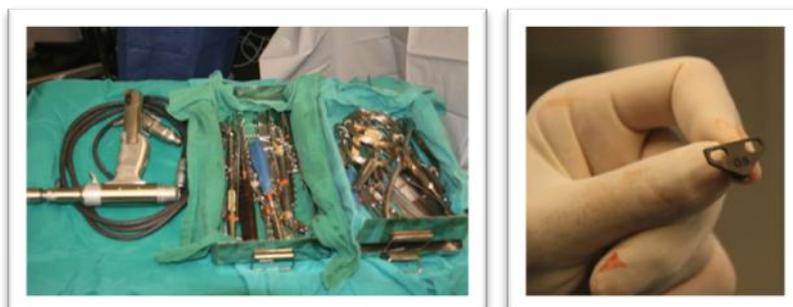


Ilustración 41. Instrumental quirúrgico e implante (placa tibial).

El proceso comienza con la localización de la zona de la meseta tibial donde se va a implantar la placa y la incisión en la piel con un bisturí para acceder al hueso. Se emplean unos separadores para despejar el campo quirúrgico.

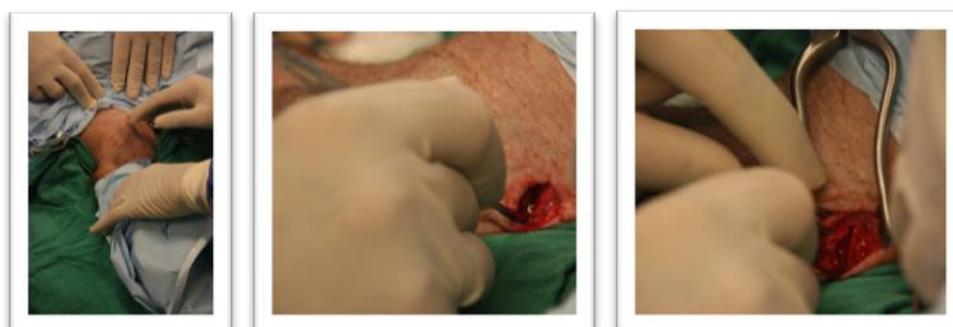


Ilustración 42. Localización de la zona de la meseta tibial donde se va a implantar la placa. Incisión en la piel.

Con una sierra oscilante se realiza una osteotomía en la cabeza tibial con el objeto de colocar la placa. Posteriormente, se realizan unos agujeros con el taladro para insertar los tornillos corticales de fijación del implante. Durante todo el proceso es necesario emplear irrigación salina externa para refrigerar los materiales.

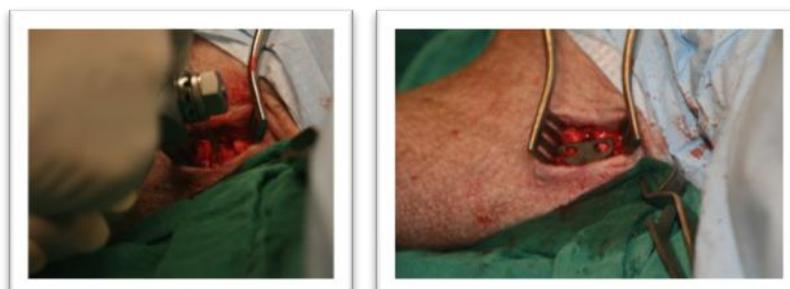


Ilustración 43. Incisión en la cabeza tibial mediante sierra oscilante. Colocación de la placa.



Ilustración 44. Taladrado de agujeros y colocación de los tornillos de fijación del implante.

Finalizada la colocación de la placa, se sutura la herida con sutura reabsorbible (*vicryl 3-0*) y se realiza el vendaje del miembro inferior afectado. La analgesia se administra mediante un parche de *Fentanil 50 µg* colocado en el lomo.



Ilustración 45. Proceso de sutura de la herida y vendaje.

Debido a que los animales operados se estabulaban juntos y se comían los parches los unos a los otros y se los arrancaban en el establo, en posteriores intervenciones se decidió no seguir colocando el parche y sustituir el *fentanilo* por inyecciones de *buprenofina*.



Ilustración 46. Colocación de parche de antibiótico.

Finalmente, se efectúan varias radiografías del implante, según el protocolo establecido, con la finalidad de asegurar la buena implantación y se traslada el animal operado al establo, donde se le hará el seguimiento postquirúrgico.



Ilustración 47. Radiografía posterior a la intervención para asegurar la buena implantación.

En este experimento, durante todo el proceso de anestesia, se encontraron las complicaciones que a continuación se detallan:

- Talla del animal, debido a que eran muy grandes y complicado manipularlos.
- Agresividad del animal.
- Dificultad para colocar una vía en vena debido a que la sedación no fue lo eficiente que se esperaba.
- Dificultad para controlar el dolor del postoperatorio debido a que los animales se comían el parche de *fentanyl*.

8.7. Rescate del material protésico.

Siguiendo el protocolo establecido en este experimento, después de seis meses de haber sido implantada la placa, se procede a la eutanasia reglada según el calendario de intervenciones y mediante sobredosis de barbitúricos de manera humanitaria, en la Facultad de Veterinaria, sección de necropsias.

Se rescataron los huesos con los implantes para estudiar la osteointegración y se recogieron muestras de tejido para efectuar el análisis toxicológico. En concreto, se tomaron cinco muestras de cada animal de distintas partes del cuerpo (cerebro, grasa, riñón, bazo e hígado), es decir, se recolectaron 55 muestras, 50 muestras de los minipigs con las placas implantadas y 5 muestras del blanco.

De igual forma que para las intervenciones, se estableció un protocolo para el rescate del material implantado especificando el orden detallado y corte de las muestras.

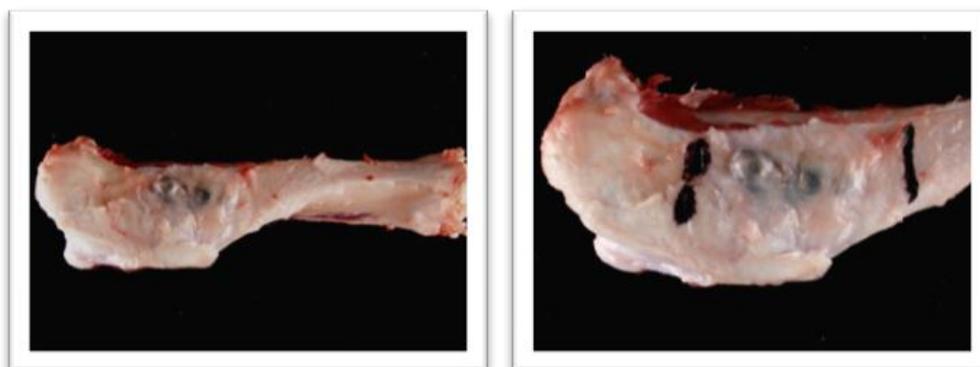


Ilustración 48. Recuperación de implantes.

Antes de realizar los cortes en las muestras para su posterior estudio histológico, se estudió las muestras recogidas y se estableció un plan de cortes en el modelo virtual.

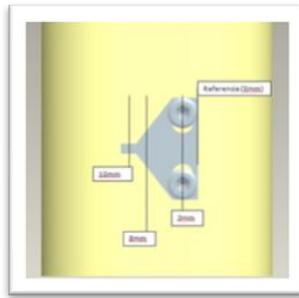


Ilustración 49. Plan de cortes en el modelo virtual.

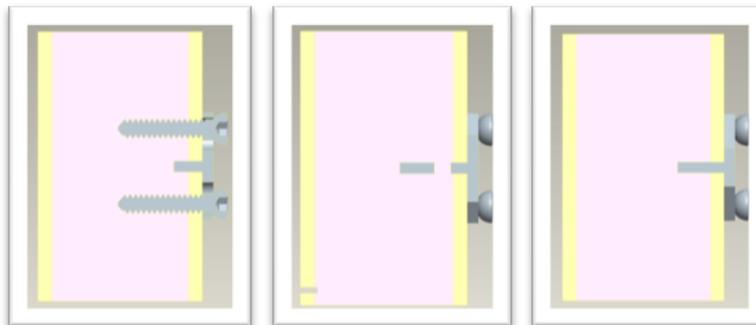


Ilustración 50. Cortes virtuales.

En efecto, observando una de las muestras solo se aprecian los tornillos que mantienen la placa debido a que hay tejido conectivo fibroso localizado encima de los implantes. Los cortes se hicieron con una sierra, siempre guiándonos de la radiografía que nos da información exacta de la localización de los tornillos, con el objeto de reducir el tamaño de la muestra para facilitar la posterior inclusión en bloques de resina, el corte en el microtomo y su interpretación al microscopio.

CAPÍTULO

9

Técnicas Aplicadas

9.1. Generalidades.

Los biomateriales son una clase de materiales de uso médico, dental o de aplicación farmacéutica, que se encuentran en íntimo y sustancial contacto con los tejidos del cuerpo. Se distinguen de los demás materiales en que tienen una serie de propiedades químicas, físicas y biológicas, que les permiten mantenerse en un medio extremadamente hostil hacia ellos.

La aceptabilidad biológica, es decir la biocompatibilidad, podrá ser examinada en varios niveles de interacción:

- La interacción entre el material y el tejido.
- La reacción resultante de la degradación del material.
- Factores mecánicos.

Esta Tesis tratará la degradación sufrida por el material en unas condiciones parecidas a las del cuerpo humano. La corrosión de un metal implantado provoca la liberación de iones, en nuestro caso iones de titanio, que pueden provocar inflamaciones dependiendo de la cantidad liberada siendo el material tóxico para su uso.

De lo expuesto anteriormente se deduce que determinar la cantidad de iones liberados al entorno por parte del material usado es importante para conocer su nivel de toxicidad y, por lo tanto, definir si el material en cuestión puede implantarse en el cuerpo.

La finalidad de este trabajo consiste en el estudio del comportamiento “*in vivo*” de una placa fabricada con una aleación de titanio Ti6Al7Nb, sometida a dos tratamientos superficiales distintos, A y B. Este

material que es poco frecuente en los implantes médicos. Lo que se pretende es determinar y evaluar el contenido de metales procedentes del implante de titanio Ti6Al7Nb presente en los fluidos biológicos de los animales de experimentación escogidos (minipig), los efectos sobre las características mecánicas del hueso y el comportamiento de la interfase implante metálico-hueso.

La composición química de las aleaciones que se emplean en las prótesis diseñadas para los implantes, establecen de forma clara el panel de los analitos a investigar (*titanio, aluminio, niobio*).

El proceso consistirá en establecer los métodos y las técnicas de análisis más fiables que nos permitan evaluar el efecto de la placa metálica "*in vivo*" sobre su entorno (debilitación de hueso, crecimiento óseo, inducción ósea), así como su toxicidad, ya que la toxicidad de cada uno de los elementos de posible incorporación a los animales debe ser evaluada meticulosamente. Todos los resultados obtenidos se compararán con un blanco (un animal sin placas).

Efectivamente, para la determinación de metales en una muestra, se dispone de las estrategias de **Emisión Atómica**, cuyo método de atomización incluye la incorporación de Plasma Acoplado (ICP-AES), y de **Absorción Atómica**, cuyo proceso de atomización es electrotérmico (cámara de grafito, AAS).

La sensibilidad de la técnica depende de los límites de detección y éstos, a su vez, son función de la estrategia elegida, así como del analito a determinar y de las técnicas preparativas que se realicen sobre la muestra, las cuales van a estar intrínsecamente supeditadas a la naturaleza de la matriz de la cual se extraiga el analito.

En términos generales, los límites de detección son más bajos con la estrategia de absorción atómica con atomización electrotérmica (cámara de grafito) aunque existen claras excepciones, como son los casos del Boro, Disprobio, Erbio, Europio, Iridio, Fósforo y Titanio, en los que se obtienen mejores límites de detección con la estrategia de Emisión con Plasma Acoplado que con la estrategia de Absorción.

Se debe tener presente que existen metales que no pueden ser detectados mediante la estrategia de absorción atómica con cámara de grafito, bien porque su determinación está sujeta a interferencias insuperables (caso de la determinación del carbono elemental), bien porque es imposible conseguir una lámpara de cátodo hueco comercial capaz de ser usada como fuente estable de emisión para la determinación. En resumen, en cualquiera de estas circunstancias tenemos los siguientes metales: W, Zr, U, Tm, Th, Ta, Sc, Sm, S, Re, Pr, Os, Nd, Nb, N, Lu, La, I, Ho, Hf, Gd, Cl, Ce, C y Br.

Como puede observarse, estas limitaciones nos definen ya de una manera inequívoca cuál es la estrategia a seguir para el control de nuestros analitos y, por consiguiente, la técnica a emplear en el caso del aluminio es la de absorción atómica.

Por otro lado, con el objetivo de determinar las características morfológicas y topográficas de las muestras, así como la distribución cualitativa y cuantitativa de elementos químicos, se han empleado el microscopio electrónico de barrido (SEM) y un analizador EDX.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica

del material analizado, es decir, es un instrumento que permite obtener fotografías tridimensionales con una alta resolución y una gran profundidad de campo, en las que se puede apreciar la ultraestructura de muestras microscópicas detallando de manera extraordinaria sus características morfológicas y topográficas. También se puede observar cualquier tipo de espécimen o de materiales orgánicos (crustáceos, plantas, parásitos, hongos, invertebrados, plancton, protozoarios, bacterias, tejidos, músculo, células, neuronas, cabello y pelo) y materiales inorgánicos (industria petroquímica, biodeterioro de obras y artes, pintura, papel, enlatados, balística, material geológico, material de electrónica y computación, metales, aleaciones, plásticos, vidrios, etc.), [1] [2].

El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (*Secondary Electron Image*), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (*Backscattered Electron Image*), y un detector de energía dispersiva EDX (*Energy Dispersive Spectrometer*) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas. Con el analizador EDX se puede identificar la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos químicos que se encuentran presentes en la muestra, mostrando gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución. Es pertinente señalar que el analizador EDX de rayos x identifica y evalúa el contenido de elementos químicos desde el carbono al uranio en superficies planas o secciones finas de las muestras en todo tipo de material, biológico e inerte, [3].

Además de la obtención de un espectro químico en un punto concreto de la muestra, existen dos formas gráficas de obtener información de la señal de rayos X:

- Los perfiles de línea que permiten identificar gráficamente la variación de la concentración de uno o varios elementos entre dos puntos.
- Los mapas de RX que sirven para ver gráficamente la distribución de los elementos en la zona seleccionada, asignando un color diferente a cada uno.

Los mapas de RX también ofrecen imágenes semicuantitativas de la concentración de los elementos mediante la densidad de puntos de un determinado color en la zona, [4].

En resumen, el microscopio electrónico proporciona información directa de las estructuras que oscilan entre 0.2 y 200 nm, lo que aumenta extraordinariamente las posibilidades de investigación en las distintas ramas de la ciencia. La emisión secundaria se utiliza en la construcción de la imagen en el microscopio electrónico de barrido, el cual a diferencia de los microscopios electrónicos de transmisión, posee un haz móvil de electrones que “barre” o recorre el espécimen en áreas seleccionadas.

Con el fin de posibilitar un mejor entendimiento de los resultados que se obtendrán posteriormente, a continuación se explicará brevemente en qué consiste cada una de estas técnicas.

9.2. Condiciones de trabajo.

A la hora de realizar un estudio, es preciso llevar a cabo un determinado proceso de preparación antes de cada prueba. Este proceso exige la selección, identificación, preparación y limpieza de cada una de

las muestras a estudiar, debiendo realizarse con sumo cuidado y dedicación. De estas fases del proceso dependerán, en gran medida, que los resultados puedan considerarse válidos o no y, en el caso de ser válidos, de que puedan compararse para así obtener conclusiones.

A continuación se describirán brevemente los pasos más significativos de este proceso de preparación, aunque posteriormente serán concretados para cada una de las pruebas que se lleven a cabo en la presente Tesis Doctoral.

9.2.1. Selección de las muestras.

Las formas más apropiadas de las muestras para cada prueba dependen siempre de varios factores [5], como pueden ser: el tipo de prueba o ensayo, el lugar, lo que se desee estudiar, las limitaciones y especificaciones de los equipos o aparatos, entre otros.

Identificación de muestras

Se debe elegir con especial cuidado la forma de identificar cada muestra y su posterior colocación, con el fin de minimizar las posibilidades de que esta marca sea borrada durante su conservación o durante la prueba [5].

Tamaño y forma de las muestras

Las características físicas de las muestras, dependen de varios factores. Por ello este apartado lo desarrollaremos clasificando las muestras según la prueba a la que vayan a ser sometidas.

- **Ensayos microscópicos**
Para este tipo de ensayos, el corte de la probeta puede realizarse con sierra o con disco abrasivo y en ambos casos, pero sobre todo en el último, debe cuidarse que la refrigeración sea intensa, para evitar que el calentamiento modifique la constitución original de la pieza. Respecto al tamaño de la probeta, el más adecuado, en general, es de 20 a 25 milímetros de ancho por 50 milímetros de largo y de 10 a 12 milímetros de grueso.
- **Ensayos de dureza**
El tamaño y forma de la probeta o muestra, es independiente de los resultados obtenidos en este tipo de ensayos. Aún así, es preferible que dicha probeta disponga de dos caras planas paralelas (una para realizar la prueba y la otra para apoyarla en la máquina). En este ensayo se toma como regla general que el espesor de la probeta sea 1.5 veces superior a la diagonal de la huella.
- **Ensayos de corrosión**
Para las pruebas de corrosión suele ser mucho más ventajoso que las muestras sean relativamente delgadas. En el caso de que haya de llevarse a cabo una comparación eficaz de muestras diferentes, sobretodo en algunos métodos de valoración, tales como la pérdida de resistencia, es muy importante la normalización del grosor de dicha muestra; ya que se ha demostrado que el grosor inicial del metal puede afectar profundamente al proceso de corrosión y a los resultados de las pruebas, como también se ha argumentado la influencia del área de la superficie de la muestra sobre la intensidad de la corrosión.

Cuando se trate de pruebas de corrosión por tensiones, es más práctico exponer una superficie suficiente para evitar que el área real tenga una influencia importante sobre los resultados.

Siempre es aconsejable utilizar, hasta donde sea posible, un tamaño estándar y formas sencillas para asegurar la obtención de resultados comparables [5].

9.2.2. Preparación de las muestras.

Ensayos microscópicos

Los requisitos que debe cumplir una probeta para ser observada microscópicamente son, por un lado, ser plana, ya que en caso contrario los grandes aumentos de los sistemas ópticos no permitirían enfocar la imagen simultáneamente de planos situados a distintos niveles, y, por otro, estar pulida, con el fin de asegurarnos que lo que observamos son únicamente los detalles de su estructura [6]. Estos dos requisitos se consiguen mediante el procedimiento que se describe a continuación.

- **Desbaste:** Se desbasta pasando la probeta sucesivamente por papeles abrasivos de granos cada vez más finos. Se comienza con el papel de esmeril del número 180 y se acaba con el 600. Cada vez que se cambie el papel, debe lijarse en sentido perpendicular al de lijado anterior hasta que las rayas desaparezcan por completo, insistiendo un poco en cada dirección para eliminar cualquier deformación plástica bajo la superficie; por otro lado, la presión de la probeta sobre el esmeril debe ser suave, para evitar la distorsión y rayado excesivo del metal. Esta operación puede realizarse a mano o con una pulidora de disco. Una vez terminada esta fase, la probeta debe lavarse y limpiarse perfectamente para pasar a la siguiente.
- **Pulido:** Se realiza con pulidoras de discos que se cubren con unos paños impregnados en diferentes abrasivos. El tipo de paño y de abrasivo depende del material de la probeta, aunque el abrasivo más utilizado es polvo de alúmina. El pulido se realiza presionando la probeta suavemente sobre el disco y moviéndola constantemente del borde al centro para evitar la formación de rayas y arrastres entre fases de distinta dureza, o inclusiones.
- **Ataque:** La probeta debe ser atacada por un reactivo que actúa de forma selectiva sobre los diversos constituyentes estructurales (fases, límites de grano, impurezas, zonas deformadas, etc.). Para ello existen reactivos adecuados, no sólo para cada metal, sino para hacer resaltar en un mismo metal constituyentes distintos. Este proceso se desarrolla de la siguiente forma: se lava primero la probeta con agua, al ser posible caliente, se seca y se vuelve a lavar con alcohol etílico, y se vuelve a secar. A continuación se sumerge en el reactivo con la superficie pulida hacia abajo, sujetando la probeta con unas pinzas, sin que en ningún momento llegue a tocar el fondo del recipiente, para que no se raye, y agitándola para eliminar las burbujas de aire. El tiempo de ataque varía dependiendo del reactivo y los aumentos con que se ha de observar la probeta. Después del ataque se lavará de nuevo la probeta con abundante agua.

Ensayos de dureza

El único requerimiento para este ensayo, en lo que a la preparación de las muestras se refiere, es que la superficie sobre la que vaya a aplicarse el ensayo debe estar completamente limpia, pulida y exenta de defectos para que los resultados sean válidos.

Para obtener estas condiciones en la superficie de la probeta, se desbastará y pulirá la misma según se describe en el contenido del apartado anteriormente expuesto (ensayos metalográficos).

Ensayos de corrosión

La película que se forma sobre la superficie del metal, por exposición al aire, durante o después de la preparación de dicha superficie, tiene con frecuencia un importante efecto sobre la corrosión subsiguiente, por ello el método de preparación de la superficie tiene gran importancia, sobre todo cuando se trata de pruebas en soluciones corrosivas; por ello es aconsejable normalizar dicho método.

La preparación mecánica de las muestras puede lograrse fresando, torneando, con abrasivos, o por medio de otros procedimientos, pero siempre ha de tenerse gran cuidado de que estas muestras que van a ser utilizadas para las pruebas de corrosión, no se contaminen durante su preparación.

En el caso de que dicha preparación se realice con abrasivos, debe tenerse gran cuidado en la selección del mismo, ya que se corre el peligro de introducir dentro de la superficie de la muestra, partículas de abrasivos que puedan transformarse en pequeños cátodos que sirvan para estimular la corrosión.

Cuando en esta etapa del proceso se utilicen máquinas, ha de tenerse en cuenta que las altas velocidades desarrolladas por las mismas, puedan ser perjudiciales en dicha preparación, puesto que pueden elevar la temperatura de la superficie.

La preparación química de la superficie evita la contaminación de la capa de superficie por una preparación mecánica, pero lleva consigo las siguientes posibles desventajas:

- Pueden quedar algunos residuos de los agentes químicos empleados.
- El ataque sufrido por el metal durante la preparación puede ser de tal carácter que influya a su vez en la corrosión subsiguiente.
- El carácter dado a la superficie por medio de la preparación química puede crear dificultades en la detección del comienzo del ataque en la prueba de corrosión siguiente.

Como en el proceso de corrosión pueden a veces interferir películas de grasa muy finas, casi invisible, es necesario (excepto cuando se requiera que las muestras lleven un revestimiento protector especial a base de grasa) desengrasar éstas antes de someterlas a la prueba y evitar después todo contacto con la piel humana a fin de asegurarse que todas ellas estén en igualdad de condiciones a este respecto.

9.3. Desarrollo del método de trabajo.

El procedimiento de preparación de las muestras debe tener una serie de características para poder realizar el ensayo en las condiciones adecuadas. La disposición inicial es de vital importancia para que los resultados sean correctos y no se vean modificados por los defectos debidos a una falta de preparación de la muestra.

Inicialmente se debe tener la debida precaución en el corte, lijado y pulido para que las deformaciones causadas sean eliminadas o sean lo bastante poco profundas para poder eliminarlas con un reactivo de

ataque. Se debe evitar desprendimientos, porosidades y roturas en la superficie a tratar, al igual que la planicie superficial debe ser fundamental para un ensayo correcto.

Las muestras deben ser limpiadas adecuadamente entre un paso de preparación y otro, al igual que después del ataque con el reactivo y antes de introducir las en las células del ensayo de corrosión.

Si estas características se cumplen, los análisis de las muestras deberían dar unos resultados útiles para nuestro estudio. La preparación de las muestras requiere por lo general de cinco operaciones principales:

- *Corte*
- *Montaje de las muestras en resina*
- *Lijado*
- *Pulido*
- *Defectos de preparación*

El procedimiento puede tener modificaciones en algunos pasos según el criterio del usuario, que se basará en sus propios conocimientos sobre el grado de dificultad en la preparación de las muestras. El corte no es necesario en todas las muestras, únicamente cuando la pieza a tratar es de un tamaño mayor al de la probeta donde se va a incrustar. Si la superficie a tratar es demasiado grande, y se tiene la suficiente experiencia en ensayos de corrosión se puede soslayar el montaje en una probeta de resina polimerizada, aunque no es del todo recomendable.

9.3.1. Corte de las muestras.

El corte es un proceso previo a la preparación de las muestras que se aplica para reducir el tamaño de las piezas y conseguir una mejor adaptación en el procesado y tratamiento de estas. Aunque las muestras que utilizamos para nuestro ensayo vienen adaptadas en tamaño, fue necesario realizar unos determinados cortes en cinco piezas para reducirlas unos milímetros en superficie y así adaptarlas mejor en el montaje de la probeta.

Dependiendo del tipo de metal a cortar (metal ferroso, no ferroso), las características de cada muestra y las recomendaciones del fabricante, se necesitan previamente seleccionar los tipos de discos abrasivos a utilizar. Los discos están formados por partículas abrasivas y rellenos de un material aglutinante que puede ser goma, resina o mezcla de las dos. Para materiales más duros como carburos, rocas y muestras petrográficas se suelen utilizar discos de corte de diamante ligados con resina sintética.

Las muestras deben estar firmemente sujetas durante el corte y la presión de corte debe de ser aplicada cuidadosamente para evitar la rotura del disco.

Aunque las piezas a tratar se podían haber cortado sin problema alguno en una cortadora/troceadora manual de taller, por seguridad en el tratamiento de las piezas con una dureza alta (aleación Ti6Al7Nb) fueron cortadas en una sierra lineal de precisión del laboratorio.

9.3.2. Montaje de las muestras en resina.

El principal motivo del montaje de las muestras en resina polimerizada es por la comodidad que ofrece el manejo de estas a la hora de realizar los diferentes análisis. Otra finalidad secundaria es la de proteger y preservar los bordes prominentes o defectos superficiales durante la preparación.

La preparación de probetas para la conservación y manejo de muestras se remonta algunas décadas atrás, cuando la utilización de polímeros estaba aún por descubrir y las técnicas más avanzadas correspondían al montaje en polvo de azufre, cera o aleaciones con un punto de fusión bajo. El lanzamiento al mercado de los polímeros y los plásticos fenólicos supuso un gran avance sobre estos métodos anteriores. Con el paso de los años el desarrollo de nuevas técnicas se fue imponiendo el uso de resinas moldeables. La simplicidad de montaje sin tener que utilizar grandes prensas y las bajas temperaturas de polimerización, hicieron de las resinas una atractiva alternativa.

Montaje de compresión

El método de montaje más usual utiliza presión y calor para encapsular la muestra con un material de montaje termoendurecible o termoplástico. Las resinas termoendurecibles se endurecen a temperaturas elevadas. También se suelen denominar resinas duroplásticas. Las resinas termoplásticas se ablandan o funden a temperaturas elevadas y se endurecen durante el enfriado.

Las resinas termofraguables más comunes y tratadas por nuestro laboratorio pertenecen a dos conocidas marcas registradas, se pueden dividir en resinas Buehler y resinas Struers.

Cada marca registra con un nombre específico el tipo de resina, aún así se puede hacer una diferenciación entre las resinas fenólicas (Phenocure, PolyFast, MultiFast, Pre-Mount), resinas de Dialilftalato de dialilo (Iso Fast), resinas epoxi (Epornet, DuroFast), resinas acrílicas (ConduFast, SpeciFast), y resinas de metacrilato de metilo (Transoptic).

En nuestro caso, y debido a la calidad que ofrecen las probetas tras el montaje, y la cantidad de resina de la que disponemos en el laboratorio, utilizaremos una resina acrílica de montaje en caliente por compresión de la marca Struers, concretamente el nombre registrado es SpeciFast y el aspecto que ofrecen las probetas es transparente en vidrio con una contracción media.



Ilustración 51. Resina de montaje utilizada en el taller para el encapsulamiento de nuestras muestras, Struers.

Las máquinas destinadas al montaje de probetas suelen constituirse en prensas con sistemas de Control del proceso, prensas manuales para montaje en caliente con cilindros de montaje y unidades de impregnación en vacío cuando se necesita rellenar con resina un material poroso.

En nuestro caso hemos decidido utilizar una máquina de empastillado en caliente con algunos años de antigüedad. Disponemos en el laboratorio de una prensa manual para empastillar en caliente con cilindros de montaje de 25 mm y de 30 mm de diámetro. También se dispone de una prensa automática (más actual) de montaje en frío, ProntoPress-20 que hemos decidido prescindir de ella por los resultados satisfactorios que nos aporta el montaje en caliente. La elección de esta máquina también ha sido valorada por la poca cantidad de muestras que necesitábamos encapsular.

La forma más habitual de empastillar con la máquina de montaje en caliente consiste en adaptar la muestra a los cilindros de montaje pegando, si fuera necesario, con un débil adhesivo de contacto las paredes de la muestra a la del cilindro, posteriormente se añade la resina al montaje y se cierran los cilindros. El último paso transfiere el calor de una resistencia a la resina y una prensa hidráulica influye una fuerza constante sobre los cilindros.

Tras el proceso de polimerización en el cual la temperatura asciende a los 125° y la presión se mantiene entre 150 kg/cm² y 250 kg/cm², la muestra queda incrustada en la resina. La probeta después de un enfriamiento previo (60°-65°) obtiene la forma del cilindro de montaje dando como resultado una pastilla sólida traslúcida con la superficie transversal de la muestra rasante a la base de la pastilla.

9.3.3. Lijado.

El lijado o desbaste consiste principalmente en eliminar los defectos superficiales dejando una superficie plana, con unos daños mínimos que puedan eliminarse fácilmente durante el pulido posterior de la muestra, en el tiempo más corto posible.

Para este proceso se suelen utilizar papeles de lija o abrasivos de desbaste y el modus operandi suele ser manual, mediante pasadas muy cortas, con presión constante y con giros de 90° cada cierto tiempo. Los abrasivos de desbaste utilizados normalmente en la preparación de las muestras son de carburo de silicio (SiC), óxido de aluminio (Al₂O₃), esmeril (Al₂O₃-Fe₃O₄) y otros materiales para durezas mayores.

El papel abrasivo se fabrica en distintos grados, dependiendo del tamaño de las partículas abrasivas, que van desde 1200 (el más fino) hasta 60 (el más grueso). Mientras más bajo sea el número, más ruda y fuerte será la lija. Para conseguir un buen lijado bajaremos el número grano a medida que vamos desbastando la pieza. El abrasivo utilizado en cada operación sucesiva de desbaste debe ser uno o dos tamaños de grano más pequeño que el utilizado en el paso precedente. Una secuencia satisfactoria de lijado fino podría suponer el uso de papeles abrasivos de SiC con tamaños de grano de 180, 220, 280, 360, 400 y 600 (P180, P220, P280, P360, P400, P600) Esta secuencia se divide en tres pasos de desbaste y es la que se utiliza en el método tradicional. Los pasos principales de este método corresponden al tipo de desbaste y el tamaño de las partículas abrasivas: Desbaste grosero, desbaste intermedio, desbaste final.

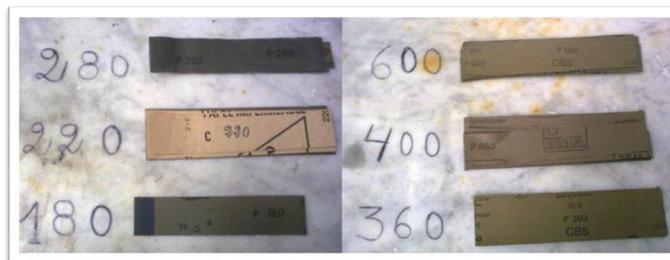


Ilustración 52. Papel abrasivo preparado para el lijado en el taller.

El desbaste grosero es el desbaste inicial, que tiene como objetivo planear la probeta, lo cual suele hacerse a mano o con lijadora de banda. En cualquier caso, la presión de la probeta sobre la lija o papel de esmeril debe ser suave, para evitar la distorsión y rayado excesivo del metal. El papel abrasivo suele tener el menor grado dependiendo de las irregularidades iniciales (P180, P220). El desbaste intermedio el papel de lija a utilizar disminuye en grosor de partícula abrasiva (P360, P400). El desbaste final se realiza de la misma forma que los anteriores, con papel de lija más fino P600. En todo caso, en cada fase del desbaste debe tomarse siempre en cuenta la manera de proceder. Cada vez que se cambie de papel, debe girarse 90 grados, en dirección perpendicular a la que se seguía con el papel de lija anterior, hasta que las rayas desaparezcan por completo.

Se avanza y se facilita mucho las operaciones descritas utilizando una pulidora automática de discos, a las que se fija los papeles de lija adecuado en cada fase de la operación. Las velocidades empleadas varían de 150 a 250 rpm. En otro caso se pueden utilizar debastadoras fijas o de bandas giratorias.

9.3.4. Pulido.

El pulido es el paso final en la obtención de una superficie plana libre de deformaciones y arañazos con el aspecto de un espejo. La técnica de pulido utilizada no debe introducir estructuras extrañas como metal alterado, picaduras, arrastre de inclusiones, “colas de cometa”, manchas o relieves (diferencias de altura entre distintos componentes, o entre agujeros y componentes).

El pulido se lleva a cabo, al igual que el lijado, en varios pasos. Tradicionalmente, el pulido basto se realiza con abrasivos de diamante de $6\mu\text{m}$ a $2\mu\text{m}$ cargados en telas sin o con poca pelusa. En el caso de materiales duros, como aceros templados, titanio, carburos cementados, cerámicas... puede ser necesario otro paso adicional de pulido basto. El paso inicial de pulido basto puede ir seguido de un pulido con diamante de $1\mu\text{m}$ sobre una tela sin pelusa o con pelusa corta o media. Deberá utilizarse una pequeña cantidad de un lubricante compatible para evitar el sobrecalentamiento o la deformación de la superficie.

Pulido Manual

Normalmente en un pulido manual se utiliza un disco giratorio y la destreza del operario; en nuestro caso, el usuario hace girar la muestra con un movimiento circular contra la dirección de giro del disco. Aparte del uso de abrasivos y telas de pulir perfeccionados, las técnicas de pulido a mano aún siguen las prácticas básicas establecidas hace muchos años:

- **Movimiento de la muestra:** La muestra se sujeta con una o ambas manos, a gusto del operador, y se gira en dirección contraria a la del giro del disco de pulir. Además, la muestra se

mueve continuamente en vaivén entre el centro y el borde del disco, asegurando de ese modo la distribución uniforme del abrasivo y el desgaste uniforme de la tela de pulir. Después de cada paso, la muestra se gira de 45° a 90° para que la abrasión no sea unidireccional.

- Presión de pulido: La presión correcta a aplicar debe ser dictada por la experiencia. En general, se aplica una presión firme con la mano sobre la muestra.
- Lavado y secado: La muestra se lava frotando con una solución detergente líquida, aclarándola con agua corriente caliente y luego etanol y secándola bajo un chorro de aire caliente. Normalmente se puede utilizar alcohol para el lavado cuando el soporte abrasivo no es soluble en agua o si la muestra no tolera el agua. Puede ser necesaria una limpieza ultrasónica en el caso de muestras porosas o agrietadas.

Pulido automatizado

El pulido mecánico puede tener un alto grado de automatización utilizando una amplia gama de aparatos que van desde sistemas relativamente simples hasta dispositivos bastante sofisticados, controlados por microprocesadores. Las unidades también varían en cuanto a capacidad, desde una simple muestra hasta media docena o más de una sola vez. Estos sistemas se pueden utilizar en todos los pasos de lijado y pulido. Estos aparatos permiten al operador preparar una gran cantidad de muestras al día con un nivel de calidad más alto que el pulido a mano y reduciendo el gasto de consumibles. Los aparatos de pulido automático producen la mejor planeidad superficial y la mejor retención de bordes. Existen dos métodos para manipular las muestras. La fuerza centralizada utiliza un portamuestras con cada muestra sujeta firmemente en su lugar. El soporte es presionado hacia abajo contra la superficie de preparación con la fuerza aplicada a la totalidad del soporte.



Ilustración 53. Pulidora/Lijadora automática del laboratorio, Struers.

Telas de pulir

Entre las exigencias de una buena tela de pulir se incluyen la capacidad de retener el medio abrasivo, una larga duración, ausencia de cualquier material extraño que pueda provocar arañazos y ausencia de cualquier producto químico de procesamiento que puedan reaccionar con la muestra. Hay disponibles muchas telas de diferentes géneros, tejidos o pelusas. Para el pulido basto con compuestos abrasivos de diamante, se recomienda el uso de telas sin o con poca pelusa. Para el pulido final se pueden utilizar telas sin pelusa o con pelusa corta, media u ocasionalmente alta. Este paso debe ser breve para reducir al mínimo el relieve.

Abrasivos de pulir

El pulido implica normalmente el uso de uno o más de los siguientes abrasivos: diamante, óxido de aluminio (Al_2O_3) y dióxido de silicio (Sílice, SiO_2) amorfo en suspensión coloidal. Para determinados materiales, se pueden utilizar óxido de cerio, óxido de cromo, óxido de magnesio u óxido de hierro, aunque su uso es poco frecuente. Con la excepción del diamante estos abrasivos están normalmente suspendidos en agua destilada, por si el metal que se va a pulir no es compatible con el agua, entonces puede ser necesario disponer de otras suspensiones como glicol etilénico, alcohol, keroseno o glicerol. El abrasivo de diamante deberá extenderse sólo con el portador recomendado por el fabricante.

Los abrasivos de diamante fueron lanzados al mercado a finales de los años cuarenta. Sin embargo, su principal uso en preparación de muestras se remonta a finales de los años veinte, donde los antiguos joyeros americanos pulían los cojinetes de zafiro en polvo de diamante. Los abrasivos de diamante fueron lanzados al mercado inicialmente en una pasta portadora, pero más tarde se lanzaron en forma de pasta en suspensión y en spray. Inicialmente se utilizó el diamante natural virgen, que aún está disponible en pasta y suspensiones de diamante Metadi. Más tarde, se lanzó al mercado el diamante sintético, primero en forma monocristalina, de morfología similar al diamante natural y luego en forma policristalina.

La sílice coloidal se utilizó por primera vez en discos de pulir de silicio monocristalino, donde deben eliminarse todos los daños en la superficie del disco antes de que se pueda desarrollar alguna partícula aberrante en él.

Para el pulido final rutinario, un abrasivo fino de diamante, puede ser adecuado como último paso de preparación. Tradicionalmente y en nuestro laboratorio estamos utilizando pastas en suspensión y polvos de alúmina fina acuosa, como las suspensiones y polvos de alúmina desaglomerantes "AP-Suspensión A". Las pastas en suspensión de alúmina alfa (tamaño $0.3 \mu\text{m}$) y alúmina gamma (tamaño $0.05 \mu\text{m}$) son de uso popular para el pulido final, tanto secuencial como individualmente. La suspensión de alúmina hecha mediante el proceso sol-gel y produce mejores acabados superficiales que los abrasivos de alúmina hechos mediante el proceso tradicional de calcinación.

9.3.5. Defectos de preparación.

Las muestras del ensayo, tras el pulido correspondiente, ofrecen una superficie lisa a modo de espejo que a primera impresión da aspecto de una preparación óptima, pero este tratamiento preparatorio en muchas ocasiones deja una serie de defectos superficiales de preparación que el ojo humano no es capaz de observar a simple vista.

El nivel de grietas, poros, rayas, inclusiones...etcétera en la pieza es esencial para tener un ensayo de corrosión con resultados aceptables. Algunos defectos superficiales suelen ser comunes tras los procesos de lijado y pulido, estos se observan en el microscopio electrónico que disponemos en el laboratorio, y si el grado de deterioro no es muy alto la pieza puede ser tratada sin que los resultados se difieran mucho de lo que se busca. Los defectos de preparación más comunes que pueden aparecer en las muestras son:

- Rayas

Las rayas son surcos que aparecen en la superficie de una muestra producidos por las puntas de las partículas de abrasivo.



Ilustración 54. Aum 200 x. Rayas producidas tras el pulido fino. Metalog guide Struers.

En las piezas tratadas en el laboratorio, las rayas de pulido han sido los defectos que más se nos han presentado, la mayor parte de las ocasiones se ha necesitado de varias pasadas de pulido y ataque con reactivo para ir eliminando en mayor grado los defectos.

- Deformaciones

Existen dos tipos de deformación, elástica y plástica. La deformación elástica desaparece cuando se elimina la carga aplicada que la provoca. La deformación plástica se denomina también deformación en frío. Puede provocar defectos subsuperficiales después del esmerilado, el lapeado o el pulido. La deformación plástica remanente puede observarse por primera vez después del ataque.



Ilustración 55. Aum 200x. Líneas de deformación afiladas. Metalog guide Struers.

- Arranques

Los arranques son las cavidades que quedan después de que una serie de gránulos o partículas de material sean arrancadas de la superficie de la muestra durante la abrasión. Aparecen en materiales duros y quebradizos, y en materiales con inclusiones. Los materiales duros y quebradizos no son deformables plásticamente; por ello, pequeños fragmentos de la

superficie del material se rompen y pueden desprenderse o ser arrancados por el paño de pulido.

Las inclusiones también pueden ser quebradizas, o poseer unos valores de expansión térmicas diferentes de los de la matriz. En tal caso las inclusiones rotas o relativamente sueltas pueden ser arrancadas por un paño de pulido con pelo largo. El grafito también puede resultar arrancado durante la preparación si se utiliza un paño con pelo largo.

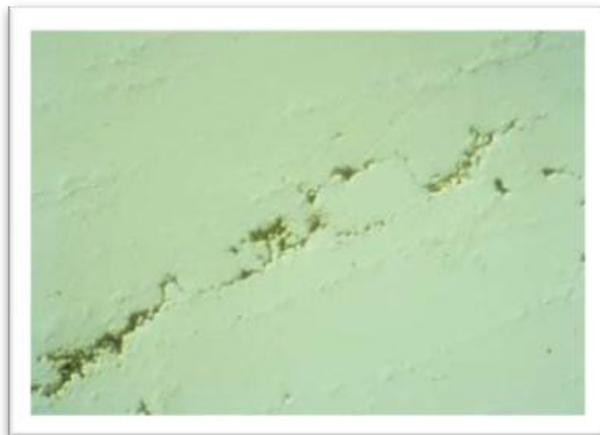


Ilustración 56. Aum 500x. Inclusiones arrancadas. Pueden verse rayas originadas a partir de las inclusiones. Metalog guide Struers.

- Separaciones

Las separaciones son espacios vacíos que aparecen entre la resina de montaje y el material de la muestra.



Ilustración 57. Aum 100 x. Separación entre la resina y la muestra. Metalog guide Struers.

- Grietas

Las grietas son fracturas que se producen en los materiales quebradizos y en materiales con distintas fases. La energía utilizada para preparar la muestra es superior a la que puede ser absorbida por la resina. El exceso de energía se traduce en la aparición de grietas.

En las muestras tratadas en nuestro laboratorio se han producido una serie de grietas en las pastillas de resina. Las probetas de metal no han sufrido grietas en el proceso de empastillado, por lo que los defectos no afectan directamente para el ensayo.

- Falsa porosidad

Algunos materiales poseen una porosidad natural, por ejemplo, los metales fundidos, los revestimientos aplicados por pulverización o los materiales cerámicos. En dichos casos es importante poder determinar los valores correctos de dicha porosidad, y no realizar determinaciones erróneas debidas a defectos de preparación.



Ilustración 58. Aum 500 x. Superaleación después de 5 minutos de pulido. Metalog guide Struers.

- Colas de cometa

Las colas de cometa aparecen junto a las inclusiones o los poros, cuando el movimiento relativo de la muestra y el disco de pulido es unidireccional. La forma característica de dichos defectos es la que les ha valido el nombre de “colas de cometa”. Un factor clave para evitar la aparición de colas de cometa es el relacionado con la dinámica del pulido.



Ilustración 59. Aum 200x. Colas de cometa. Metalog guide Struers.

- Contaminación

Partes de material procedente de una fuente diferente de la misma muestra, acaban en muchas ocasiones depositándose sobre su superficie durante el proceso de esmerilado o pulido mecánico. Esto suele ocurrir si las telas utilizadas para el pulido no están suficientemente limpias y contienen restos del metal anterior.

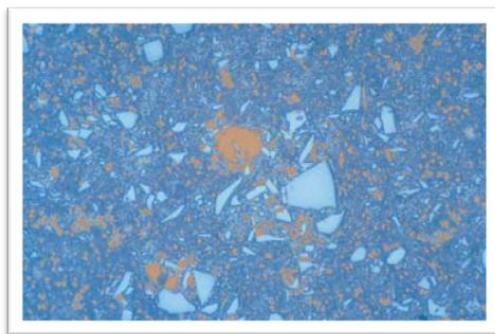


Ilustración 60. Aum 200x. Partículas de cobre retenidas entre la matriz de aluminio, procedentes de una preparación anterior. Metalog guide Struers.

- Abrasivo incrustado
Las partículas de abrasivo sueltas, pueden acabar incrustadas a presión en la superficie de la muestra. Se da principalmente cuando la dureza del abrasivo es mayor que la de la muestra.



Ilustración 61. Defecto superficial donde se aprecian una serie de inclusiones en una muestra de Ag-Pd. 600x.

- Huellas de lapeado
Se trata de indentaciones producidas en la superficie de la muestra, provocadas por las partículas del abrasivo, cuando estas se mueven libremente sobre una superficie dura. El aspecto que presentan es parecido al de las rayas superficiales producidas por una acción de corte. Pero en lugar de línea continuada aparecen huellas claras de las partículas, saltando sobre la superficie de la muestra.



Ilustración 62. Defectos superficiales en una muestra de Ag-Pd de partículas abrasivas tras el lapeado 600x.

9.4. Análisis metalográficos. Método de absorción atómica.

9.4.1. Generalidades.

Los **métodos espectroscópicos** son aquellos en los que existe intercambio de energía entre la radiación electromagnética y la materia. En estos métodos se producen transiciones entre distintos niveles energéticos. La espectroscopia atómica comprende tres técnicas analíticas: absorción, emisión y fluorescencia atómica [7].

Los métodos de absorción han sido, hasta el momento, los de uso más generalizado. Se basan en la absorción selectiva de radiación por la misma especie a determinar o por un producto de transformación de dicha especie.

En los métodos de absorción molecular las transiciones se producen entre niveles electrónicos, vibracionales y rotacionales, por absorción de radiación ultravioleta, visible, infrarroja y de microondas.

La absorción ultravioleta y visible está constituida por bandas representativas de un gran número de transiciones. Las aplicaciones cualitativas de estas técnicas son bastante limitadas. Sin embargo, la sensibilidad es relativamente alta, característica adecuada para aplicaciones cuantitativas.

La absorción en el infrarrojo produce cambios en la energía de vibración y rotación de los enlaces en las moléculas. Aporta valiosa información cualitativa y estructural que se obtiene a partir de los espectros. La sensibilidad es relativamente pequeña y, por tanto, el aspecto cuantitativo de esta técnica está limitado.

En la absorción atómica se pueden originar transiciones entre niveles externos o entre niveles internos de los átomos, según que la radiación absorbida sea ultravioleta-visible y de rayos X, respectivamente.

En la **espectrofotometría de absorción atómica**, los átomos en fase de vapor absorben radiaciones energéticas correspondientes a sus líneas de resonancia (uv-visible), en cantidad proporcional a su concentración. Para obtener un espectro de radiaciones de longitudes de ondas específicas, o rangos pequeños en lugar de bandas, es necesario que las partículas de la muestra se atomización. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran la gran especificidad, amplio campo de aplicación en la química analítica, excelente sensibilidad a pequeñas concentraciones del orden de las ppm y 1000 ppm, rapidez en la determinación y gran selectividad. La técnica permite la determinación de, al menos, unos 70 elementos en cantidades tan bajas como 10^{-14} g con razonable selectividad, pequeña manipulación y mínimo tamaño de muestra. Aunque inicialmente se utilizó solo para la determinación de elementos metálicos, se han desarrollado métodos indirectos que permiten la cuantificación de una gran variedad de aniones y de compuestos orgánicos.

Dentro de este método instrumental pueden emplearse distintos tipos de espectroscopia, como el de **emisión atómica** (la muestra es atomizada en la llama y actúa como fuente de radiación) o el de **absorción atómica** (donde la muestra se atomiza en la llama pero existe una radiación externa que produce la excitación de los electrones al estado excitado).

9.4.2. Breve historia.

La absorción atómica se conoce desde hace muchos años. Por ejemplo, en 1802 *Wollaston* [8] notó que en el espectro del sol a ciertas frecuencias aparecen líneas oscuras; más tarde, *Joseph von Fraunhofer* [9] las redescubrió y las estudió a fondo, después de lo cual se conocieron como *líneas de Fraunhofer*. El significado de las líneas no se comprendió hasta 1859. Cuando *Kirchhoff* explicó su origen después de haber observado un fenómeno similar en el laboratorio. La superficie visible del sol está mucho más caliente que la envoltura gaseosa que la rodea y los átomos en la atmósfera absorben frecuencias específicas de la emisión continua de la superficie caliente. (La radiación se reemite porque de otra manera la envoltura gaseosa estaría cada vez más caliente: pero esto sucede en todas direcciones, por lo que un observador en la tierra es engañado en términos de lo que se transmite directamente a él). *Kirchhoff* y otros, en particular *Bunsen*, identificaron varios elementos presentes en la atmósfera del sol comparando las frecuencias de las *líneas de Fraunhofer* con las de elementos conocidos determinadas en el laboratorio.

Los principios teóricos de la absorción atómica fueron establecidos por los científicos alemanes *Gustav Robert Kirchhoff* y *Robert Wilhelm Bunsen*[10] en sus estudios del fenómeno de autoabsorción en el espectro de los metales alcalinos y alcalino térreos, al darse cuenta de que cada elemento emite y absorbe luz de colores característicos, que componen su espectro. En 1860. *Kirchhoff* y *Bunsen* utilizaron esta técnica en el descubrimiento de los elementos rubidio y cesio [11]. Como medio de trabajo cuantitativo no fue desarrollada hasta 1930.

Los aparatos para observar visualmente un espectro se denominan espectroscopios, los que sirven para observar y registrar un espectro fotográficamente se llaman espectrógrafos y los empleados para medir la intensidad de las diferentes partes del espectro se denominan espectrofotómetros; las medidas espectroscópicas extremadamente precisas se realizan con interferómetros. En el siglo XIX, los científicos descubrieron que más allá del extremo violeta del espectro podía detectarse una radiación invisible al ojo humano con marcada acción fotoquímica, denominada radiación ultravioleta. Igualmente, más allá del extremo rojo del espectro se detectó una radiación infrarroja invisible que transmitía energía. Como consecuencia, se redefinió el término espectro para que abarcara esas radiaciones invisibles, y se ha ampliado para incluir las ondas de radio, así como los rayos X y los rayos gamma.

En la actualidad, el término espectro se aplica frecuentemente en un sentido más amplio a cualquier distribución ordenada producida por el análisis de un fenómeno complejo. Un sonido complejo, como por ejemplo un ruido, puede analizarse como un espectro acústico formado por tonos puros de diferentes frecuencias. Igualmente, una mezcla compleja de elementos o isótopos con distinta masa atómica puede ser separada en una secuencia ordenada según su masa atómica y denominada espectro de masas.

La espectroscopia no sólo ha proporcionado un método importante y sensible para el análisis químico, sino que ha sido el principal instrumento para descubrimientos en campos aparentemente no relacionados, como la astrofísica o la teoría atómica. En general, los cambios en el movimiento de los electrones exteriores de los átomos dan lugar a espectros en la región visible, infrarroja y ultravioleta. Los cambios en el movimiento de los electrones interiores de los átomos pesados producen espectros

de rayos X. Los cambios en la configuración del núcleo de un átomo producen espectros de rayos gamma. Los cambios en la configuración de las moléculas producen espectros visibles e infrarrojos.

La base de la espectroscopia de absorción atómica (EAA) la entregó *Kirchhoff* al formular su ley general: «cualquier materia que pueda emitir luz a una cierta longitud de onda también absorberá luz a esa longitud de onda». Aunque la espectrometría de absorción atómica data del siglo XIX, la forma moderna fue desarrollada en gran medida durante la década de los 50 por un equipo de químicos de Australia, dirigidos por *Alan Walsh* [12] en el Instituto de Física de Melbourne (Australia) y *Alkemade* (Holanda), apareciendo los primeros instrumentos comerciales a principios de 1960.

9.4.3. Descripción y principios en los que se basa.

Si tenemos que realizar un análisis elemental de soluciones, es decir, conocer concentraciones de ciertos elementos en solución, hay varias técnicas espectrométricas precisas que podemos usar. Son cuatro las que se pueden utilizar, siendo éstas: absorción atómica por llama, por horno de grafito, el ICP (espectrometría de plasma acoplado inductivamente) y el ICP de masa (ICP-MS). Seleccionar la mejor técnica para caracterizar nuestra solución puede ser una tarea difícil ya que más de una podría usarse efectivamente para la misma muestra. Por lo tanto para determinar el método de análisis a utilizar es importante tener un leve conocimiento de los puntos fuertes y débiles de cada técnica y escoger la más adecuada. Por ello, a continuación se describirán, sin entrar mucho en detalle en cuestiones técnicas, para entender mejor el funcionamiento de cada una de ellas [13].

- **Absorción atómica por llama (FAAS).**

Esta técnica usa una llama de aire/acetileno o de óxido de nitrógeno/acetileno para evaporar el disolvente y disociar la muestra en sus componentes atómicos. Cuando la luz emitida por una lámpara (de longitud de onda determinada para el elemento a detectar) pasa a través de la nube de átomos, aquellos del elemento a determinar absorben la luz emitida. Esto es medurado por un detector y usado para el cálculo de la concentración del elemento en la muestra original.

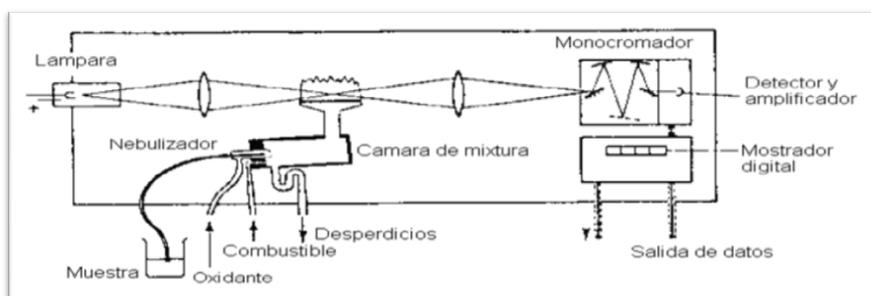


Ilustración 63. Esquema de funcionamiento del FAAS.

El uso de la flama limita el límite de la temperatura de excitación alcanzada por la muestra en un máximo aproximado de 2600 °C (con la flama de N₂O/acetileno). Por varios elementos no es un problema. Compuestos de metales alcalinos, por ejemplo, y algunos de los metales duros como el plomo o el cadmio y metales de transición como el níquel son completamente

atomizados con los dos tipos de llama con buena eficiencia. El rango de detección típico del FAAS es de sub-ppm.

Sin embargo, hay una serie de elementos refractarios, como el circonio y el vanadio, que no puede utilizarse correctamente este método. El motivo es que la temperatura alcanzada por la llama (incluso la de N_2O /acetileno) no es suficiente para romper los compuestos de estos elementos. En estos casos es mejor utilizar otra técnica de análisis.

- **Absorción atómica por horno de grafito (GFAAS).**

Esta técnica es esencialmente la misma que la FAAS excepto que la llama es reemplazada por una pequeña cubeta o tubo de grafito que es calentado eléctricamente a una temperatura superior a los 3000 °C para generar la nube de átomos. En la siguiente ilustración se puede observar el esquema de funcionamiento.

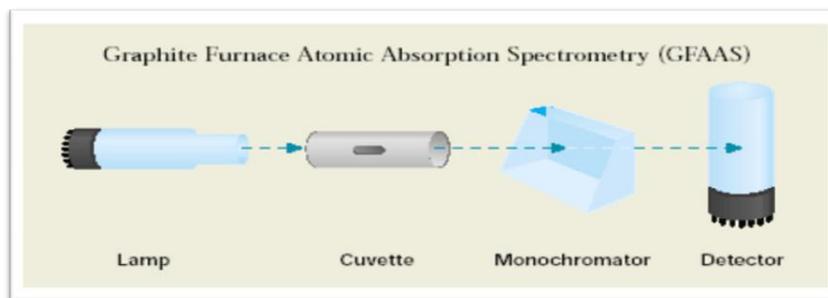


Ilustración 64. Esquema funcional del GFAAS.

La mayor densidad de átomos y el mayor tiempo de residencia en el tubo mejora el límite de detección en tres órdenes de magnitud comparado con el método de llama, siendo el rango de detección de sub-ppb.

- **Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP).**

El ICP es una técnica de análisis multi-elemental que usa una fuente de plasma inductivo para disociar la muestra en sus átomos e iones, excitando estos hasta que emiten luz de una longitud de onda determinada. Un detector mide la intensidad de la luz emitida y calcula la concentración de los elementos de la muestra. En la siguiente ilustración se puede observar el esquema de funcionamiento.

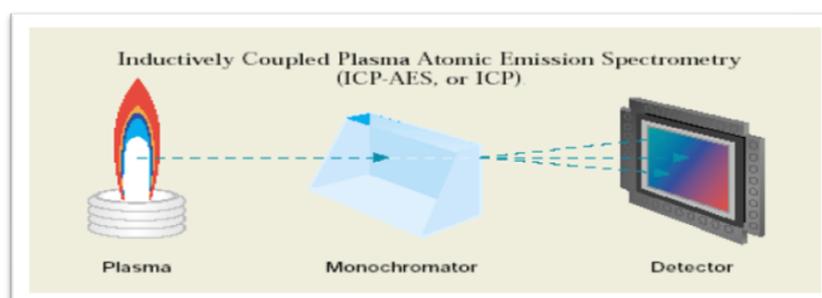


Ilustración 65. Esquema funcional del ICP.

Este método es fácil de usar, puede detectar hasta 60 elementos por muestra, pero tiene unos límites de detección moderadamente bajos pero superiores a la técnica de FAAS.

- **Spectroscopia de emisión óptica de masa de plasma.**

El ICP de masa es una técnica de análisis multielemental que usa la fuente de plasma del ICP para disociar la muestra en sus constituyentes. Sin embargo, en este caso son los propios iones los detectados y no la luz emitida por ellos. Los iones son extraídos desde la fuente y pasan por un espectrómetro de masa, donde son separados dependiendo de su masa atómica y carga por un analizador magnético. En la siguiente figura se puede observar el esquema de funcionamiento.

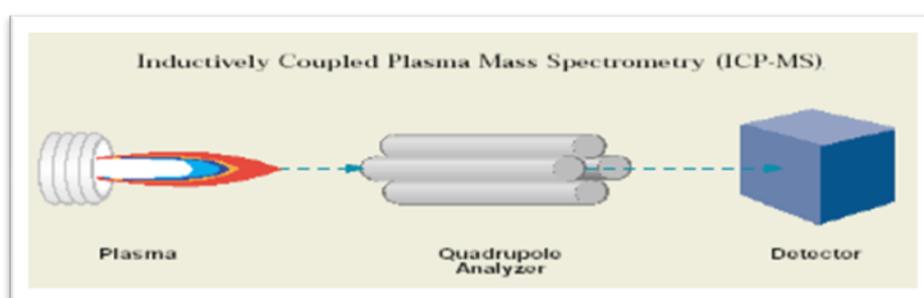


Ilustración 66. Esquema funcional del ICP de masa.

El alto número de iones producidos provoca que sea el método con mejor límite de detección. Un mismo elemento puede ser detectado por más de una técnica de las explicadas anteriormente.

En la tabla periódica adjunta se pueden observar las técnicas que se pueden usar para determinar la concentración de un mismo elemento.

1 H 1.008																	2 He 4.003
3 Li 6.941	4 Be 9.012											5 B 10.81	6 C 12.01	7 N 14.01	8 O 16.00	9 F 18.99	10 Ne 20.18
11 Na 22.99	12 Mg 24.31											13 Al 26.98	14 Si 28.09	15 P 30.97	16 S 32.07	17 Cl 35.45	18 Ar 39.95
19 K 39.10	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.88	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.85	27 Co 58.93	28 Ni 58.69	29 Cu 63.55	30 Zn 65.39	31 Ga 69.72	32 Ge 72.64	33 As 74.92	34 Se 78.96	35 Br 79.90	36 Kr 83.80
37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94	43 Tc (98)	44 Ru 101.1	45 Rh 102.9	46 Pd 106.4	47 Ag 107.9	48 Cd 112.4	49 In 114.8	50 Sn 118.7	51 Sb 121.8	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3
55 Cs 132.9	56 Ba 137.3	57 La 138.9	58 Ce 140.1	59 Pr 140.9	60 Nd 144.2	61 Pm (147)	62 Sm 150.4	63 Eu 152.0	64 Gd 157.3	65 Tb 158.9	66 Dy 162.5	67 Ho 164.9	68 Er 167.3	69 Tm 168.9	70 Yb 173.0	71 Lu 174.9	
87 Fr (223)	88 Ra (226)	89 Ac (227)	90 Th 232.0	91 Pa (231)	92 U (238)	93 Np (237)	94 Pu (244)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (260)	

■ ICP/ICP-MS/AA ■ ICP-MS
■ ICP/ICP-MS ■ ICP

Ilustración 67. Tabla periódica que muestra las técnicas a usar para cada elemento.

La Espectroscopía de Absorción Atómica (AA) es una técnica de análisis instrumental, capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos comprendidos en el sistema periódico. Permite determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra, pudiendo utilizarse para analizar la concentración de más de 70 metales diferentes en una solución. Pueden analizarse elementos metálicos como aluminio, calcio, cadmio, cromo, litio, hierro, magnesio, potasio y sodio, en un orden de detección entre las 3×10^{-4} ppm a las 20 ppm.

La técnica hace uso de la espectrometría de absorción para evaluar la concentración de un analito en una muestra. Se basa en gran medida en la *ley de Beer-Lambert* [14], descubierta independientemente por *Pierre Bouguer* [15] en 1729, *Johann Heinrich Lambert* [16] en 1760 y *August Beer* [17] en 1852. Este método consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. Los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía (luz de una determinada longitud de onda), que se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible, a partir de la *ley de Beer-Lambert*, calcular las transiciones que tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide.

La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados.

La técnica de atomización más usada es la de AA con llama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de una llama de aire acetileno u óxido nitroso-acetileno. Otra técnica de atomización es la electrotérmica, que utiliza el horno de grafito como accesorio. El método consiste en colocar la muestra diluida dentro de un tubo de grafito, que luego es calentado con una resistencia eléctrica pasando por distintos intervalos de temperatura para secar, calcinar y finalmente atomizar la muestra en el rango 2200-2700 °C.

Otra metodología es la denominada generación de hidruros y aprovecha la cualidad de algunos elementos (As, Sb, Sn, Se, Bi y Te) de formar hidruros volátiles bajo un ambiente reductor, que una vez generados en condiciones especiales son trasladados por un gas portador a una celda de cuarzo que es calentada a una temperatura optimizada para producir la atomización del analito a dosificar. Una variante la constituye la técnica de vapor frío, que aprovecha la facultad del mercurio de emitir vapores monoatómicos a temperatura ambiente.

En todas estas técnicas de AA se produce la absorción de energía de longitud de onda adecuada y una cuantificación similar por el sistema óptico y electrónico del espectrofómeto al que se encuentra adosado el accesorio correspondiente, o sea nebulizador/quemador en llama, horno de grafito ó generador de hidruros/vapor frío. Todas las metodologías citadas son muy versátiles y contando con un buen surtido de lámparas permite abordar campos analíticos en áreas como química clínica, toxicología, medio ambiente, metalurgia, bromatología, industria farmacéutica, edafología, etc. La elección de una tecnología u otra depende fundamentalmente del rango de sensibilidad requerido.

La Espectroscopía de Absorción Atómica es una técnica muy versátil, ya que es capaz de analizar cualquier muestra que se encuentre en disolución o que mediante un método u otro sea factible de disolverse.

9.4.4. Fundamentos teóricos.

El átomo está formado por un núcleo y un número determinado de electrones que llenan ciertos niveles cuánticos. La configuración electrónica más estable de un átomo corresponde a la de menor contenido energético y se conoce como “estado fundamental”.

Si un átomo que se encuentra en un estado fundamental absorbe una determinada energía, éste experimenta una transición hacia un estado particular de mayor energía. Como este estado es inestable, el átomo regresa a su configuración inicial, emitiendo una radiación de una determinada frecuencia.

La frecuencia de la energía radiante emitida corresponde a la diferencia de energía entre el estado excitado (E_1) y el estado fundamental (E_0) como se encuentra descrito en la *ecuación de Planck* [18]:

$$E = E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Ecuación 1. Ecuación de Planck.}$$

Donde, h es la constante de Planck, ν es la frecuencia, c es la velocidad de la luz y λ es la longitud de onda.

Según la teoría atómica, el átomo puede alcanzar diferentes estados (E_1, E_2, E_3, \dots) y de cada uno de ellos emitir una radiación ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \dots$) característica, obteniéndose así un espectro atómico, caracterizado por presentar un gran número de líneas discretas. En absorción atómica es relevante solamente aquella longitud de onda correspondiente a una transición entre el estado fundamental de un átomo y el primer estado excitado, conocido como longitud de onda de resonancia.

De la *ecuación de Planck*, se tiene que un átomo podrá absorber solamente radiación de una longitud de onda (frecuencia) específica. En absorción atómica interesa medir la absorción de esta radiación de resonancia al hacerla pasar a través de una población de átomos libres en estado fundamental. Estos absorberán parte de la radiación en forma proporcional a su concentración atómica. La relación entre absorción y concentración se encuentra definida en la *Ley de Lambert-Beer*.

Como la trayectoria de la radiación permanece constante y el coeficiente de absorción es característico para cada elemento, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes.

El espectro de absorción atómica de muchos elementos se origina por transiciones electrónicas desde el estado fundamental a estados excitados y consta preferentemente de líneas de resonancia, que se producen como consecuencia de transiciones del estado fundamental a niveles superiores.

Hay elementos que porque tienen una estructura electrónica más compleja o por otros motivos, el número de transiciones permitidas es mucho mayor, y, con frecuencia, un gran número de líneas de resonancia aparecen muy próximas. En cualquier caso, la anchura de la mayor parte de las líneas

atómicas es inherentemente muy pequeña (del orden de 10^{-5} nm), e incluso en los casos en los que se produce el ensanchamiento de las líneas, nunca exceden de 10^{-2} nm.

Por ello, los espectros de especies atómicas gaseosas están constituidos por un conjunto de líneas estrechas y bien definidas a longitudes de onda características, lo cual explica la gran selectividad de la técnica. Este hecho hace, sin embargo, que no pueda utilizarse una fuente de radiación continua para la excitación, como en otros métodos espectroscópicos, pues sería necesaria una anchura de banda espectral de unos 5×10^{-4} nm, lo cual excede la capacidad de la mayor parte de los monocromadores, problema se ha resuelto con la utilización de lámparas de cátodo hueco y otros dispositivos.

La anchura de línea efectiva, $D_{1/2}$, es la anchura en unidades de longitud de onda cuando se mide a la mitad de la señal máxima. El ensanchamiento de las líneas espectrales se debe a las siguientes causas:

- Ensanchamiento natural.** Se produce como consecuencia del Principio de Incertidumbre de Heisenberg, debido a que el tiempo de vida de un electrón en un estado excitado es limitado, del orden de 10^{-8} segundos. Se demuestra que el ensanchamiento natural puede explicarse por la ecuación:

$$D_n = B_{ij}/2p \quad \text{Ecuación 2}$$

donde B_{ij} es el denominado factor de probabilidad o coeficiente de probabilidad de absorción de Einstein desde el estado fundamental (i) hasta el estado excitado (j). Este factor es inversamente proporcional al tiempo de vida del estado excitado. Los ensanchamientos de línea por este proceso son del orden de 10^{-5} nm, bastante inferiores a los debidos a otros efectos.

- Ensanchamiento Doppler.** Se origina como consecuencia del movimiento de los átomos del analito en el interior de la llama. De forma análoga a como sucede con las ondas de sonido, la frecuencia de la radiación emitida o absorbida por un átomo que se mueve rápidamente aumenta si el movimiento es hacia el detector, y disminuye si se aleja del mismo. El ensanchamiento de una línea atómica (a la mitad de la altura) por este efecto viene dado por la expresión:

$$\Delta\nu = \frac{2\nu_0}{c} \sqrt{(2 \ln 2) RT} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde ν_0 es la frecuencia del fotón absorbido, T la temperatura absoluta de las especies absorbentes, M el peso atómico, R, la constante de los gases y c la velocidad de la luz. De la expresión anterior se deduce que este efecto es más intenso cuanto mayor es la temperatura y más ligero el elemento en cuestión.

Como en el interior de las llamas, los átomos individuales presentan una distribución estadística de velocidades de Maxwell-Boltzmann, las frecuencias que llegan al detector muestran una distribución aproximadamente simétrica, con un máximo que corresponde a un desplazamiento Doppler de cero. En las llamas más comunes, estos ensanchamientos son de 5×10^{-4} a 5×10^{-3} nm.

- Ensanchamiento de presión.** Es el resultado de las colisiones entre las especies que absorben o emiten con otros átomos o iones presentes en el medio (ensanchamiento Lorentz) o incluso con átomos del mismo elemento (ensanchamiento Holtsmark). Estas colisiones provocan pequeños cambios en los niveles energéticos atómicos y, en consecuencia, se origina una dispersión de las

longitudes de onda emitidas o absorbidas. El ensanchamiento de una línea espectral por efecto Lorentz se expresa por:

$$\Delta\nu = \sigma^2 N \frac{\sqrt{2RT(M_1+M_2)}}{M_1 M_2 \pi} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde S_2 es un parámetro relacionado con el diámetro de las especies que colisionan, N el número de átomos o moléculas extrañas por unidad de volumen, M_1 el peso atómico o molecular de la especie extraña, M_2 el peso atómico o molecular de la especie absorbente, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. El ensanchamiento debido a este efecto es del mismo orden de magnitud que el producido por efecto Doppler.

El efecto Holtsmark depende, evidentemente, de la concentración de analito, si bien, el ensanchamiento que produce es solo del orden de 10^{-5} nm con disoluciones 1 M, por lo que puede considerarse despreciable.

- d. **Efectos producidos por campos eléctricos y magnéticos.** La presencia de campos eléctricos (efecto Stark) o magnéticos (efecto Zeeman) origina ciertas perturbaciones en las líneas de absorción o emisión, si bien, únicamente se ponen de manifiesto al operar en presencia de campos muy intensos o cuando el medio está muy ionizado, como en un plasma. En absorción atómica presenta un cierto interés en cuanto que se han desarrollado algunos sistemas para corregir el fondo.

9.4.5. Instrumentación.

Para analizar los constituyentes atómicos de una muestra es necesario atomizarla y, para ello, debe ser iluminada por la luz, que es transmitida y medida por un detector. Con el fin de reducir el efecto de emisión del atomizador (por ejemplo, la radiación de cuerpo negro) o del ambiente, normalmente se usa un espectrómetro entre el atomizador y el detector. Para atomizar la muestra normalmente se usa una llama, pero también pueden usarse otros atomizadores como el horno de grafito o los plasmas, principalmente los de acoplamiento inductivo. Los componentes básicos de un equipo de absorción atómica son los que se muestran en la siguiente ilustración Ilustración 68:



Ilustración 68. Componentes básicos de un equipo de absorción atómica.

La fuente radiante más común para las mediciones de absorción atómica es el tubo de descarga de cátodo hueco, como el que recomendó originalmente *Alan Walsh*, que consiste en un cilindro relleno con un gas inerte, con frecuencia neón o argón a baja presión, dentro del cual se encuentra un cátodo (construido del metal a analizar) y un ánodo. Al aplicar un cierto potencial a través de los electrodos esta fuente emite el espectro atómico del metal del cual está construido el cátodo.

El tubo opera con una fuente de energía que proporciona voltajes hasta de 300 v y las corrientes a través del tubo están en el rango de miliamperios. Con la descarga eléctrica los átomos del gas se ionizan y los iones energéticos de neón o argón se aceleran hacia el cátodo negativo, en donde chocan con los átomos que están en la superficie del cátodo metálico; a este proceso algunas veces se le llama

chisporroteo. Durante las colisiones posteriores con los iones y átomos energéticos, los átomos del metal que chisporrotean se excitan; después en una región más fría que la descarga, emiten una línea en el espectro que es característica del metal del cátodo, el cual aparece como una incandescencia dentro de la cavidad del cátodo hueco. De este espectro se selecciona una línea de resonancia para la medición de la absorción. El gas de relleno está a una presión y a una temperatura lo suficientemente bajas, ensanchamiento de presión y ensanchamiento Doppler, como para que las líneas en el espectro de emisión de la lámpara sean más estrechas que la línea de absorción del analito en la llama u horno.

En la EAA se utilizan atomizadores con y sin llama para producir átomos libres del metal en el haz de la radiación.

Desde el inicio, en 1955, de la espectroscopia de absorción atómica como método de análisis, hubo un nuevo ímpetu de desarrollar sistemas de atomización con llama, además de existir un interés continuo en conocer el mecanismo mediante el cual la solución muestra es convertida a vapor atómico en la llama. El resultado fue el desarrollo de un quemador con un cabezal de ranura, obteniéndose de este modo un camino óptico alargado a través de la llama, lo que proporciona una mayor sensibilidad al método. Estos quemadores emplean generalmente una cámara de premezclado de combustible/oxidante en combinación con un sistema para aspirar la solución muestra a la llama. En este sistema continuo la solución muestra es aspirada por arrastre con el gas comburente a través de un nebulizador para generar un aerosol fino dentro de una cámara donde se mezcla con los gases combustible y comburente auxiliar. Un deflector de flujo, ubicado en la cámara de premezclado, permite que las gotitas más grandes impacten contra él, caigan al fondo de la cámara y se escurran por el tubo de drenaje. El aerosol compuesto por las gotitas más finas es transportado hacia el cabezal del quemador, donde ocurre la combustión y la atomización de la muestra. Una entrada de gas oxidante auxiliar directa a la cámara de premezclado permite que los ajustes del flujo del oxidante sean efectuados por medio de la línea auxiliar, mientras que el flujo a través del nebulizador permanece constante. De esta forma la velocidad de aspiración de la muestra es independiente de las condiciones de la llama.

Los nebulizadores pueden ser regulados para variar la velocidad de aspiración de la solución muestra (1-4 ml/min). Estos están hechos de un material resistente a la corrosión.

Diferentes tipos de cabezales son utilizados dependiendo del tipo de llama a emplear. Estos se construyen de titanio para darle una resistencia al calor y a la corrosión, siendo los más empleados de 10 cm de ranura simple (llama acetileno/aire), 10 cm de ranura triple para soluciones con alto contenido de sólidos y cabezal de 5 cm (llama acetileno/óxido nitroso).

El tiempo necesario para la atomización de una muestra dependerá de la velocidad de entrada de los gases en la llama y se expresa con altura de la llama, de modo que la medición de la absorbancia se debe realizar en una zona en que la atomización sea completa.

La llama debe ser en lo posible transparente, es decir, no debe absorber parte de la radiación proveniente de la lámpara. En general, la llama debe poseer una alta eficiencia en la producción de átomos libres y ésta debe evitar que ocurran reacciones del elemento a determinar con productos de la combustión de los gases empleados o con otros componentes de la muestra. Al respecto, la

temperatura de la llama tiene un cierto grado de importancia, siendo a veces más valiosas las propiedades reductoras u oxidantes (según relación entre gases combustible/comburente) de ella. La razón óptima combustible/comburente dependerá del tipo de quemador, de los gases (combustible/comburente) y del elemento a determinar.

En resumen, el atomizador con llama está compuesto de un nebulizador y un quemador. La solución de la muestra es convertida primero a un fino aerosol, y luego llevada a la llama que entrega la energía suficiente para evaporar el solvente y descomponer los compuestos químicos resultantes en átomos libres en su estado fundamental. Una muestra de líquido normalmente se convierte en gas atómico en tres pasos:

- **Desolvatación.** Consiste en la eliminación del agua y otros disolventes para formar pequeñas partículas de sal seca. La velocidad de evaporación depende de la velocidad de transferencia de calor desde el ambiente de la llama hasta la gotita de aerosol, del tamaño de las gotitas, así como de las características del disolvente y de la temperatura de la llama. El líquido disolvente se evapora, y la muestra permanece seca.

La velocidad de evaporación depende de la velocidad de transferencia de calor desde el ambiente de la llama hasta la gotita de aerosol, y, considerando que esta transferencia de calor tiene lugar por conducción, puede expresarse por la ecuación:

$$-\frac{dm}{dt} = \frac{4\pi r\lambda}{c_p} \ln \left[1 + \frac{c_p(T - T_b)}{L} \right] \quad \text{Ecuación 5}$$

donde r es el radio de la gotita, λ la conductividad térmica media del ambiente gaseoso de la llama, c_p la capacidad calorífica del vapor del disolvente a presión constante, T la temperatura de la llama, T_b el punto de ebullición del disolvente y L el calor de vaporización del disolvente.

Es evidente, que la velocidad de evaporación depende del tamaño de las gotitas, de las características del disolvente y de la temperatura de la llama. Por ello, si las gotas son demasiado grandes, la desolvatación se produce de forma incompleta, lo que constituye un problema.

En otro sentido, cuando se trabaja con disolventes orgánicos, la velocidad de evaporación es más elevada, debido al menor calor de vaporización y a la liberación de calor por la combustión del propio disolvente. Además, la pequeña tensión superficial y viscosidad de muchos disolventes orgánicos aumentan la velocidad de flujo y favorecen la nebulización, incrementando, en consecuencia, la concentración de átomos en la llama.

- **Vaporización.** Consiste en la transformación de partículas de sal sólidas (aerosol sólido) o fundidas en vapor, es decir, la muestra sólida se evapora a gas. Es una etapa bastante crítica en los métodos que utilizan llama y depende de la composición química del analito, del tamaño de las partículas y de la temperatura de la llama.

Las sales que son sublimables o con bajo punto de ebullición se vaporizan fácilmente, mientras que aquellas que se descomponen en la llama para dar óxidos estables, tales como magnesio, aluminio o calcio, no se vaporizan completamente a las temperaturas de las llamas ordinarias.

Por lo que respecta a la temperatura y composición de los gases de la llama, la formación de óxidos metálicos no volátiles se favorece al trabajar con llamas estequiométricas o cuando se opera con exceso de oxidante. Las llamas reductoras facilitan la reducción de las partículas de óxido hasta átomos libres o especies más volátiles.

La velocidad del proceso de vaporización puede aumentarse por:

- Disminución de la concentración (del analito o de la matriz).
 - Formación de derivados volátiles del analito.
 - Formación de un aerosol constituido por partículas muy pequeñas.
 - Disminución de la velocidad de aspiración.
 - Empleo de llamas con altas temperaturas.
 - Utilización de llamas reductoras.
- Atomización. Los compuestos que componen la muestra se dividen en átomos libres. El proceso de atomización se detalla en la siguiente ilustración:

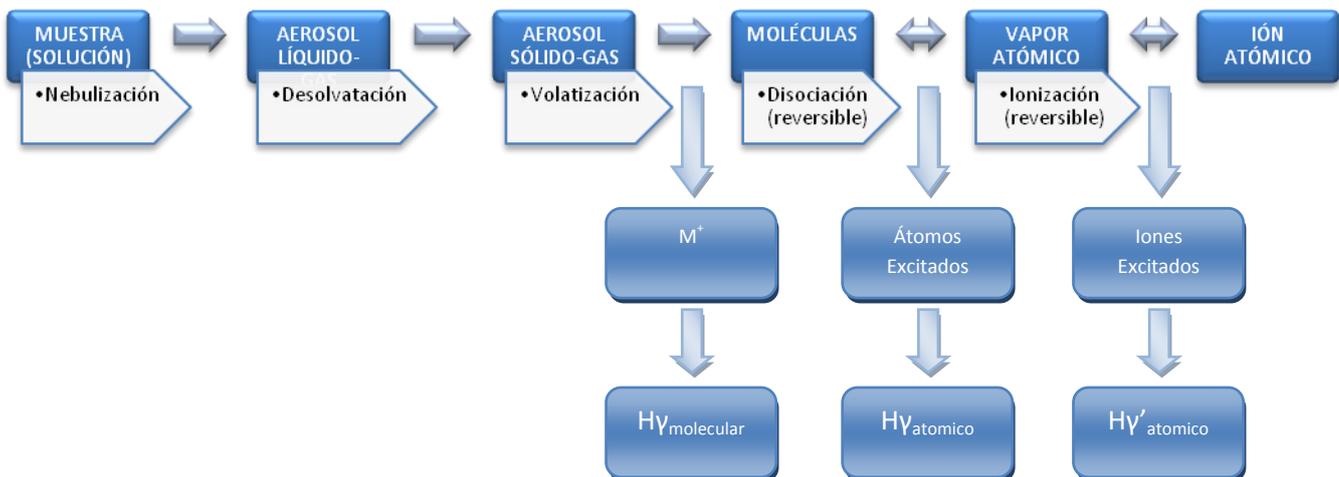


Ilustración 69. Proceso de Atomización.

En los atomizadores sin llama con atomización electrotérmica con horno de grafito el vapor atómico se genera en un tubo de grafito calentado eléctricamente, en cuyo interior se ubica la muestra. Estos atomizadores presentan diversas ventajas, como una alta eficiencia en generar vapor atómico, permite el empleo de pequeños volúmenes de muestra y análisis directo de muestras sólidas. Con Este método se pueden detectar concentraciones hasta mil veces más pequeñas que por el método común de llama.

Los espectrofotómetros de absorción atómica poseen generalmente monocromadores de red con montaje de *Littrow* o de *Czerny-Turner* [19]. Debido a que la fuente de radiación produce un haz casi monocromático, estos monocromadores permiten aislar una línea de resonancia del espectro emitido por la lámpara de cátodo hueco y en muchos casos un filtro de vidrio es suficiente para aislar la línea seleccionada para el análisis. Algunos instrumentos están provistos de fuentes y filtros intercambiables para varios elementos.

Como detector, se emplea un fotomultiplicador que produce una corriente eléctrica, la cual es proporcional a la intensidad de la línea aislada por el monocromador. La única finalidad del monocromador es aislar la línea de resonancia del elemento de interés. Para la mayor parte de los elementos, el problema suele ser sencillo, pues las diferentes líneas suelen estar bastante separadas. Ello hace que no sea necesario un monocromador de muy alta resolución, y, en consecuencia, no demasiado costoso, siendo éste uno de los factores que han contribuido a que la técnica sea muy utilizada en la práctica ordinaria del análisis.

Un amplificador selectivo amplifica la señal pasando luego a un dispositivo de lectura que puede ser un voltímetro digital o un registrador u otros.

La parte más crítica de un instrumento de absorción atómica es la fuente, ya que es muy difícil medir con buena exactitud líneas de absorción tan estrechas como las que presentan los átomos. El problema se ha resuelto aplicando el principio de que "*cada especie química es capaz, en condiciones adecuadas, de absorber sus propias radiaciones*". Bajo esta premisa se han desarrollado las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos.

- a. **Lámparas de cátodo hueco.** Consisten en un tubo de vidrio conteniendo argón o neón a baja presión y dos electrodos. El ánodo suele ser de wolframio, y el cátodo, de forma cilíndrica, está construido con el metal que se desea determinar.

Cuando se aplica una diferencia de potencial suficiente entre los dos electrodos tiene lugar la ionización del gas y los cationes gaseosos son acelerados hacia el cátodo, adquiriendo la suficiente energía cinética para arrancar algunos átomos metálicos del material catódico. Algunos de estos átomos metálicos son excitados al chocar con los iones gaseosos, y al retornar a su estado fundamental emiten radiación característica.

Al apagar la lámpara, los átomos metálicos vaporizados tienden a depositarse sobre las paredes del cátodo o sobre las paredes de vidrio del tubo, siendo mínima esta posibilidad, por el diseño cilíndrico del cátodo.

El hecho de que los diferentes elementos tengan que ser determinados de uno en uno, hace que la absorción atómica sea una técnica de análisis cuantitativo, no siendo efectiva para la identificación de los elementos presentes en una muestra.

Ordinariamente, para cada elemento se utiliza una lámpara, si bien, se han comercializado lámparas de cátodo hueco multielementales. Estas lámparas se construyen con aleaciones de diferentes metales, procurando que tengan similares puntos de fusión y volatilidad, como por ejemplo, Ca/Mg, Ag/Au, Cu/Pb/Zn, Co/Cr/Cu/Fe/Mn/Ni.

- b. **Lámparas de descarga sin electrodos.** Consisten en un tubo de cuarzo herméticamente cerrado conteniendo unos pocos miligramos del elemento de interés y un gas inerte a baja presión. La activación se lleva a cabo mediante un campo intenso de radiofrecuencias (100 kHz - 100 MHz) o radiación de microondas (>100 MHz). Cuando opera, el gas noble se ioniza, y los iones producidos son acelerados por el campo de radiofrecuencia hasta que adquieren la energía suficiente para excitar a los átomos del metal.

La espectrometría de absorción atómica también puede ser llevada a cabo mediante láser, principalmente un láser de diodo, ya que sus propiedades son apropiadas para la espectrometría de absorción láser. La técnica se denomina espectrometría de absorción atómica por láser de diodo (DLAAS o DLAS), o bien, espectrometría de absorción por modulación de longitud de onda.

9.4.6. Aplicaciones.

La EAA constituye una de las técnicas más empleadas para la determinación de más de 60 elementos, principalmente en el rango de $\mu\text{g/mL}$ - ng/mL en una gran variedad de muestras, siendo muy útil en los casos en donde la muestra contiene un nivel elevado del metal pero solo se cuenta con una muestra pequeña para el análisis. Entre algunas de sus múltiples aplicaciones tenemos el análisis de: aguas, muestras geológicas, muestras orgánicas, metales y aleaciones, petróleo y sus subproductos; y de amplia gama de muestras de industrias químicas y farmacéuticas.

Las aplicaciones de la EAA pueden llevarse a cabo por métodos directos y por métodos indirectos.

Se han desarrollado métodos directos para la determinación de más de 60 elementos en las más variadas muestras: rocas, suelos, aguas, vegetales, muestras biológicas, productos petrolíferos, metales y aleaciones, combustibles nucleares, productos farmacéuticos, vinos, etc.... La técnica es particularmente apropiada para la determinación de trazas de metales en muestras biológicas y medioambientales. También es de utilidad cuando la muestra contiene un nivel elevado del elemento metálico, pero solo se cuenta con una cantidad de muestra muy pequeña para realizar el análisis, como, por ejemplo, en las metal-proteínas.

Los fluidos biológicos, sangre y orina, pueden, con frecuencia, ser introducidos directamente en la llama después de una simple dilución. Para el análisis de sangre suele utilizarse suero o plasma (suero con anticoagulante, como heparina u oxalato), ya que en esta fracción están contenidos los elementos metálicos en concentraciones significativas desde el punto de vista clínico². En ocasiones, el metal puede estar más concentrado en los glóbulos rojos, pero los cambios de concentración en el suero o plasma tienen mayor significación clínica. Tal es el caso del potasio, cinc, magnesio, hierro. En estos casos es fundamental que la muestra de sangre no sufra hemólisis (rotura de los glóbulos rojos) antes de que se complete la separación del suero o plasma.

Cuando se requiere la destrucción de la materia orgánica, ésta puede llevarse a cabo por calcinación en seco, o por vía húmeda. La calcinación en seco puede originar pérdidas por volatilización, por lo que suele preferirse la digestión por vía húmeda. Una mezcla muy eficaz para muestras biológicas es la formada por HNO_3 : H_2SO_4 : HClO_4 en la proporción 3:1:1 en volumen, usando 1 mililitro por gramo de muestra.

Las muestras metálicas y las aleaciones suelen disolverse en ácidos minerales, mientras que las muestras biológicas o materiales orgánicos requieren fusión ácida o alcalina. En cualquier caso, es importante, como ya se ha mencionado, que la matriz de los patrones se aproxime a la de la muestra, o si no, diluir la muestra para minimizar los efectos de matriz.

² Una excepción se da en los casos de envenenamiento por plomo, pues éste está concentrado en los glóbulos rojos.

Un tipo especial de determinaciones directas son las basadas en la volatilización del elemento o algún derivado. Ello implica la separación del analito por volatilización a temperatura ambiente o a temperatura elevada, en forma de átomos libres o algún compuesto volátil. Por esta técnica es posible medir concentraciones muy bajas, pues las especies volatilizadas pueden recogerse a partir de un gran volumen de disolución, en la que queda la matriz y las sustancias interferentes. Dentro de este tipo de determinaciones, las más utilizadas son la técnica del vapor frío para el mercurio y la técnica de generación de hidruros.

- **Técnica del vapor frío** para el mercurio (Hg).

El mercurio tiene la inusual propiedad (para ser un metal) de que no se oxida fácilmente por el aire y, además, tiene una apreciable presión de vapor a temperatura ambiente. Por ello, la determinación de mercurio combinado consiste en originar iones Hg^{2+} , lo cual, cuando se trata de compuestos orgánicos, se consigue por tratamiento con un oxidante (MnO_4^-) y posterior reducción a Hg^0 con una sal de Sn^{2+} (después de haber eliminado el exceso de oxidante).

El mercurio metálico originado es arrastrado por un gas portador hacia el camino óptico del aparato de absorción atómica, midiendo la absorbancia a 263.7 nm, sin necesidad de llama ni atomización electrotérmica. Se consiguen límites de detección de 0.002 ng/mL, habiéndose diseñado sistemas automáticos para llevar a cabo esta determinación.

- **Técnica de generación de hidruros** (As, Se, Sb, Te, Bi, Sn, Pb).

La técnica se utiliza para aquellos elementos que pueden formar hidruros covalentes volátiles: As, Se, Sb, Sn, Te, Bi, Pb. En principio, estos elementos, en disolución, se reducen con cinc, magnesio, aluminio o borohidruro, para formar los correspondientes hidruros, los cuales se hacen pasar al atomizador, donde se disocian en átomos libres, midiendo su absorbancia a las longitudes de onda de sus líneas de resonancia.

La sensibilidad del método es incluso mayor a la obtenida con atomización electrotérmica, y prácticamente está libre de interferencias, ya que implica la separación de los elementos en forma gaseosa.

En relación con cuestiones medioambientales, es importante conocer las concentraciones de metales pesados en aguas potables, debido a su toxicidad. Además, incluso la utilización prolongada de un agua que contenga concentraciones muy bajas puede resultar peligrosa, pues en muchos casos el efecto es acumulativo. En este sentido, resultan especialmente indeseables los elementos plomo, cadmio y mercurio, cuyas concentraciones máximas permitidas por la CEE son 0.05, 0.005 y 0.001 mg/mL respectivamente. La determinación de estos elementos a esos niveles de concentración es difícil de llevar a cabo. El plomo puede determinarse por absorción atómica empleando la técnica de generación de hidruros, mientras que el mercurio puede cuantificarse utilizando la técnica del vapor frío³.

³ Posiblemente, la técnica más adecuada para determinar metales pesados en aguas de forma rápida, simple y directa, sea la **voltamperometría de redisolución anódica**.

Con estas técnicas se pueden medir concentraciones muy bajas y en la práctica sin interferencias, pues los elementos se separan en fase gaseosa.

La espectroscopia de absorción atómica con llama es el método más empleado para la determinación de metales en una amplia variedad de matrices. Su popularidad se debe a su especificidad, facilidad de operación y sensibilidad. En este método la solución muestra es directamente aspirada a una llama de flujo laminar. La llama tiene como función generar átomos en su estado fundamental, de los elementos presentes en la solución muestra. Temperaturas cercanas a los 1500-3000°C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa.

Si comparamos la atomización electrotérmica con respecto a la atomización por llama [20], la primera, con respecto a la segunda, muestra las siguientes ventajas:

- Sensibilidad elevada, debida fundamentalmente a la alta eficacia del proceso de atomización, como se refleja en la tabla.

ELEMENTO	HORNO	LLAMA	LLAMA/HORNO
Ag	0.02	15	75
Al	0.1	45	450
Ba	0.4	15	38
Cd	0.008	0.8	100
Cu	0.1	15	15
Fe	0.1	5	50
Mn	0.004	15	38
Pb	0.006	15	250
Zn	0.1	15	15

Tabla 3. Límites de detección (mg/L) de llama y horno de grafito.

- Volúmenes de muestra pequeños, comprendidos entre 0.5 y 10 μ l.
- Tratamiento de la muestra in situ. La destrucción de la materia orgánica, junto con la posibilidad de analizar directamente líquidos viscosos e incluso sólidos, son ventajas importantes de este sistema de atomización.

La atomización electrotérmica presenta con respecto a la atomización por llama los siguientes inconvenientes:

- Menos reproducibilidad, ya que la precisión de los métodos sin llama se encuentra normalmente en el intervalo del 5 al 10 %, frente al 1 % o menos que puede obtenerse al operar con llama.
- Interferencias, que son uno de los mayores problemas de los atomizadores electrotérmicos. Pueden ser de los tipos siguientes:
 - ✓ Señales de fondo. Cuando se produce una gran concentración de la matriz vaporizada durante la atomización puede tener lugar la dispersión del haz incidente o la absorción por especies moleculares vaporizadas, por ello lo más conveniente es un corrector de fondo de Zeeman [21].

- ✓ Efectos de memoria. La atomización incompleta de un elemento se realiza en la siguiente determinación, al acumularse en el atomizador.
- ✓ Pérdidas por pirólisis. Cuando el analito está presente en la matriz en una forma significativamente volátil a la temperatura de mineralización.
- ✓ Formación de carburos. Puede influir sobre la cinética del proceso de atomización.
- Mayor tiempo de análisis que con llama.
- Pequeño intervalo analítico, que suele ser menor de dos órdenes de magnitud, y el precio del mismo sistema y además por la necesidad de renovar periódicamente el tubo de grafito.

La absorción atómica es un excelente método para la determinación de elementos a nivel de trazas. El método está basado en la absorción de radiación electromagnética, cumpliéndose la *Ley de Beer*. Sin embargo, como en los métodos de absorción molecular, puede ser arriesgado llevar a cabo una determinación sin comprobar experimentalmente la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Por ello, las determinaciones se llevan a cabo mediante la correspondiente curva de calibrado, si bien, en ocasiones, resulta ventajoso el método de adición estándar.

Para caracterizar las medidas de absorción atómica suelen utilizarse los dos parámetros siguientes: sensibilidad y límite de detección. La **sensibilidad** se define como la concentración en solución del elemento a determinar que origina una absorbancia de 0.00444 (1 % de absorción) unidades a la longitud de onda usada, respecto al disolvente. También puede considerarse como la pendiente del calibrado en su región lineal. Así, la sensibilidad es una medida del tamaño de la señal de absorción.

Por su parte, el **límite de detección** suele tomarse como la concentración de elemento que produce una señal dos o tres veces la raíz cuadrada del valor medio del ruido de fondo. En otros términos, es la más baja concentración que estadísticamente puede distinguirse del cero (blanco).

9.4.7. Interferencias.

En espectroscopia de absorción atómica la concentración de un elemento en una muestra se determina por comparación de la absorbancia de la solución muestra con la absorbancia de soluciones estándar de concentración conocida. Si cualquier constituyente de la muestra altera uno o más pasos en el proceso de formación de átomos en su estado fundamental en la llama, llevará a un error en la medición de la concentración.

Por tanto, se producen interferencias cuando la absorción o emisión de una especie interferente se solapa o aparece muy próxima a la absorción o emisión del analito, de modo que su resolución por el monocromador resulte imposible. Las interferencias químicas se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito. Dado que las líneas de emisión de las fuentes de cátodo hueco son muy estrechas es rara la interferencia debida a la superposición de las líneas, para que exista esta interferencia la separación entre las dos líneas tiene que ser menor a 0.1 Å. Algunos instrumentos poseen Slit (rendija) y monocromadores muy finos que pueden discernir en 0.1 nm de diferencia. Algunas matrices presentan señal de ruido que se elimina con el background del instrumento permitiendo resultados reproducibles.

El tipo más común de interferencia es el producido por aniones que forman compuestos de baja volatilidad con el analito y reducen así su velocidad de atomización lo que origina resultados menores a los esperados.

En un aspecto, la absorción atómica está notablemente libre de interferencias. La serie de niveles de energía electrónica de un átomo es única para ese elemento. Esto significa que dos elementos no presentarán líneas espectrales en la misma longitud de onda exactamente. A menudo las líneas de un elemento están muy cerca de las de otro elemento, pero, por lo general, es posible encontrar una línea de resonancia de un elemento dado que no tiene una interferencia espectral directa causada por los demás elementos de la muestra.

Las principales interferencias en la absorción atómica son los efectos de matriz que tienen influencia sobre el proceso de atomización. El grado en el que se disocian los átomos a cierta temperatura y la velocidad del proceso depende mucho de la composición global de la muestra. De hecho, si una solución de cloruro de calcio se nebuliza y disolvata, las partículas minúsculas de CaCl_2 sólido se disocian para dar átomos de Ca mucho más rápidamente de lo que se disociarían las partículas de fosfato de calcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Los efectos de matriz son un problema frecuente en química analítica y casi siempre son de crucial importancia en espectroscopia debido a que la composición general global de la muestra puede ejercer un efecto tremendo sobre el grado y la velocidad de disociación con las que se forma el vapor atómico deseado. Es de particular importancia que las soluciones estándar tengan una composición muy similar a la de las muestras desconocidas, con respecto a los componentes presentes en mayor cantidad. Cuando se espera que exista variación en la composición global de una muestra a otra, por lo general es adecuado que el analista forme su propia matriz adicionando suficiente cantidad de algún material que enmascare las variaciones de la muestra.

En lo que respecta a la atomización electrotérmica, las determinaciones están sometidas a significativas interferencias derivadas de la absorción molecular, así como de los efectos químicos y de la matriz. Cuando los componentes de la matriz de la muestra se volatilizan durante la atomización puede tener lugar una absorción de banda ancha. Para compensar esta interferencia existen diversas técnicas de corrección del fondo que se pueden encontrar en el mercado. Una fuente continua (por ejemplo, un arco de deuterio) puede corregir el fondo hasta niveles de absorbancia de 0.8 o similares. Los correctores de fondo de efecto Zeeman pueden manipular absorbancias del fondo de hasta 1.5 a 2.0. La técnica de corrección de Smith-Hieftje puede ajustar niveles de absorbancia del fondo de 2.5 a 3.0. La corrección del fondo deberá usarse cuando se analizan muestras que contienen concentraciones elevadas de ácidos o sólidos disueltos y al determinar elementos con los que se utiliza una línea de absorción por debajo de 350 nm.

Para reducir al mínimo la interferencia puede acudir a la modificación de la matriz, añadiendo diversos productos químicos a la muestra. Alternativamente, se puede programar un dispositivo automático de obtención de muestras que añada modificadores de la matriz directamente a la muestra en la cámara del horno. Algunos modificadores de la matriz reducen la volatilidad del elemento que se determina o aumentan su eficacia de atomización por cambio de su composición química. Esto permite emplear temperaturas de carbonización más elevadas para volatilizar las

sustancias que interfieren aumentando al mismo tiempo la sensibilidad. Otros modificadores aumentan la volatilidad de la misma.

El calentamiento gradual puede servir para disminuir las interferencias del fondo y permite el análisis de muestras con matrices complejas, así como el incremento continuo y controlado de la temperatura del horno en cualquiera de las etapas de la secuencia de temperaturas. El secado gradual se emplea en casos de muestras que contengan muestras de disolventes o con elevado contenido en sal. Las muestras que contienen una mezcla compleja de componentes de la matriz requieren a veces una carbonización gradual, para que tenga lugar una descomposición térmica completa y controlada. La atomización gradual puede reducir la absorción de fondo por permitir la volatilización del elemento que se determina antes que la matriz. Este método tiene especial aplicación en la determinación de elementos volátiles tales como el cadmio y el plomo.

ELEMENTO	Modificadores de matriz para eliminar interferencias	Modificadores de matriz como reforzadores
Al	Mg(NO ₃) ₂	Ca(NO ₃) ₂ , Ca ₃ (PO ₄) ₂ , H ₂ SO ₄
Sb	Ni(NO ₃) ₂ y Mg(NO ₃) ₂	-
As	Mg(NO ₃) ₂ , Ni(NO ₃) ₂	-
Be	Al(NO ₃) ₂ , Mg(NO ₃) ₂	Ca(NO ₃) ₂
Cd	NH ₄ H ₂ PO ₄ y Mg(NO ₃) ₂ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ y Mg(NO ₃) ₂ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , HNO ₃ , (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	-
Cr	Mg(NO ₃) ₂	-
Co	Mg(NO ₃) ₂ , NH ₄ H ₂ PO ₄ , ácido ascórbico	MgSO ₄ , LaNO ₃
Cu	NH ₄ NO ₃ , ácido ascórbico	-
Fe	NH ₄ NO ₃	-
Pb	NH ₄ H ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ , Mg(NO ₃) ₂ , NH ₄ NO ₃ , ácido ascórbico, ácido oxálico, ácido fosfórico, HNO ₃ , LaCl, (NH ₄) ₂ EDTA	-
Mn	Ácido ascórbico, Mg(NO ₃) ₂ , NH ₄ NO ₃	-
Mo	-	HNO ₃
Ni	Mg(NO ₃) ₂ , NH ₄ H ₂ PO ₄	-
Se	Ni(NO ₃) ₂ , Ni(NO ₃) ₂ y Mg(NO ₃) ₂ , Ni(NO ₃) ₂ y Cu(NO ₃) ₂ , AgNO ₃ , (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , Fe(NO ₃) ₃ y Cu(NO ₃) ₂	-
Ag	(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄	-
Sn	(NH ₄) ₂ HPO ₄ y Mg(NO ₃) ₂ , Ni(NO ₃) ₂ , ácido ascórbico, NH ₄ NO ₃	Ca(NO ₃) ₂

Tabla 4. Modificadores de matrices potenciales para espectrometría de absorción atómica electrotrémica (22).

El empleo de patrones es útil para compensar interferencias de la matriz. Cuando se realizan adiciones de patrones (compensación de interferencias de matriz) hay que determinar si la especie añadida y el elemento que se analiza tienen un comportamiento similar en las condiciones especificadas.

A temperaturas elevadas de carbonización y atomización, tiene lugar una interacción química del tubo de grafito con varios elementos formando carburos refractarios. Los elementos que forman carburos son el bario, molibdeno, níquel, titanio, vanadio y silicio. Esta formación de carburos se caracteriza por la aparición de picos de atomización anchos, de amortiguación prolongada y de sensibilidad reducida. La utilización de tubos con recubrimiento pirolítico para estos metales reduce el problema. Para el

análisis de aluminio, las plataformas L'vov tratadas con torio dan picos más nítidos a bajas concentraciones y refuerzan la estabilidad de la carbonización.

9.5. Determinación de los niveles de aluminio en las muestras.

9.5.1. El aluminio en los sistemas biológicos.

El aluminio se consideró inocuo para los seres humanos. No obstante, cada vez se tiene más claro el impacto que presenta este metal sobre los sistemas biológicos.

El aluminio, elemento ampliamente extendido en la corteza terrestre, ocupa el tercer lugar por orden de abundancia, y en el medio se encuentra preferentemente en el suelo donde se halla formando parte de la estructura química de minerales y rocas (aluminosilicatos, preferentemente, SIAL). Dichos compuestos son estables y sólo se vehiculiza el aluminio en forma de catión hacia la disolución del suelo, mediante el concurso de acciones que preferentemente se deben a factores atmosféricos; éstos provocan cambios fisicoquímicos que pueden originar la fractura de las rocas superficiales y de esa manera el aluminio como catión se incorpora a la disolución del suelo.

El contacto del aluminio con la materia viva es permanente, ya que todo el ambiente que nos rodea es una fuente potencial de incorporación del aluminio. Sin embargo nos encontramos con el hecho aparentemente paradójico de que los contenidos del aluminio en los fluidos biológicos son muy bajos, del orden de microgramos por litro, lo que hace evidente que los organismos vivos disponen por un lado de unos sistemas activos que impiden su incorporación al tiempo que están dotados de unos mecanismos que facilitan la eliminación de las pequeñas cantidades absorbidas. En el ser humano no se conoce ninguna función esencial. Se estima que un adulto normal contiene alrededor de 300 mg de aluminio (11.11 mmol) [23].

El aluminio se encuentra en los sistemas biológicos en el estado de oxidación +3, y su índice de coordinación es 6.

El Al^{+3} se une al ATP por enlaces más fuertes que el magnesio, dando lugar a un compuesto inactivo [24] [25]. También presenta una interferencia con el metabolismo del Fe^{+3} . Se acumula en el hueso [26] produciendo osteomalacia [27] [28] [29] y calcificaciones [30]. Los productos naturales aportan una cantidad que se estima en un intervalo de 2 a 10 mg/día (0.07-0.37 mmol/día) [31], pero los compuestos del aluminio se emplean en la industria alimentaria en forma de aditivos, espesantes y colorantes. El aluminio es también material integrante de la línea de envasado de los contenedores alimentarios y culinarios. Así mismo el sulfato de aluminio se utiliza como floculante en el tratamiento de las aguas potables suministradas a las poblaciones, lo que eleva su contenido hasta diez y quince veces. Todas estas circunstancias son la causa de que el aluminio incorporado con la dieta sea sensiblemente mayor de lo esperable, alrededor de 30 mg (1.1 mmol) al día.

De especial interés resulta el contenido de aluminio en los compuestos destinados a la alimentación parenteral, porque en este caso por no existir ningún tipo de barrera fisiológica, la incorporación a la circulación sanguínea es total. Así mismo deben tener bajas concentraciones de aluminio las leches maternizadas y las aguas de bebida destinadas a la población infantil [32], ya que en esta etapa la mucosa intestinal tiene una mayor permeabilidad y tanto en este supuesto como en el de la

alimentación parenteral, existe el riesgo de que la cantidad del aluminio incorporada por día supere las posibilidades de la eliminación renal.

En el ser humano, los procesos de la absorción realizados en el tracto gastrointestinal son bastante complejos, por lo que la carencia de isótopos trazadores dificulta el estudio de los mecanismos de absorción y distribución a nivel orgánico. Por tanto, existe un escaso conocimiento de los mismos [33].

Se estima que el riñón es capaz de eliminar hasta 500 µg de aluminio (18 µmol) por día [34].

9.5.2. Procedimientos para la medida directa del contenido de aluminio.

En este apartado se va a realizar una revisión metodológica acerca de los procedimientos para la medida directa en laboratorio del contenido de aluminio en los materiales biológicos que presentan una mayor fiabilidad.

Las revisiones de los métodos analíticos para la determinación de Al las realizaron *Sorenson et al* [35], *Berman* [36], *Cornelis* [37] y *Ward et al* [38].

La concentración extremadamente baja de Al en el organismo y el hecho de oxidarse rápidamente limita la utilización de los métodos químicos convencionales. En general, las concentraciones de Al determinadas en los materiales biológicos por fotometría y fluorescencia son demasiado elevadas como para decir que los niveles de detección no son satisfactorios y que estos métodos no son específicos.

La absorción atómica sin llama parece ser, hoy en día, el método de elección para la determinación analítica rutinaria de Al en los materiales biológicos.

9.5.2.1. Espectrometría de absorción molecular ultravioleta-visible y de fluorescencia molecular.

La aplicación de la espectrometría de absorción molecular ultravioleta-visible y de fluorescencia se ha indicado para la medida de la concentración del aluminio en el agua, pero presenta unas limitaciones importantes. En el caso de la espectrometría de absorción molecular ultravioleta-visible el inconveniente es fundamentalmente la sensibilidad, mientras que la espectrometría de fluorescencia ofrece unos procedimientos más sensibles pero poco selectivos [39] [40]. Experimentos con el cromo y los fluoróforos alternativos como el 2-hidroxi-1-naftaldheído-p-metoxibenzoil hidrazona [41], o con otros reactivos como el cromo azulol S, salicilidina-o-aminofenil, han mostrado un considerable aumento de la sensibilidad. En mejoras posteriores de la técnica se añadió un surfactante para incrementar la fluorescencia, 10 veces superior para el complejo aluminio-morin. El principal inconveniente en este caso es la falta de selectividad siendo el Fe^{3+} la interferencia más significativa. El problema se puede resolver mediante la inclusión de agentes que minimizan los interferentes y los excluyen de la reacción.

En consecuencia los métodos espectrométricos de absorción molecular ultravioleta-visible y de fluorescencia molecular sólo son apropiados para la medida de la concentración del aluminio en los especímenes que teniendo un bajo contenido del aluminio no tengan limitaciones de cantidad de muestra. Estos métodos son:

- Procedimientos suficientemente sensibles para el análisis de las aguas y los líquidos de diálisis.
- Son especialmente útiles para el análisis de los concentrados de diálisis con el uso de los agentes que evitan las importantes interferencias de este tipo de matriz.
- También son prácticos para el control de la contaminación de los contenedores de muestras destinados a la cuantificación del aluminio.

9.5.2.2. Espectrometría de absorción atómica: Llama (FAAS) y Electrotérmica (ETAAS).

La capacidad de detección aportada por la Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS) con llama de óxido nitroso-acetileno es alrededor de 0.15 mg/L (5.56 $\mu\text{mol/L}$), no siendo por tanto adecuado para la medida de la concentración del aluminio en los especímenes de interés clínico. Sin embargo, esta técnica es interesante por su rapidez y sencillez y puede ser de elección para la medida de la concentración de aluminio en los especímenes donde la concentración sea suficientemente elevada y cuando la cantidad de muestra no suponga una limitación.

Se considera como método de elección para la determinación de aluminio en los especímenes biológicos la Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS) con horno de grafito. Es un método rápido y de una alta sensibilidad, necesitando tan sólo volúmenes de muestra del orden de microlitros; el límite de detección se encuentra en torno a 1-2 $\mu\text{g/L}$ (0.04-0.07 $\mu\text{mol/L}$).

Los especímenes empleados en este campo han sido predominantemente el suero (excepcionalmente plasma), la sangre, el líquido cefalorraquídeo, los tejidos, la orina, y otros materiales como son los productos farmacéuticos de administración parenteral y enteral, leches para uso infantil y los alimentos.

Los programas de temperaturas de las fases de mineralización y atomización utilizados en la Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica habitualmente han de optimizarse en función del tipo de muestra y las características de la instrumentación.

Así, se han introducido modificaciones con el fin de evitar las interferencias tales como la formación de los carburos de aluminio, que impiden la liberación y la atomización de los átomos de aluminio. Las modificaciones aportadas en los métodos descritos para la técnica de la espectrometría de absorción atómica electrotérmica con horno de grafito (ETAAS) para los especímenes biológicos pueden resumirse en los siguientes puntos [42]:

- Empleo de tubos de grafitos recubiertos de una superficie pirolítica o pretratados con tántalo o zirconio, con el fin de alargar su vida y mejorar la sensibilidad.
- Empleo de la plataforma estabilizadora de temperatura (plataforma de L'vov) que permite calentar por una irradiación la muestra a analizar, con lo que se mejora la precisión.
- Uso de correctores de fondo mediante las lámparas de deuterio, sistema Smith-Hiefjte o efecto Zeeman, los cuales evitan las interferencias moleculares. De todos los correctores citados, es de elección el corrector con efecto Zeeman, confiriendo a la técnica una elevada especificidad.
- Uso de modificadores químicos que desplacen los átomos de cloro y prevengan la formación de cloruro de aluminio volátil en las etapas previas a la atomización.

En la práctica, suele ser suficiente con diluir los especímenes con agua, ácido nítrico y un surfactante como es el Tritón® X-100 convenientemente controlado en su concentración en aluminio. El surfactante modifica la viscosidad y la tensión superficial que presentan las muestras del suero, el plasma o la sangre, incrementa la acción humectante y favorece la eliminación del residuo carbonoso.

También puede emplearse algún otro tipo de modificadores como es el nitrato de magnesio con el fin de reducir la volatilidad del cloruro de aluminio.

No obstante, los modificadores de matriz tienen el inconveniente de ser fuente de contaminación y se aconseja reducir su uso siempre que sea posible [43]. Para el caso de la medición de la concentración de aluminio en el suero se considera que su propio contenido en magnesio actúa como modificador de matriz endógeno favoreciendo la estabilidad del aluminio contenido en la muestra.

- Uso de diferentes procedimientos de calibrado. Es deseable emplear calibradores con matriz compensada, haciendo adiciones de estos calibradores sobre un espécimen del suero una disolución de albúmina con un bajo contenido en aluminio, ya que las proteínas son la causa más importante del efecto matriz. Por ello, debe prestarse una especial atención a las condiciones del calibrado y utilizar siempre controles intra e interlaboratorio.

En lo que se refiere a la detección, la longitud de onda más sensible es la de 309.3 nm y la linealidad se mantiene hasta los 60-80 µg/L (2.22-2.97 µmol/L). En los casos con concentraciones mayores, se dispone, como alternativa a una mayor dilución, el empleo de la línea 396.2 nm.

Como gas de purga es de elección el argón frente al nitrógeno porque mejora la capacidad de detección.

El programa óptimo de temperatura depende en gran medida de la matriz de muestra. Se recomienda usar un calentamiento lento en rampa para los procesos de secado y carbonización, finalizando con un rápido incremento de la temperatura para la fase de atomización. El proceso comprende 3 fases:

1. *Secado*, controlado en tiempo y temperatura para evitar la pérdida de muestra.
2. *Carbonización*, destruye la matriz biológica sin pérdida del elemento. Para el aluminio se encuentra en el intervalo de 1400 - 1600 °C. Se trata de la etapa más crítica, ya que si está bien seleccionada previene de las posibles pérdidas del componente analizado y minimiza las posibles interferencias matriciales.

En los últimos segundos de esta etapa de pirólisis la recuperación de la línea base de absorción, indica que la muestra está preparada para dar paso a la etapa de atomización.

3. *Atomización*, con temperaturas elevadas del orden de 2600 a 2800°C durante uno o dos segundos, se atomiza el componente analizado y se produce la absorción atómica.

Finalmente, se aumenta la temperatura para limpiar completamente la plataforma y eliminar el posible efecto memoria.

El volumen de la muestra inyectado es de 5 a 50 µL, en general 20 µL es un volumen adecuado.

Estos métodos son aplicables, a su vez, para la medida de la concentración de aluminio en los distintos fluidos biológicos: suero, orina y líquido cefalorraquídeo.

La experiencia derivada de los resultados recogidos en la bibliografía, manifiesta una amplia diversidad, lo que sugiere la necesidad de un estricto control de la contaminación a lo largo de todo el proceso preanalítico e intraanalítico [44]. La contaminación de los especímenes biológicos puede producirse por el material de la instrumentación empleada en su obtención, el empleo de desinfectantes, el polvo atmosférico y los viales empleados para su conservación. Para evitar la contaminación de los especímenes, éstos deben ser manejados con material de plástico desechable, evitando los recipientes de vidrio, realizando su trasvase en una cámara limpia y manteniendo los especímenes tapados hasta su proceso analítico.

Así mismo es importante que el proceso intraanalítico se realice en una cámara limpia para evitar contaminación de aluminio procedente del polvo atmosférico.

Teorías de formación del pico de aluminio por E.A.A.

Aunque la determinación del aluminio por E.A.A. es una técnica que se lleva a cabo de manera rutinaria se está todavía lejos de conocer con profundidad los mecanismos que originan la aparición de un pico de átomos de aluminio. A este respecto existen en la actualidad dos teorías fundamentales.

a. Teoría de formación de carburos gaseosos.

El uso del horno de grafito recomendado por L'vov hace 30 años constituye en la actualidad el modo principal del empleo de la E.A.A. debido a la extrema sensibilidad de sus medidas. Además el hecho de la naturaleza del horno tubular construido a partir de grafito juega un papel fundamental según este autor, a la hora de explicar los mecanismos de formación de átomos que originarán los procesos de absorción que posteriormente serán cuantificables [45].

En síntesis L'vov indica que durante el proceso de atomización del aluminio se forman diversos carburos tales como Al_2C , Al_2C_2 , Al_2C_3 , Al_2C_5 y Al_4C_3 que aparecen alrededor de 100° a 200° K antes de la aparición de los átomos libres y de los óxidos del metal. Estas moléculas interaccionan para originar los átomos de Al (g).

La aparición del metal gaseoso se basaría en diversas reacciones que se indican a continuación [46]. El modelo propuesto gira sobre el hecho de que el óxido metálico es directamente reducido por moléculas gaseosas de carburos metálicos que a su vez interaccionan con los óxidos del aluminio para formar aluminio metálico, proponiéndose las siguientes ecuaciones [47] [48]:



Los carburos metálicos se forman por interacción del Al (g) con el carbono C (s) en la superficie del tubo de grafito.



La formación de AlO provendría de la reacción:



De esta forma el aluminio generado inicialmente origina una serie de reacciones a través de los carburos que darán lugar a una mayor aparición de átomos de aluminio.

Además, tras posteriores estudios, este autor y sus colaboradores han propuesto que el esquema anterior de reducción del Al_2O_3 podría completarse según las reacciones



El $\text{Al}_2\text{O (g)}$ formado originaría a su vez Al (g) por reacción con los carburos de aluminio de manera similar a como sucede con el AlO. En esta teoría serían los carburos del metal los principales responsables de la formación de átomos en vez de los óxidos metálicos.

b. Teoría de la reducción autocatalítica del Al_2O_3 .

Marc M. Lamoureux [49] y col. han propuesto un mecanismo de formación del aluminio a partir de los trabajos de *Gilmutdinov y col* [50] [51] que usaron una cámara de cine equipada con una película sensible a la luz U.V. para filmar el interior del horno de grafito durante la fase de atomización. *Lamoureux et al* en el trabajo citado, emplean un equipo diseñado específicamente para permitir la medición simultánea de los átomos de aluminio por espectroscopía de A.A., de las moléculas con aluminio por espectroscopía de absorción molecular y un ICP-MS conectado al horno de grafito para identificar las diversas especies moleculares.

Para recoger las sombras de los espectros formados emplearon la técnica de *Gilmutdinov y col* [50] de filmación espectral de la sombra o Shadow Spectral Filming (SSF) y la técnica de *Chakrabarti et al* de recogida de imágenes mediante digitalización espectral de la sombra o Shadow Spectral Digital Imaging (SSDI) [52].

Gracias a estas técnicas se ha podido estudiar la distribución espacial de los átomos de aluminio y de las moléculas conteniendo este elemento. A partir de aquí se han postulado las interacciones que pueden ocurrir entre las especies que contienen aluminio, el oxígeno presente dentro del tubo y la superficie del grafito.

De esta forma se ha podido observar que las principales especies detectadas por el ICP-MS han sido: Al, AlO, Al_2O y AlC_2 .

Además de los espectros de absorción recogidos durante la atomización del aluminio correspondiente al metal en estado atómico y en diversas moléculas, todas las imágenes mostraron un perfil similar en forma de “donut” donde la absorción es mayor en las proximidades de las paredes de grafito para posteriormente ir decreciendo hacia el interior del tubo. Esto que es

mucho más aparente en ausencia de flujo de argón es menos notorio con un flujo de gas de 50 mL/min.

Gilmudinov y col [51] proponen una formación inicial de subóxido de aluminio vaporizado Al_2O (g) que sería transformado a continuación en Al_2O_3 merced a la reacción de la primera molécula con el oxígeno que entra en el orificio de dosificación.

Por su parte, *L'vov* [53] sugiere que la formación de la estructura de “donut” proviene de la condensación de las especies en fase vapor en la porción final del tubo que está más frío. Estas especies serán principalmente Al y Al_2O_3 .

A partir de aquí, *Lamoureux et al* propusieron el mecanismo de formación del pico de aluminio que se va a describir.

Durante el pretratamiento térmico y antes de la atomización, el residuo de la solución de aluminio desecado se convierte en Al_2O_3 en el rango de temperaturas entre 500 y 1000°C. La disociación térmica ocurre lentamente a temperaturas por debajo de 2050°C (el punto de fusión del Al_2O_3).

Aunque la disociación térmica del Al_2O_3 es una posible fuente de átomos de aluminio en estado gaseoso, el paso más favorable para la formación del Al (g) es la disociación térmica de los carburos de aluminio.

Estas moléculas y los oxcarburos juegan un papel importante en la producción de aluminio elemental por fusión carbotérmica.

El carburo de aluminio fase condensado [Al_4C_3 (s,l)] cuya presencia se ha informado durante la atomización del Al, es formado a través de las siguientes reacciones:



que originan la reacción global:

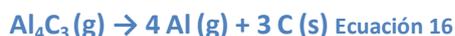


La formación del oxcarburo ($2 \text{Al}_2\text{O}_3 (\text{s}) + 3 \text{C}(\text{s}) \rightarrow \text{Al}_4\text{O}_4\text{C}(\text{s}) + 2 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 13) se produce rápidamente a temperaturas superiores a 1450°C y la reacción global ($2 \text{Al}_2\text{O}_3 (\text{s}) + 9 \text{C}(\text{s}) \rightarrow \text{Al}_4\text{C}_3(\text{s/l}) + 6 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 15) a 1810°C. *Kantar et al* [54] informaron que la reacción descrita por la $2 \text{Al}_2\text{O}_3 (\text{s}) + 9 \text{C}(\text{s}) \rightarrow \text{Al}_4\text{C}_3(\text{s/l}) + 6 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 15 puede ocurrir por agentes reactantes mezclados desigualmente a elevadas concentraciones y es altamente exotérmica.

De todas maneras el Al_4C_3 solo puede ser formado si el Al_2O_3 está en contacto íntimo con el sustrato de grafito y la reacción ocurre preferiblemente en los sitios activos como roturas y otros defectos.

De esta manera, bajo las condiciones de formación del pico de aluminio solo una pequeña fracción del aluminio total se podría esperar que estuviera en la forma de Al_4C_3 y la mayoría del aluminio

permanecería como Al_2O_3 . El carburo de aluminio Al_4C_3 podría ser generado a una temperatura superior a su punto de fusión de 1400°C y aparecería como un líquido fundido con algo de Al_2O_3 disuelto en él. La exotermicidad de la acción representada por la $2 \text{Al}_2\text{O}_3 (\text{s}) + 9 \text{C}(\text{s}) \rightarrow \text{Al}_4\text{C}_3(\text{s/l}) + 6 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 15 hace razonable esperar que algo de Al_4C_3 se vaporice y posteriormente se disocie en la fase gaseosa para formar átomos de aluminio:



Los átomos de aluminio formados por disociación del $\text{Al}_4\text{C}_3 (\text{g})$ pueden actuar como semillas que generarán una reacción en cascada donde el aluminio reaccionará con el Al_2O_3 para dar:



Motzfeldt y Steinmo [55] indicaron que se formaba preferentemente $\text{Al}_2\text{O} (\text{g})$ en vez de $\text{AlO} (\text{g})$. Basándose en consideraciones de equilibrio estos autores establecieron que la $p_{\text{Al}_2\text{O}}$ aumentaba mucho más rápidamente que la p_{AlO} , conforme aumentaba la p_{Al} . De esta manera el mecanismo propuesto sólo consideraría la formación del Al_2O .

De todos modos parece ser que se precisa un cierto valor de presión parcial de $\text{Al} (\text{g})$ - p_{Al} necesario para que la reacción con el Al_2O_3 ($\text{Al}_2\text{O}_3 (\text{s}) + 4 \text{Al} (\text{g}) \rightarrow 3 \text{Al}_2\text{O} (\text{g})$ Ecuación 17) pueda comenzar.

Tras la formación del $\text{Al}_2\text{O} (\text{g})$ sucede una reacción en cadena sobre la superficie del grafito según la ecuación:



De esta manera cada vez que se forman 4 átomos del $\text{Al} (\text{g})$ ($\text{Al}_4\text{C}_3 (\text{g}) \rightarrow 4 \text{Al} (\text{g}) + 3 \text{C} (\text{s})$ Ecuación 16) se generan por este procedimiento 6 átomos de $\text{Al} (\text{g})$ ($3 \text{Al}_2\text{O} (\text{g}) + 3 \text{C}(\text{s}) \rightarrow 6 \text{Al} (\text{g}) + 3 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 19) lo que supone una multiplicación por un factor de 1.5.

Este mecanismo autocatalítico requiere que:

- El Al y Al_2O estén presentes simultáneamente en la fase gaseosa.
- Que el Al_2O es el precursor significativo de la formación de átomos de Al .
- Que la distribución espacial de Al y Al_2O sean complementarias.

Estas premisas son consistentes con los resultados obtenidos de las medidas simultáneas de E.A.A., E.M.S. e ICP-Masas. El pico de aluminio desaparece además de por falta de suministro de aluminio, porque pueden ocurrir cualquiera de los siguientes factores limitantes:

- La presión parcial de equilibrio del $\text{Al} (p_{\text{Al}})$ sobre el $\text{Al}_4\text{C}_3(\text{s/l})$ (que es aproximadamente 105 veces mayor que sobre el $\text{Al}_2\text{O}_3(\text{s})$).
- La p_{CO} gobernada por la $3 \text{Al}_2\text{O} (\text{g}) + 3 \text{C}(\text{s}) \rightarrow 6 \text{Al} (\text{g}) + 3 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 19.

Cuando se alcanza cualquiera de ambas se pueden originar una serie de reacciones reversibles que terminarán la formación del pico de Al .

Así el Al_2O y el CO o el O_2 pueden reaccionar para generar partículas de Al_2O_3 o el Al y el CO pueden reaccionar también para formar partículas de Al_4C_3 y Al_2O_3 todas ellas dispersadas en la fase gaseosa. Del mismo modo, también es posible que algunas especies en fase vapor condensen en las zonas más frías del tubo.

Todo esto es consistente con la observación por diferentes técnicas de fotografía de espectros de las estructuras de “donut” que son atribuidos tanto a la formación del Al_2O_3 como a la condensación de otras especies en los puntos fríos del tubo.

Cuando se alcanza la temperatura apropiada de formación de Al , de nuevo se repite todo el proceso y las reacciones correspondientes a la $\text{Al}_2\text{O}_3 (\text{s}) + 4 \text{Al} (\text{g}) \rightarrow 3 \text{Al}_2\text{O} (\text{g})$ Ecuación 17 y a la $3 \text{Al}_2\text{O} (\text{g}) + 3 \text{C} (\text{s}) \rightarrow 6 \text{Al} (\text{g}) + 3 \text{CO} (\text{g})$ Ecuación 19 se acoplan dando lugar a la formación del Al .

El mecanismo propuesto para la formación del pico de Al es probablemente una parte de un conjunto de fenómenos más complejos en los que intervendrán especies como AlH o incluso Al_2 que se sabe que existen cuando aparece el pico de aluminio y que no se ha considerado por los autores en el mecanismo propuesto.

9.5.2.3. Otros métodos.

Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP).

En esta técnica la energía se suministra por la aplicación de un plasma de inducción acoplado (ICP), que actúa como fuente de excitación. Constituye una alternativa a la espectrometría de absorción atómica, aunque su coste impide su empleo en el laboratorio rutinario. Presenta pocas interferencias químicas, aunque la capacidad de detección para el aluminio es inferior a la que se consigue con el horno de grafito.

Espectrometría de emisión atómica de plasma-Espectrometría de masas (ICP-MS).

Esta técnica posee una amplia aplicación para la medida de los elementos traza, en particular en los estudios de la especiación química, aunque aún no se ha establecido su uso rutinario para la medición del aluminio.

Fluorescencia de Rayos X.

La fluorescencia de Rayos X es la técnica empleada cuando se quiere conocer con rapidez la composición elemental de una sustancia.

Destinada preferentemente a la detección de la concentración del aluminio en los especímenes sólidos como el hueso y los tejidos cerebrales, porque aporta datos sobre su presencia con independencia de la homogeneidad que exista en su distribución.

Mediante esta técnica es posible medir la concentración de todos los elementos del Sistema Periódico en especímenes sólidos, en polvos y en líquidos. Asimismo mediante la utilización de los patrones adecuados es posible realizar el análisis cuantitativo de los elementos presentes. Se basa en la

medición de Rayos X característicos emitidos por un espécimen que ha sido excitado mediante una fuente de radiación artificial. Al medir esta radiación, se detectan cuantitativamente los elementos.

La fluorescencia de rayos X presenta ciertas ventajas sobre la espectrometría de absorción atómica, a pesar de ser menos sensible, es multielemental y permite establecer el espectro de los elementos mayoritariamente contenidos en un espécimen.

Análisis por activación neutrónica.

El espécimen se irradia con un flujo de neutrones térmicos mediante el uso de un reactor nuclear. Una vez enfriado, se mide la radioactividad inducida en los especímenes y en los patrones mediante un espectrómetro de rayos gamma. Al tratarse de una técnica radioactiva, su uso es limitado en los laboratorios.

Presenta una buena sensibilidad y tiene además la ventaja de ser una técnica multielemental. Sus principales problemas son el alto coste y la lentitud del procedimiento.

En el caso concreto del aluminio se producen interferencias con el fósforo, lo que obliga a aplicar técnicas de separación previas que plantea problemas importantes de contaminación.

9.5.3. Método analítico para la medida directa del contenido de aluminio presente en los fluidos biológicos de los animales de experimentación escogidos en el estudio (minipig).

La absorción atómica electrotérmica permite la valoración de la mayoría de los elementos con sensibilidades y límites de detección de 20 a 1000 veces superiores a los de las técnicas de llama convencionales, sin extracción o concentración de la muestra. Este aumento de sensibilidad tiene su origen en el incremento del tiempo de permanencia de los átomos del estado base en el trayecto óptico, que es varias veces mayor que el de absorción atómica con llama convencional. Numerosos elementos pueden determinarse a concentraciones del orden de 1.0 µg/L. otras de las ventajas de la absorción atómica electrotérmica es que únicamente se necesita un pequeñísimo volumen de muestra.

La técnica electrotérmica está indicada solamente en el caso de niveles de concentración por debajo del intervalo óptimo de absorción atómica directa de llama, ya que está sometido a más interferencias que el procedimiento de llama y requiere un mayor gasto de tiempo en el análisis. Frecuentemente se necesita emplear el método de adiciones de patrones para asegurarse de la validez de los datos. La elevada sensibilidad de esta técnica obliga a la máxima atención para evitar la contaminación.

La técnica electrotérmica está indicada solamente en el caso de niveles de concentración por debajo del intervalo óptimo de absorción atómica directa de llama, ya que está sometido a más interferencias que el procedimiento de llama y requiere un mayor gasto de tiempo en el análisis. Frecuentemente se necesita emplear el método de adiciones de patrones para asegurarse de la validez de los datos. La elevada sensibilidad de esta técnica obliga a la máxima atención para evitar la contaminación.

Autores y Referencias	Técnica Analítica	Media µg/L	Desviación Estándar µg/L	Rango µg/L	Nº de Sujetos
Aldeman and Gitelman, 1980 [56]	EAA	2.1	2.2	0.0-7.6	14
De Baets, 1978 [57]	EAA	3.72	120	2.1-6.2	8
Oster, 1981 [58]	EAA	<4		<2.5-7	37
Kaehny et al, 1977 [59]	EAA	7	2		13
Verhaeven, 1981 [60]	EAA	9.1	5.1	2.5-22.3	13
Gardiner et al, 1981 [61]	EAA	10.2		3.2-32.4	15
Salvadeo et al, 1979 [62]	EAA	12.0	4.0		12
Wawschinek et al, 1982 [63]	EAA	14.0		3.0-39.0	54
Gilli et al, 1980 [64]	EAA	14.15	12.2		44
Valentin et al, 1976 [65]	EAA	14.2	7.1	4.0-34.5	40
Elliot et al, 1978 [66]	EAA	216.2			20
Zumkley et al, 1979 [67]	EAA	23.2	7.29		20
Clavel et al, 1978 [68]	EAA	24	8	10-45	59
Gorsky and Dietz, 1978 [69]	EAA	28	9	12-46	23
Pegon, 1978 [70]	EAA	34.1	3.5	28-40	20
Fuchs et al, 1974 [71]	EAA	38		19.92	29
Ward et al, 1978 [72]	EAA	25		10-50	10
Allain et al, 1979 [73]	EAA	12.5	4		14
Schramel et al, 1980 [74]	EAA	42	16	20-75	30
Alessio et al, 1983 [75]	EAA	6.6	2.6	3.8-12.5	10

Tabla 5. Concentraciones de Al en plasma o suero de sujetos no laboralmente expuestos.

El estudio que nos concierne se realizó con 11 minipigs, de los cuales, a 10 se le implantaron placas y se reservó a un minipig como blanco. Una vez agotado el tiempo de implantación de las placas, se eutanasiaron a los animales y se tomó cinco muestras de cada animal de distintas partes del cuerpo (cerebro, grasa, riñón, bazo e hígado). Por consiguiente, se recolectaron 55 muestras, 50 muestras de los minipigs con las placas implantadas y 5 muestras del blanco.

9.5.3.1. Aspectos preanalíticos. Obtención y almacenamiento de especímenes.

Las muestras tomadas de los animales de experimentación, minipigs, para la determinación de aluminio se trataron con todas las precauciones requeridas para evitar la contaminación, es decir, procurar que el contacto con el aire atmosférico sea mínimo, que el empleo de material sea tratado y chequeado con respecto al contenido en aluminio y que el manejo de los mismos se realice en una cámara limpia. Además, durante todo el proceso de digestión de las muestras de los minipigs, se ha seguido la norma APHA 3500-Al B.

Con respecto a la recogida y almacenamiento de las muestras se emplearon recipientes de plástico totalmente esterilizados. Las pipetas y los recipientes de vidrio usados para preparar los reactivos se lavaron con agua destilada y jabón libre de fosfatos. En cuanto al material se mantuvo en todo momento, antes y después de la recogida de los especímenes, tapado y almacenado en un sitio limpio cerrado y libre de contaminación del polvo atmosférico. El material de vidrio ha de evitarse por los procesos de liberación y adsorción de aluminio [76] [77].



Ilustración 70. Proceso de congelación de las muestras.

El almacenamiento de los especímenes varía en función del tipo de muestra, es decir, los sueros almacenados a 4 °C son estables durante 15 días, los tejidos y el material óseo congelados a -20 °C son estables tres meses y liofilizados un año. En nuestro caso, las muestras se congelaron a -15 °C para asegurar una correcta preservación.

9.5.3.2. Aspectos intra-analíticos. Medida de la concentración de Al en las muestras.

El análisis del contenido de aluminio en las muestras biológicas extraídas de los animales de experimentación comprende varias etapas, desde la preparación del espécimen hasta la puesta a punto de las condiciones analíticas del espectrofotómetro (condiciones de la lámpara de cátodo hueco empleada, programa de temperaturas de la cámara de grafito,...) y las curvas de calibración.

En lo que respecta al proceso de digestión, las muestras se han digerido por grupos en función de su procedencia, es decir, de la zona del cuerpo del animal de la que se extrajeron los especímenes. Primero se digirieron todos los cerebros, después las grasas, los riñones, los bazo y, por último, los hígados.



Ilustración 71. Detalle de todos los tipos de muestras tomadas (cerebros, grasas, riñones, bazo e hígados).

El día anterior a la digestión de las muestras, éstas se sacan del congelador y se descongelan en la cámara a una temperatura media de unos 4-5°C, y una vez que las muestras se han descongelado, se procede a triturarlas.



Ilustración 72. Proceso de descongelación en cámara a 4 °C.



Ilustración 73. Proceso de triturado de la muestra.

Acto seguido se toma una cantidad de muestra, y es pesada en un vaso que ha sido tarado previamente. El proceso de tarado del recipiente requiere una serie de pasos previos para eliminar totalmente los restos de humedad que pudiera contener, como son calentar éste en una estufa para secado y esterilización y almacenarlo en un contenedor mayor con bolitas de gel de sílice en el fondo. Este contenedor, no es más que un sitio donde se puede enfriar el vaso para pesar (no se debe pesar en caliente); la bolitas de gel de sílice adsorben la humedad con lo cual el contenedor está seco y el vaso se mantiene seco dentro.



Ilustración 74. Proceso de tarado del recipiente.

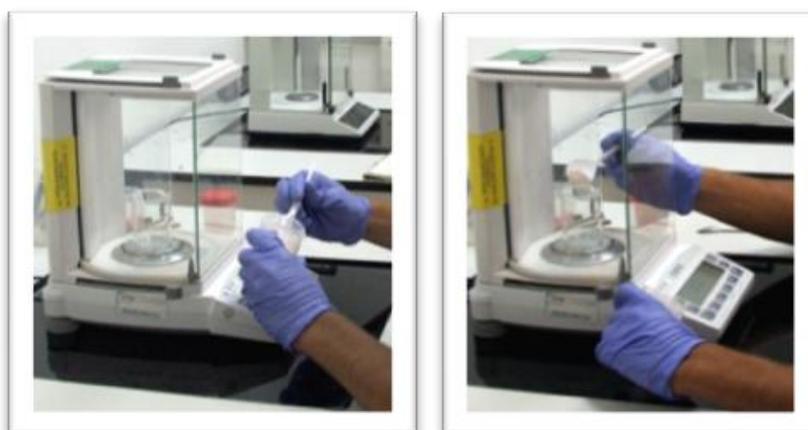


Ilustración 75. Proceso de tarado de la muestra.

Una vez se conoce la cantidad exacta de muestra se introduce en la estufa a 80 °C durante dos días, para secar la muestra.



Ilustración 76. Proceso de secado de la muestra.



Ilustración 77. Muestras después del proceso de secado.

Por último se pesa aproximadamente un gramo de muestra seca en un vaso de precipitado, se le adicionan 5 ml de ácido nítrico Suprapur® (ácido nítrico al 69 %, empresa Merck) y la disolución se pone 5 minutos en el equipo de ultrasonido. Posteriormente se adicionan otros 5ml de ácido nítrico

Suprapur® y, a continuación, se le añade un poco de agua a la disolución y se calienta durante dos horas sin dejarla que llegue a ebullición.



Ilustración 78. Proceso de tarado de la muestra seca.

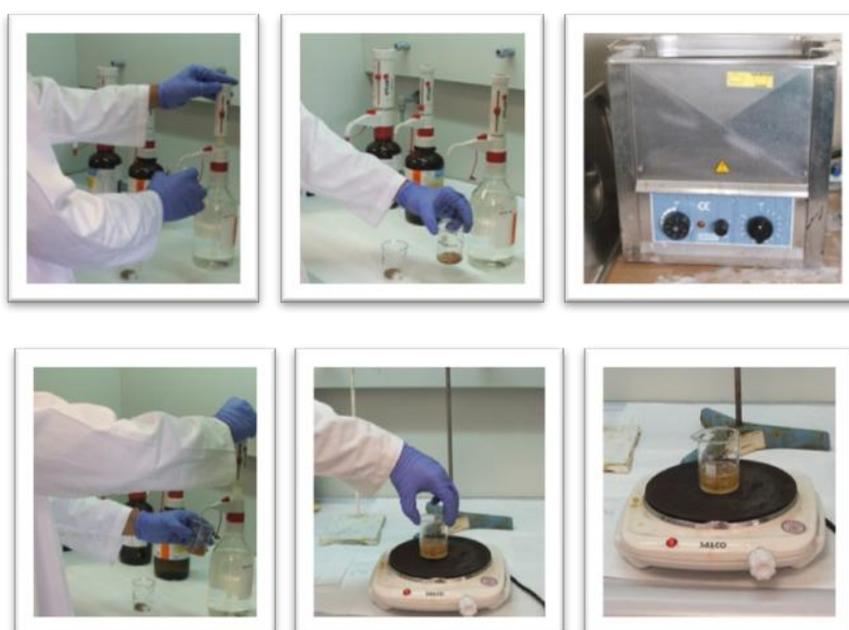


Ilustración 79. Preparación de la disolución, equipo de ultrasonidos y calentamiento en placa eléctrica.

Para finalizar con el proceso de digestión, se enrasa la disolución obtenida después del proceso de calentamiento en la placa eléctrica en un matraz de 50 ml, preparada para ser analizada en el espectrofotómetro de absorción atómica.

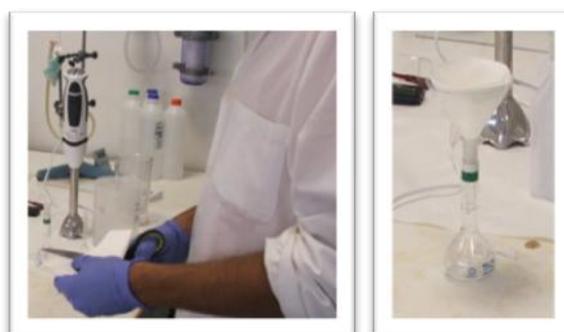


Ilustración 80. Proceso de enrasado de la disolución en un matraz de 50 ml.

La dilución de la muestra dependerá del contenido de aluminio que ésta tenga. Cuanto más contenido en aluminio presente la muestra habrá que diluirla más para poder analizarla en el espectrofotómetro y se encuentre dentro del rango de valores admitidos en la curva de calibración, es decir, siempre hay que buscar el tramo óptimo de la calibración.

En el análisis de las muestras se emplearon dos tipos de diluciones distintas, la dilución 100 y la dilución 10:

- La dilución 100 se empleó en aquellas muestras que presentaban mayor contenido de Al, y se realiza de la siguiente manera:
Agua Destilada + 100 μ L de HNO_3 + 500 μ L de Muestra y todo ello se lleva a un matraz de 50ml
- La dilución 10 se empleó en aquellas muestras que presentaban menor contenido de Al, y se realiza de la siguiente manera:
Agua Destilada + 100 μ L de HNO_3 + 5 mL de Muestra y todo ello se lleva a un matraz de 50ml

Para minimizar la contaminación, los especímenes se diluyeron directamente sobre las cápsulas del muestreador. En la dilución de las muestras no se emplearon modificadores de matriz ni surfactantes.

Como ya se comentó en el apartado de descripción de equipos, para realizar el análisis de las muestras se empleó un espectrofotómetro Varian AA 240Z con corrección de fondo Zeeman. El horno de grafito empleado ha sido el modelo GTA-120 de diseño Varian y la lámpara de cátodo hueco de aluminio fue fabricada por Varian y suministrada con el equipo. El gas empleado en el proceso es el Argón, suministrado por la casa comercial Carbueros Metálicos.

El funcionamiento del equipo y el tratamiento de los datos se realizó con un ordenador integrado en el equipo y el software SpectrAA worksheet, versión 5.01 Pro.



Ilustración 81. Espectrofotómetro Varian AA 240Z con horno de grafito GTA-120 e inyector automático PSD-120.

En este análisis se emplearon tubos de grafito con tratamiento pirolítico y plataforma, realizando la lectura en área de pico, utilizando un tiempo de la integración de 3,5 segundos y un volumen de muestra de 20 μ L.

Las características de la lámpara de cátodo hueco de aluminio son las siguientes:

- Longitud de onda, λ : 309,3 nm.
- Ranura o slit: 0.5 nm.
- Corriente recomendada, I: 10 mA.

- Corriente máxima, I: 15 mA.

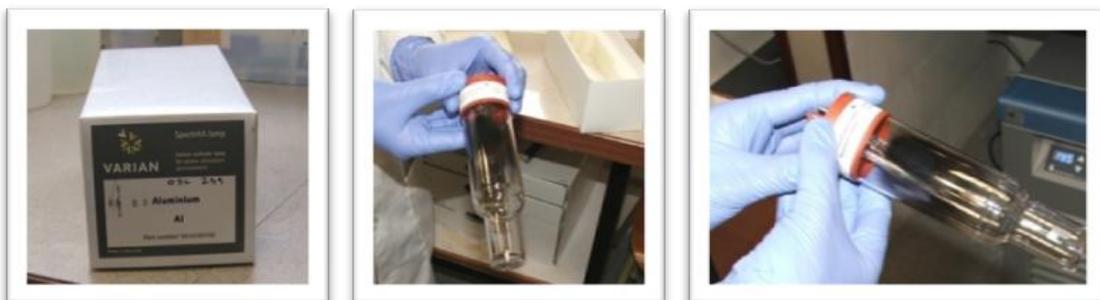


Ilustración 82. Lámpara de cátodo hueco de aluminio.

El programa de temperatura del horno de grafito empleado en la determinación de aluminio en las muestras es el que se presenta en la siguiente tabla:

Etapa	Temperatura °C	Tiempo/s	Flujo Argón (L/min)
1	85	5	0.3
2	95	55	0.3
3	120	15	0.3
4	1400	8	0.3
5	1400	15	0.3
6	1400	2	0
7	2500	0.8	0
8	2500	2	0
9	2600	2	0.3

Tabla 6. Programa de temperatura del horno de grafito.

El equipo presenta un inyector automático PSD-120 con capacidad para inyectar 50 muestras por carrusel en viales de 2 mL, pudiéndose inyectar entre 1 y 100 μ L. Tiene, además de las 50 posiciones para viales de 2 mL, cinco posiciones más (51-55), presentadas en viales de 10 mL para el blanco, estándar o patrón y modificadores químicos.



Ilustración 83. Posiciones en el inyector automático PSD-120.

Cada vez que se va a analizar una serie de muestras en la absorción atómica (como dijimos, siempre analizamos todas las muestras del mismo tipo, por ejemplo, las muestras de cerebro), hay que preparar el blanco y los patrones.

El blanco es una disolución que presenta la característica de no contener ningún tipo de metal, en este caso, de aluminio. El blanco se prepara en un matraz de 50 mL en el que se vierte agua destilada, 100 μL de HNO_3 y se enrasa con agua destilada a 50 mL.

El patrón es la disolución con la que se va a realizar la recta de calibrado y tiene que contener 25 ppb de aluminio, según norma. Presenta las siguientes características:

Al= 1.000 \pm 0.002 g/L conservado según la reacción $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ en HNO_3 0.5 N



Ilustración 84. Características del patrón de aluminio.

Después de preparar las disoluciones del blanco, los patrones y las diluciones de las muestras procedentes del proceso de digestión, se colocan en el inyector en unas posiciones ya establecidas:

- En la posición 1 se coloca un blanco.
- En la posición 2 se coloca un patrón (25 ppb de Al).
- En la posición 3, aunque no es obligatorio, colocamos otro blanco para asegurarnos la correcta limpieza del inyector por si pudieran quedar residuos de Al en éste, ya que previamente, el inyector ha pasado por la posición 2 donde está el patrón.

No obstante, esto no es necesario, ya que el equipo está provisto de un recipiente con agua destilada y HNO_3 donde se realizan limpiezas automáticas del inyector cada vez que coge una muestra.



Ilustración 85. Recipiente donde se realizan las limpiezas automáticas e inyector, respectivamente.

- En la posición 48 se colocan los modificadores, que en el caso del Al se emplean el paladio y el nitrato amónico según la siguiente disolución:
 $35 \mu\text{L de Pd} + 140 \mu\text{L de NH}_4 \text{ a } 10 \text{ mL}$ (dilución con agua destilada)
- En la posición 50 se coloca el patrón de la curva de calibrado.
- En la posición 51 se coloca el blanco de la curva de calibrado.

También hay que establecer las curvas de calibrado, que dependen de la muestra que se esté analizando. Un ejemplo es el que se muestra a continuación (coeficiente de correlación de la curva $r = 0.9999$):

Estándar	Concentraciones de Al ($\mu\text{g/L}$)	Concentraciones Reales de Al ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia
Cero Blanco	0	-0.24	0.0882
Patrón 1	5	5,50	0.1074
Patrón 2	10	9,68	0.1214
Patrón 3	15	15,23	0.1400
Patrón 4	20	19,69	0.1549
Patrón 5	25	25,14	0.1731

Tabla 7. Ejemplo de una curva de calibrado para una muestra concreta.

Una vez establecidos todos los parámetros y preparado el equipo para el análisis, se procede a realizar el estudio de la determinación del contenido de aluminio en las muestras. El proceso de inyección de éstas se visualiza a continuación.



Ilustración 86. Proceso de inyección de muestras con el inyector automático PSD-120.

9.5.3.3. Aspectos postanalíticos. Intervalos de referencia.

Para las investigaciones en las que se incluyen los grupos de referencia es necesario medir las concentraciones comprendidas entre 1 y 5 $\mu\text{g/L}$ (0.04 y 0.19 $\mu\text{mol/L}$). Existe además, un consenso general respecto a los trabajos publicados en lo que se refiere a los intervalos de referencia, y se admite que estos datos están en parte enmascarados por la contaminación, por lo que las concentraciones «reales» deberán ser menores.

El aluminio en agua varía entre 5 y 10 $\mu\text{g/L}$ (0.2-0.4 $\mu\text{mol/L}$) en las aguas naturales y hasta 1000 $\mu\text{g/L}$ (37 $\mu\text{mol/L}$) en las aguas tratadas.

Las concentraciones de aluminio existentes en el suero que han sido publicados para las diferentes poblaciones varían ampliamente según los diversos trabajos. Hay que tener en cuenta que además de influir los factores dependientes de los hábitos y la localización geográfica de los diferentes grupos de la población, existen también otros factores relacionados con el método analítico utilizado tales como la sensibilidad y la precisión del mismo y el control de la contaminación en el proceso de la recogida, el almacenamiento, el pretratamiento y el análisis de los especímenes. No existen diferencias estadísticamente significativas respecto al sexo y la edad [78] [79].

Desde un punto de vista epidemiológico, tiene interés conocer las características poblacionales que influyen en los valores de referencia del aluminio en el suero.

Alguna de estas características están relacionadas con el medio ambiente, las condiciones laborales, la dieta, principalmente el agua de bebida y el consumo de productos elaborados, pero también las circunstancias fisiológicas individuales como son la secreción gástrica que influye de una forma importante en la cantidad del aluminio absorbido por el tracto gastrointestinal. El consumo de los hidróxidos de aluminio y la función renal, tienen una demostrada influencia en el grado de la impregnación aluminica [80].

El intervalo en el que se mueven los valores de referencia para el aluminio en el suero referidos en los últimos años por la bibliografía es de 1 $\mu\text{g/L}$ a 8 $\mu\text{g/L}$ (0.037-0.30) $\mu\text{mol/L}$ [78] [80].

Para el caso de los tejidos, el hueso es el que tiene una mayor relevancia, ya que éste es el depósito preferencial cuando existe una sobrecarga, de aquí el interés del conocimiento de los valores de la población de referencia.

Al igual que en el suero, la bibliografía muestra una dispersión de los datos en lo que se refiere al contenido del aluminio en el hueso, abarcando los valores medios desde < 2 $\mu\text{g/g.p.s.}$ hasta 9 $\mu\text{g/g.p.s.}$ [81] [82] [83] [84]. No obstante, todos los valores referenciados para la población normal son sensiblemente inferiores a los encontrados para los grupos de los pacientes que se encuentran en diálisis.

9.6. Estudios histológicos. Método del microscopio electrónico de barrido (SEM).

9.6.1. Generalidades.

El desarrollo del microscopio de barrido hace aproximadamente 30 años, revolucionó la microscopía electrónica, ampliando considerablemente sus posibilidades de utilización. La disponibilidad de todo un abanico de técnicas analíticas que tiene como denominador común el uso de un haz de electrones como sonda, han configurado una amplia gama de fuentes de información superficial, pudiéndose coger en cada caso la apropiada. La versatilidad y gran aplicabilidad de la microscopía electrónica en su conjunto se ha producido de una serie de factores: en primer lugar, a diferencia de la microscopía de rayos X, permite el estudio local de defectos o porciones aisladas de material, debido a que los electrones son fuertemente dispersados por los sólidos.

Otro de los factores importantes es el gran desarrollo de los detectores eficientes de electrones así como de fuentes de electrones más brillantes que las utilizan en otros campos de la física de partículas. Por último, la gran variedad de transiciones electrónicas que pueden ser estimuladas por una sonda electrónica, han abierto nuevas posibilidades al análisis químico.

No obstante, hay que tomar en consideración, dos grandes limitaciones:

- Como resultado de la fuerte interacción con la materia y consecuentemente, la interacción múltiple producida, la interpretación de los patrones de difracción de electrones requieren el uso de una sofisticada teoría matemática que normalmente no permite una relación simple entre la imagen registrada y la estructura de la muestra.
- Otra limitación surge de la naturaleza bidimensional de la difracción de electrones de alta energía, lo que supone que las imágenes electrónicas y los patrones de difracción sean insensibles al movimiento de los átomos de la muestra en la dirección del cañón de electrones.

Debido a estas características la microscopía electrónica resulta un medio ideal para la investigación de la estructura atómica y electrónica de defectos aislados, de estructura desconocida, los cuales controlan la mayoría de las propiedades mecánicas, eléctricas químicas y térmicas de sólidos.

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto, es decir, es una técnica de análisis que se utiliza para obtener información superficial de las muestras mediante el empleo de electrones [85]. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo con un SEM, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El SEM explora la superficie de la imagen punto por punto. La preparación de las muestras es relativamente fácil pues la mayoría sólo requieren que éstas sean conductoras. Los electrones secundarios se asocian a una señal de TV.

En el microscopio electrónico de barrido la muestra es recubierta con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras a la muestra. Posteriormente es

barrida con un haz muy concentrado de electrones, que son acelerados y viajan a través del cañón, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Típicamente, la energía de los electrones secundarios se encuentra por debajo de 50 eV. Desplazando el haz de electrones incidentes (electrones primarios) a lo largo de la muestra y recogiendo las señales emitidas en cada punto es posible obtener "un mapeo de la superficie". Las zonas más brillantes corresponden a regiones donde existe mayor concentración de electrones, que suelen ser vértices y aristas, y las más oscuras son los valles y los huecos. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor, es decir, un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones (imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto), proyectados en una imagen de TV o una imagen digital. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio, y permite una aproximación profunda al mundo atómico. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.

9.6.2. Breve historia.

9.6.2.1. Historia de la microscopía.

Desde la antigüedad el hombre ha buscado la forma de poder aumentar su poder de resolución y de hacer visible lo invisible. Con este propósito se descubren las lentes y con la combinación de ellas se obtienen imágenes de mayor resolución. Nace el microscopio de luz y se comienza a incursionar en el mundo microscópico de la naturaleza.

EL holandés *Van Leeuwenhoek*, entre los años 1660-1690 usando un sistema de lentes consiguió fabricar microscopios de 200 aumentos aproximadamente, con los que se observó glóbulos rojos, protozoos, bacterias y otros microorganismos. Fue considerado como un juguete científico al que se le dio el nombre de "vidrio de mosca", ya que primariamente se usaba para observar insectos. En la misma época, el inglés *Robert Hooke* desarrolló el microscopio compuesto de Galileo, con el descubrió la célula. Posteriormente el microscopio óptico fue recibiendo notables mejoras.

Con el paso de los años el progreso no sólo se realizó en el desarrollo de los microscopios sino también en el refinamiento de las técnicas de preparación de muestras, lo que permitió un análisis cada vez más fino de las distintas estructuras observadas.

En 1873, *Ersnt Abbe*, físico y profesor de Jena, imprimió un gran impulso a la óptica teórica y práctica al concluir que el aumento de un microscopio depende más de la longitud de onda de la luz que de la calidad del sistema óptico. En 1897, *J. J. Thompson* (P.N. Física 1906) anuncia la existencia de partículas cargadas negativamente, denominadas luego electrones.

Gracias a los trabajos de *Louis-Víctor de Bröglie* (P.N. Física 1930) en 1924 sobre mecánica ondulatoria y la generación de longitudes de onda 10000 veces más pequeñas que la longitud de onda de la luz

visible, permitió el surgimiento del germen de un nuevo tipo de microscopio, el microscopio electrónico. Paralelamente, en 1924 *Manne Siegbahn* (Universidad de Uppsala, Suecia) gana el Premio Nobel de Física por sus investigaciones en *espectroscopía de rayos-X*.

De Bröglie demostró que asociado a cualquier movimiento rápido de partículas, existe una nueva forma de radiación, de pequeña longitud de onda. De Bröglie extendió la idea de una naturaleza ondulatoria-corpúscular (cuántica) de la luz, a otros tipos de radiaciones, como los rayos catódicos, anódicos, iónicos, X, etc. En otras palabras comprobó que los electrones respondían también a las características de las radiaciones ondulatorias. La ecuación fundamental de la mecánica cuántica expresa que la longitud de onda de una partícula en movimiento es función de su velocidad y de su masa:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \quad \text{Ecuación 20}$$

donde,

h: cte. de Planck

m: masa del electrón

u: velocidad

Como la velocidad depende del potencial acelerador en el caso de los electrones, se puede decir que la longitud de onda asociada al electrón sólo es función del voltaje. Analizando datos experimentales se obtiene que la longitud de onda efectiva de un haz electrónico es aproximadamente 100000 veces menor que la onda de la luz visible.

En 1926, *Busch* prueba que es posible enfocar un haz de electrones con una lente magnética cilíndrica, estableciendo las bases de la óptica electrónica, es decir, descubre que los rayos electrónicos son refractados por campos magnéticos, de forma similar a la refracción de la luz por las lentes de vidrio, y además demuestra que las leyes geométricas de la óptica son obedecidas también por los sistemas electrónicos.

La idea de utilizar estos descubrimientos en un microscopio de alta resolución no surgió de inmediato. No está claro quién fue el de la idea original, sin embargo alrededor de 1930 un grupo de alemanes del instituto técnico de Berlín (*Ruska, Knoll, Von Borries* y otros) construyó el primer microscopio electrónico de transmisión, y la primera patente surge en 1931, firmada por *Rüdenberg* de la Siemens. Un año más tarde, en 1932, *A.C. Van Dorsten* (*Philips Research Laboratories*) comienza a estudiar las lentes magnéticas, y *Ernst Ruska* y *Knoll*, publican una descripción del primer microscopio electrónico de transmisión (MET), el que puede ser considerado el prototipo de los instrumentos modernos. Este microscopio constaba de una fuente de electrones y dos lentes electromagnéticas sin condensador, y aunque este instrumento proporcionaba una resolución inferior a la de un buen microscopio óptico, con él se logró obtener las primeras electromicrografías.

En 1934 *Ruska* describe una versión corregida a la que añade una lente condensadora. Este modelo fue el primero en sobrepasar el poder de resolución del microscopio fotónico. Aunque con este microscopio se obtuvieron algunas imágenes algunos especímenes se carbonizaban producto del

intenso bombardeo electrónico. A pesar de lo anterior *Ruska* logró en 1934 una resolución cinco veces mayor al poder de resolución del microscopio óptico.

Lo anterior dio pie para que nuevos investigadores buscaran mejoras al microscopio de *Ruska*, y a la obtención de mejores resoluciones, motivo por el cual, en 1935, *Max Knoll* demuestra la factibilidad del microscopio electrónico de barrido; tres años después, en 1938, *Von Borries* y *Ruska* construyeron un aparato de diseño avanzado, con el que se obtienen resoluciones de hasta 100 Armstrong. En 1939 la firma Siemens-Halske inicia la producción comercial del instrumento diseñado por *Von Borries* y *Ruska*, produciéndose el primer microscopio electrónico de transmisión comercial. En 1939, *Mahl* construye el primer microscopio electrónico electrostático y la firma AEG se encarga de la producción de un número limitado de ellos.

Con el comienzo de la segunda guerra mundial se interrumpió la comercialización de estos instrumentos, pero luego de su fin se reinició la construcción masiva de estos microscopios en las firmas Siemens y AEG-Zeiss de Alemania, RCA de Estados Unidos, Phillips de Holanda, Hitachi de Japón, etc. En 1942, *Philips Research Laboratories*, desarrolló un microscopio electrónico de transmisión de 400kV.

A partir de este momento, comienzan a desarrollarse las técnicas preparativas en el campo de la microscopía electrónica.

En 1944, *William and Wyckoff* introducen la técnica de *sombreado metálico* y en 1945, *Porter* (P.N. Fisiología y Medicina 1972), *Claude* (P.N. Fisiología y Medicina 1974) y *Fullam* utilizaron el microscopio electrónico para examinar células en cultivo de tejidos, para luego fijarlas y teñirlas con tetróxido de osmio.

En 1946, *Philips* introduce su primer prototipo de microscopio electrónico comercial en Oxford.

En 1948, *Pease* y *Baker* preparan confiablemente *secciones finas* (0.1 a 0.2 μm de grosor) de material biológico y en 1950. *H. Latta* y *J. F. Hartman*, introducen la cuchilla de vidrio para ultramicrotomía.

Es en el año 1952 cuando *Palade* (P. N. Fisiología y Medicina 1975), *Porter* (P.N. Fisiología y Medicina 1972), y *Sjöstrand* desarrollan *métodos de fijación y seccionamiento fino* que permitieron ver por vez primera muchas estructuras intracelulares. En una de las primeras aplicaciones de estas técnicas, *H. E. Huxley* demostró que los músculos esqueléticos contienen un arreglo solapado de filamentos proteínicos, apoyando la hipótesis de los filamentos deslizantes de la contracción muscular.

En 1952, *Humberto Fernández-Morán* logra cortar por vez primera secciones finas congeladas introduciendo la *crio-ultramicrotomía* y en 1953, introduce la *cuchilla de diamante ultrafino* para seccionamiento ultrafino. En este mismo año, *Porter* (P.N. Fisiología y Medicina 1972), y *Blum* desarrollaron el primer *ultramicrotomo* de aceptación general, incorporando muchas de las características introducidas por *Claude* y *Sjöstrand* previamente.

Después de estos acontecimientos, alrededor de 1955, se llega a resoluciones de 10 Armstrong, aumentos de 250000 x y voltajes aceleradores de 10000 voltios. Todo esto da comienzo a la era de la

Microscopía Electrónica, donde comienza una nueva etapa de desarrollo de las técnicas preparativas en microscopía electrónica.

En 1956, *Glauert* y asociados demuestran que la resina epóxica *Araldita* era un agente de embebimiento altamente efectivo para microscopía electrónica, y *Fernández-Morán* demuestra la aplicación de la cuchilla de diamante para el seccionamiento ultrafino para el estudio de la estructura fina de tejidos biológicos y de metales.

En 1957, *Robertson* describe la estructura trilaminar de la membrana celular, vista por vez primera con el microscopio electrónico y *Fernández-Morán* desarrolla el “*Fernández-Morán Ultramicrotome*”, una modificación del microtomo de *Sjöstrand* introducido en 1953.

Las técnicas de *crio-fractura* (“*freeze-fracture*”), inicialmente desarrolladas por *Steere* en 1957, fueron perfeccionadas por *Moor* y *Mühlethaler*.

Singer, en 1959, utiliza anticuerpos acoplados a ferritina para detectar moléculas en las células utilizando el microscopio electrónico. El mismo año, *Brenner* y *Horne* ampliaron la técnica de tinción negativa inventada cuatro años antes por *Hall*, técnica de uso general para la visualización de virus, bacterias y filamentos proteínicos. Contemporáneamente, *Fernández-Morán* contribuye al uso de la *crio-fijación* y técnicas de preparación de baja temperatura usando helio II, aplicándolas al estudio de la ultraestructura de tejidos e introduce el método de substitución bajo congelamiento (“*freeze-substitution*”) en microscopía electrónica. En 1960. desarrolla filamentos de punta de cristal único orientado de tungsteno para proveer iluminación de microhaz coherente, reduciendo el daño del espécimen por irradiación usando una dosis electrónica mínima por translación del microhaz. Además, propone por vez primera observar directamente muestras hidratadas congeladas (“*frozen-hydrated*”), construyendo el primer crio-microscopio electrónico y el primer crio-portamuestra, introduciendo el concepto de *Criomicroscopía Electrónica*.

En 1961, *Luft* introdujo la resina de embebimiento *Epón*, y en 1963, *Sabatini*, *Bensch* y *Barnett* introducen el *glutaraldehido* (usualmente seguido por tetróxido de osmio) como un fijador para la microscopía electrónica.

En 1965, *Cambridge Instruments* produce el primer microscopio electrónico de barrido comercial.

En 1966, *Fernández-Morán* introduce el uso de lentes superconductoras a temperatura de helio líquido en los microscopios electrónicos y *Davis G. Durham* (E. I. Du Pont Company) introduce un nuevo instrumento para incisiones en cataratas basado en la cuchilla de diamante. El mismo año, *Branton* demuestra que la *crio-fractura* permite visualizar el interior de las membranas.

En esta época, comienza el desarrollo de las técnicas de análisis, procesamiento digital de imágenes y reconstrucción tridimensional en microscopía electrónica, así como la expansión de la *Crio-Microscopía Electrónica*.

En 1968, de *Rosier* y *Aaron Klug* (P.N. Química 1982) describen las técnicas para la reconstrucción tridimensional de estructuras a partir de micrografías electrónicas.

En 1973, *Fernández-Morán* introduce el crio-ultramicrotomo con cuchilla de diamante diseñado para operar a temperatura de helio líquido.

En 1975, *Henderson* y *Unwin* determinan la primera estructura de una proteína de membrana mediante reconstrucción computacional de micrografías electrónicas de muestras no teñidas y en 1979, *Heuser*, *Reese* y colegas desarrollan la técnica de *crio-grabado* (“freeze-etching”) de alta resolución usando especímenes congelados rápidamente.

En 1986, *Ernst Ruska* (Alemania Oriental) gana el premio Nobel en Física por el diseño del primer microscopio electrónico conjuntamente con *Gerd Binnig* (Alemania Occidental) y *Heinrich Rohrer* (Suiza) por el diseño del microscopio de barrido de efecto túnel.

En el año 1993, se logra la resolución de 1 Å en un Philips CM-200/300 en la Universidad de Tübingen.

9.6.2.2. Historia de la microscopía electrónica de barrido.

La observación de objetos pequeños siempre ha estado entre los mayores desafíos encarados por el hombre y, sin lugar a dudas, el Microscopio Electrónico de Barrido ha figurado entre las principales herramientas que le han permitido alcanzar este reto.

Ya desde finales del Siglo XIX resultaba evidente a partir de los trabajos de *Abbe* que mediante la iluminación con ondas electromagnéticas no era posible mejorar significativamente la resolución del microscopio óptico. Simultáneamente, mientras realizaba estudios con tubos de rayos catódicos con gases enrarecidos [86], *J.J. Thomson* descubrió los electrones, partículas que luego jugarían un papel decisivo en los microscopios de nuevo tipo que se avecinaban. *Davissón* y *Thomson* [87] compartieron el premio Nobel por el descubrimiento de la difracción del electrón. Padre e hijo, *J. J. Thomson* y *G. P. Thomson* [88], jugaron un papel fundamental en la historia del desarrollo del microscopio electrónico.

En un inicio se vio que los electrones se manifestaban de forma compatible con las propiedades corpusculares y no existía en la Física la idea de que las partículas pudieran presentar un comportamiento dual.

En el año 1924, *De Broglie* [89] sacude los cimientos del conocimiento de su época al enunciar el carácter ondulatorio de los electrones y asignarles longitudes de ondas dependientes de sus energías. Este planteamiento teórico, que luego fue confirmado, sentó las bases para que se pensara en los electrones también como una onda. En el año 1926 *Busch* [90] demostró que un rayo de electrones atravesando un campo magnético o eléctrico converge al foco y, basándose en esto, presenta el diseño de una lente electromagnética; de acuerdo a sus enunciados sería posible enfocar un haz de electrones de la misma forma que en la óptica se enfoca la luz mediante los lentes.

La microscopía electrónica de barrido, en sus diversas modalidades, surge en forma experimental entre los años 1930 y 1940 en Alemania. Los aportes científicos de la época significaron el establecimiento del último requisito necesario para que fuera construido un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM), mérito que correspondió a *Ernst Ruska* y *Knoll* [91] [92] en 1933, invención que le valió al primero el Premio Nobel de Física en 1986. Las primeras microfotografías de materiales biológicos fueron conseguidas por *Marton* [93] (31) en 1934. En 1935, *Knoll* propone un instrumento

bastante similar a los actuales, destinado a estudiar fenómenos de emisión secundaria. Construyó el primer microscopio electrónico de lente magnética, utilizando un rayo de 60.000 voltios y obteniendo imágenes sobre una pantalla fluorescente. Es la primera propuesta del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

En 1938, *Von Ardenne* diseña un nuevo tipo de microscopio, un sistema de barrido en un TEM, con el objeto de estudiar muestras relativamente gruesas, lo que dio lugar a un Microscopio Electrónico de Barrido-Transmisión. Este instrumento operaba con lentes electrostáticas y barrido electromagnético, pero carecía de dispositivos de amplificación y pantalla de observación. El haz de electrones atravesaba la muestra e incidía directamente sobre una placa fotográfica que se desplazaba en sincronía con el haz, pero a mayor velocidad. Las imágenes en este instrumento sólo podían observarse una vez obtenida las placas fotográficas. *Von Ardenne* sugirió también la posibilidad de observar la superficie de cuerpos opacos, recogiendo y amplificando los electrones secundarios emitidos por ellas, para modular la intensidad del haz de un tubo de rayos catódicos. Un año después *Boersch* logra haces electrónicos del orden de los 2,5nm, factor determinante cuando se quiere alcanzar resoluciones elevadas [94].

No obstante, el vertiginoso desarrollo que llevó en muy poco tiempo a la obtención del Microscopio Electrónico de Transmisión y que culminó en 1939 con la obtención del primer equipo comercial por parte de Siemens, no se produjo en el caso de SEM y fue necesario esperar 30 años, a partir de los trabajos de *Knoll*, para que el primer SEM saliera al mercado [95]. La explicación de esta demora se debe a limitaciones tecnológicas, entre ellas, los efectos causados por las aberraciones, las dificultades para lograr un sistema de barrido con el debido sincronismo y la necesidad de un sistema de detección con suficiente rapidez de respuesta. A solucionar los problemas planteados se dedicaron numerosos científicos en diferentes partes del mundo.

En 1942 se produce un salto considerable en el desarrollo del SEM con los trabajos que desarrollan *Zworokin*, *Hillier* y *Zinder*, que diseñaron un microscopio con el cual se observaban directamente superficies de muestras metálicas, y publicaron las primeras micrografías electrónicas de barrido. En el Microscopio desarrollado por *Zworokin* sobresalen la introducción de un Detector de Electrones Secundarios, al cual se le aplicó una carga de recolección de +50V, así como un Tubo Foto Multiplicador. A pesar de estos aportes, este microscopio solo llegó a una resolución del orden de los 50 nm y aumentos de 8000x, lo que lamentablemente desestimuló a sus creadores que no continuaron los trabajos.

Estos estudios se paralizaron durante la Segunda Guerra Mundial, pero resurgieron en 1948 en un programa bajo la dirección de C.W. Oatley en el Laboratorio de Ingeniería de la Universidad de Cambridge, donde se iniciaron una serie de proyectos que permitieron grandes avances.

En 1952 *McMullan* diseña un microscopio con importantes adelantos. Desarrolla una columna muy eficaz basada en lentes electromagnéticas, se reducen los efectos de contaminación, logra una fuente estable de alto voltaje para alimentar el filamento e introduce el Tubo de Rayos Catódicos (TRC) como sistema de registro y observación de las imágenes, aportes que representaron un importante avance en el desarrollo de la Microscopía Electrónica de Barrido [96].

Este microscopio es modificado luego por *Smith* en 1956 introduciendo el procesamiento no lineal de las señales, el barrido con doble deflexión del haz y la corrección electromagnética del astigmatismo, así como un sistema eficaz de centrado de las aperturas [94]. En 1959, *Smith* consigue micrografías de muy buena calidad.

Dando continuidad a los trabajos de *McMullan* y de *Smith*, *Everjart* y *Thornly* desarrollan en 1960 un detector basado en el empleo de un dispositivo centellador, una guía de luz y un TFM. Este detector significó un aporte tal, que permanece como estándar hasta nuestros días sin variaciones significativas de su concepción y sin dudas fue la antesala de la salida del SEM al mercado [97].

Como resultado de estas investigaciones, en los años 60 surgen los primeros microscopios electrónicos de barrido comerciales, que alcanzaban unos 250 Å de resolución. Este logro le correspondió a la *Cambridge Scientific Instruments* con el MARK I STEREOCAN, equipo que sale al mercado en diciembre de 1965, seguido muy de cerca por JEOL, que comercializa su primer SEM en enero de 1966 [98].

El desarrollo del Microscopio Electrónico de Barrido no se detuvo con la salida al mercado del primer microscopio. Un aporte importante a este desarrollo estuvo relacionado con el perfeccionamiento de las fuentes de iluminación. Hasta ese momento los filamentos de Wolframio dominaban este importante componente del equipo, pero en 1969 *Broers* introduce el filamento de LaB₆, mientras que casi simultáneamente *Crewe* realiza sus trabajos que destacan las ventajas como fuente del Cañón de Efecto de Campo.

En la década de los 70 se van produciendo diferentes mejoras y refinamientos sobre todo en las lentes de los microscopios, así como en el desarrollo de diferentes sistemas de detección, hasta que en 1985 la firma Carl Zeiss obtiene un resultado importante al introducir el primer

SEM en el cual el barrido no era controlado de forma analógica sino digital. Este aporte luego sería determinante para lograr Mapeos de Rayos X mucho más eficaces, y para corregir defectos de imagen por acumulación de cargas en el espécimen [99].

Los microscopios electrónicos de barrido modernos se deben a *Ernst Ruska*, *Gerd Binnig* y *Heinrich Rohrer* (1981). En el año 1986 surge la Microscopía Electrónica de Barrido controlada mediante computadora. En este momento eran computadoras de propósito específico y a estos equipos se les llamó de primera generación, para diferenciarlos de los que surgieron en el año 1992, llamados de segunda generación, en los que una computadora personal tomaba el control del sistema.

Estos dos aportes fueron logrados por LEO, firma heredera de la *Cambridge Scientific Instruments*, que había logrado el primer SEM comercial. A finales de la década de los 80 pero sobre todo ya en los años 90 tuvo lugar otro avance importante en la Microscopía Electrónica de Barrido. Hasta ese momento, salvo en trabajos que luego no tuvieron continuidad (como los del propio *Smith* en 1956), siempre se había considerado como inevitable que la muestra que se observaba en el Microscopio Electrónico debía estar al vacío, condición que imponían tanto la duración del filamento, como el paso de los electrones por la columna, lo que debía ocurrir como un camino libre sin interacciones que afectaran su movimiento. Pero en este período surgen diferentes opciones para diferenciar el vacío del cañón y la columna, del correspondiente a la zona donde se encontraba la muestra.

En el desarrollo de tecnologías con esta finalidad, indiscutiblemente la Philips con sus Microscopios Ambientales y la utilización de varias Aperturas Limitadoras del Vacío en sus diseños tuvo los resultados más significativos [100].

En la actualidad la Microscopía Electrónica de Barrido no se ha detenido. Aunque han surgido otros Microscopios como los de Fuerza Atómica con resoluciones superficiales a niveles atómicos, el SEM conserva un importante sector en los requerimientos de gran cantidad de ramas del conocimiento humano. En los últimos años se ha visto el surgimiento de la Microscopía Remota, que no solo facilita el diagnóstico de roturas a distancia sino incluso el que un equipo pueda ser compartido por usuarios ubicados a grandes distancias [101].

También se ha trabajado con éxito en la obtención de equipos “inteligentes”, capaces de fijar las condiciones de trabajo con un alto grado de independencia, a partir de algunos datos elementales sobre la muestra [102].

No cabe duda de que en el futuro la Microscopía Electrónica de Barrido continuará prestando un invaluable servicio a la comunidad científica, en campos tan disímiles como la Arqueología, la Medicina, la Botánica, el Análisis de Materiales y las Ciencias Forenses.

Actualmente se desarrollan a escala comercial microscopios que garantizan una resolución de 35-100 Å (3.5-10 nm).

9.6.3. Descripción y principios en los que se basa (SEM).

9.6.3.1. Fundamentos técnicos de la microscopía electrónica.

El ojo puede discriminar dos objetos si están situados no más cerca de 0.1 mm, mirando desde una distancia normal de 25 cm. Este es un factor límite del ojo humano y cualquier otro detalle más pequeño que éste, debe ser aumentado para ser visto. Se puede usar una lupa o un microscopio para aumentar la imagen.

El objetivo del microscopio es el de hacer distinguir los detalles estructurales de la muestra a observar. Esta habilidad es expresada en términos de apertura numérica o "N. A.". Por apertura numérica de un sistema óptico se entiende, según *Abbé*, el producto del índice de refracción "n" del medio que se encuentra delante del sistema y el seno del semiángulo σ de abertura de este sistema.

$$A = n \cdot \sin \sigma \quad \text{Ecuación 21}$$

$$n(\text{aire}) = 1, n(\text{agua}) = 1,33, n(\text{aceite de inmersión}) = 1,52 \quad \text{Ecuación 22}$$

El microscopio óptico se compone de un sistema de lentes con el que es posible ampliar el tamaño de cualquier muestra. Los actuales constan básicamente de dos lentes situadas en los extremos de un tubo: la lente más próxima a la muestra es el objetivo, y la más próxima al observador, el ocular. Se pueden añadir, además, otras lentes que perfeccionen el sistema, denominadas lentes intermedias.

La capacidad para visualizar dos puntos que se encuentran muy próximos entre sí se denomina *poder de resolución*. La resolución de los microscopios ópticos alcanza un límite máximo de 0.2 μm , es decir, no se pueden distinguir puntos separados por una distancia menor de 0.2 μm .

El poder de resolución de los microscopios no sólo depende del tamaño y la calidad de las lentes objetivo, sino también de la longitud de onda de la luz incidente y del índice de refracción del medio, normalmente aire, que se encuentra entre el objetivo y la preparación. Cuanto mayor sea el índice de refracción, más disminuye la velocidad de la luz y más aumenta la resolución; por esta razón, con los objetivos de mayor aumento, denominados objetivos de inmersión, el aire (índice de refracción = 1.0) es sustituido por una sustancia viscosa como el aceite (índice de refracción = 1.5), consiguiéndose un poder de resolución mayor. El poder de resolución entre dos puntos puede darse según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\lambda}{2NA} \quad \text{Ecuación 23}$$

siendo,

R, la distancia entre dos puntos medida en nanómetros (nm).

λ , la longitud de onda de la luz utilizada para la iluminación en nanómetros (nm).

N.A., es la apertura numérica indicada sobre el objetivo.

El límite de resolución del ojo humano es de 0.23 mm (= 230 μm), por lo que el microscopio permite aumentar aproximadamente 1000 veces nuestra capacidad de observación. En un microscopio óptico, la potencia amplificadora está limitada por la longitud de onda de la luz visible. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4000 angstroms (1 angstrom es 0.000000001 metros). El mínimo poder de resolución para un sistema óptico se puede conseguir usando la radiación ultravioleta, que tiene la menor longitud de onda aplicable. En resumen, puede decirse que no tiene sentido incrementar los aumentos del microscopio utilizando un ocular más potente, si la apertura del objetivo no basta para resolver la estructura del objeto. Más bien debe elegirse el valor, de tal manera que el aumento del microscopio tome un valor entre 500 y 1000 veces mayor que la apertura del objetivo.

Debido al limitado poder de resolución del microscopio óptico, se probaron varias fuentes de iluminación tales como rayos X de muy pequeña longitud de onda (0.5 nm) sin tener éxito ya que no pudieron enfocar estos rayos. Sin embargo, las investigaciones que comenzaron en 1923 sobre difracción electrónica, sentaron las bases para la construcción del primer microscopio electrónico, lo que supuso un gran avance con respecto al microscopio óptico, ya que permitió aumentar el límite de resolución hasta 0.3 nm.

Este instrumento funciona gracias a un haz de electrones, en lugar de haces de luz, en un sistema de vacío y, a diferencia del microscopio óptico, sustituye las lentes de cristal por electroimanes y, al utilizar electrones que tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz, se pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas para iluminar un objeto. La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0.5 angstroms.

Es importante el vacío dentro del cañón del microscopio electrónico, ya que Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.

El microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), es un microscopio que tiene una gran profundidad de campo, lo cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra, y produce imágenes de alta resolución, lo que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación.

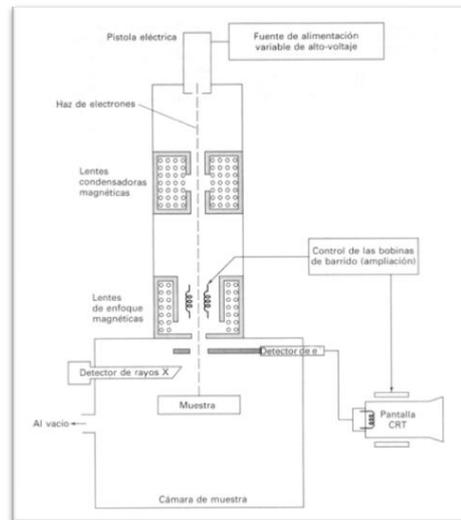


Ilustración 87. Esquema básico de un microscopio electrónico de barrido. Imagen tomada de D.A. Skoog et al. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, Madrid (2002).

La preparación de las muestras es relativamente fácil pues la mayoría de SEMs sólo requieren que estas sean conductoras. La muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Además, no es necesario cortar la muestra en capas, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos.

Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectado en una imagen de TV. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio.

Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen.

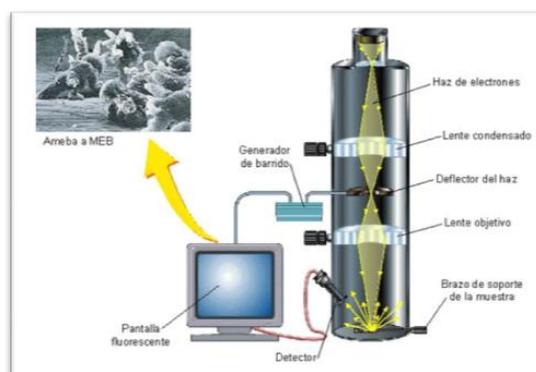


Ilustración 88. Microscopio electrónico de barrido, SEM.

En resumen, existen claras diferencias entre el microscopio óptico y el electrónico de barrido en lo que respecta a los siguientes puntos:

- **Imagen.** En el caso del microscopio electrónico la formación de la imagen se produce por la dispersión de los electrones, mientras que en el óptico la imagen se produce por absorción de los fotones. Es decir la imagen que se observa en un microscopio óptico se debe a la diferente absorción de la luz por las distintas estructuras de la muestra, mientras que en el microscopio electrónico la formación de la imagen está en función de la dispersión (depende de las distintas estructuras atómicas de la muestra) y, por consiguiente, pérdida de los electrones.

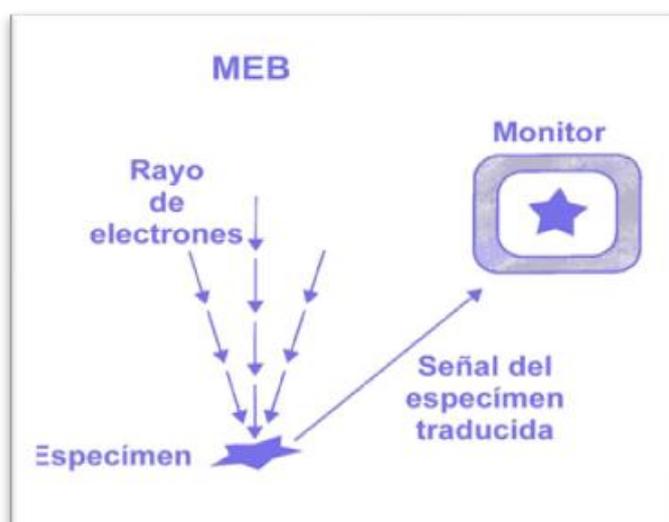


Ilustración 89. Esquema básico de la obtención de la imagen en un microscopio electrónico de barrido.

- **Aumentos.** Las lentes del microscopio electrónico son electromagnéticas y actúan como las de un óptico, es decir, desviando las trayectorias seguidas por los electrones en el vacío. En microscopía óptica los vidrios de superficies curvas (lentes) pueden desviar el haz luminoso haciendo que la imagen de un objeto parezca más grande, en microscopía electrónica este mismo efecto se consigue con campos magnéticos. Los aumentos en este tipo de lentes se obtienen modificando la intensidad de la corriente que se hace pasar por las bobinas que conforman las lentes, provocando un aumento del campo de fuerza y, por tanto, un desvío mayor o menor del haz de electrones. Mientras las lentes de un microscopio óptico tienen una distancia focal fija, las lentes electromagnéticas del microscopio electrónico tienen una distancia focal variable, por lo que para incrementar los aumentos no es necesario cambiar de lente sino simplemente aumentar el campo de fuerza de la lente electromagnética. Las lentes electromagnéticas producen desviaciones no proporcionales del haz de electrones que se manifiesta como una aberración denominada astigmatismo, pero que se pueden corregir mecánicamente.
- **Iluminación.** El haz de electrones se obtiene por la excitación de un filamento metálico (cátodo) y es atraído por la diferencia de potencial producida en el ánodo (50000-100000 voltios). Este fenómeno se produce cuando cátodo y ánodo se encuentra en vacío. Como el haz de electrones es divergente, se usa una lente condensadora para dirigir el haz hacia la muestra, que debe ser un corte muy fino y preparado de manera especial. Los electrones que

no son totalmente dispersados son reconducidos por la lente objetivo produciéndose el aumento de la imagen que es proyectada por la lente objetivo o proyector. Como los electrones no son visibles estos se observan en una pantalla o en un negativo impresionado. Las partes de la imagen donde los electrones han sido muy desviados no resultan muy intensas, dando una tonalidad clara en el negativo, que se rebelará oscuro cuando se positiva. Por tanto, aquellas áreas de la muestra que tienen un mayor índice de dispersión, son más densas a los electrones, aparecerán oscuras en la imagen final; justo al contrario que aquellas áreas donde no exista prácticamente dispersión. El contraste se puede mejorar con un pequeño diafragma que limita solamente a los electrones más periféricos. La profundidad de campo es más o menos constante, dada las peculiaridades técnicas del microscopio, pero ésta (aproximadamente $1\mu\text{m}$) es suficiente para que esté enfocada todo el grosor de la muestra, que es inferior a $0.5\mu\text{m}$.

- **Poder de resolución.** En la microscopía óptica el poder de resolución está limitado por la longitud de onda de los fotones, pero en el microscopio electrónico se juega con la ventaja de una pequeñísima longitud de onda en la propagación de los electrones, por lo que el poder de resolución es muy elevado. Esto permite, que la imagen pueda ser aumentada posteriormente en una copia fotográfica muchas veces, para observar todos los detalles. El poder de resolución de esta microscopía es de 5 a 10 \AA (0.5 milimicras).

A continuación, se expone una tabla comparando las características generales de un microscopio óptico y un microscopio electrónico.

CARACTERÍSTICAS	MICROSCOPIO ÓPTICO	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO
Iluminación	Haz de luz	Haz de electrones
Longitud de Onda	$2000 \text{ \AA} - 7500 \text{ \AA}$	$0.037 \text{ \AA} - 0.086 \text{ \AA}$
Lentes	Vidrio	Electromagnéticas
Medio	Atmósfera	Vacío
Resolución	$0.2 \mu\text{m}$	3-20 nm
Magnificación	10x-2000x	100x-450000x
Focalización	Mecánica	Eléctrica
Contraste	Absorción-Reflexión	Eléctrica-Scattering

Tabla 8. Comparativa entre el microscopio óptico y el electrónico.

Finalmente, comentar que el microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución (SEI), un detector de electrones retrodispersado que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (BEI) y un detector de energía dispersiva (EDX) que permite detectar los rayos X generados por la muestra y realizar análisis de distribución de elementos en superficie.

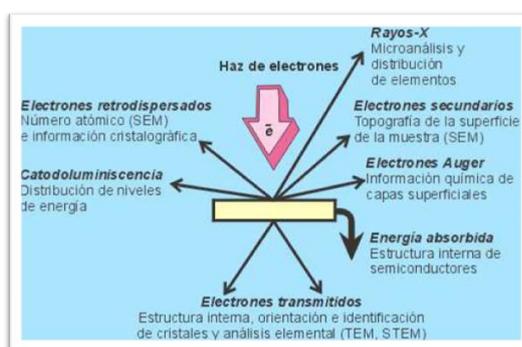


Ilustración 90. Esquema general del efecto del haz de electrones sobre una muestra que dan lugar a los tipos de microscopía electrónica más importantes.

9.6.3.2. Estructura de un SEM moderno.

Un microscopio electrónico de barrido (SEM) moderno consta esencialmente de las siguientes partes:

Fuente de energía.

La fuente de energía del microscopio electrónico de barrido depende de varios factores, siendo los más importantes el voltaje de aceleración, la intensidad de la corriente y el diámetro de haz. Para usos prácticos debe asegurarse una alta estabilidad de la corriente.

En unos puntos el haz de electrones es desviado 1, 2, 3...n veces por los campos magnéticos controlados por el generador de barrido. Como consecuencia el haz es movido sobre la superficie de la muestra y la señal es detectada por el colector de electrones [103]. Se puede ajustar el colector para detectar cualquier emisión como rayos X, luz infrarroja, ultravioleta, etc.

Sistema de vacío.

Si se desea obtener un haz uniforme de electrones, es necesario mantener la columna del microscopio a un alto vacío. Se denomina sistema de vacío al conjunto de dispositivos y procedimientos que se utilizan para este fin.

Un alto vacío corresponde a una baja presión, y la unidad que se utiliza es el mmHg o Torr. Se recomienda utilizar el Pascal (Pa), que es la fuerza de presión que ejerce un Newton sobre 1 m² (1 atmósfera = 101325 Pa). La columna debe mantener un alto vacío, básicamente por cuatro razones:

1. Para permitir el desplazamiento de electrones. Como la distancia entre el cañón de electrones y la pantalla es de aproximadamente un metro, se debe evacuar el gas de toda la columna. En caso contrario, los electrones serían dispersos o detenidos por moléculas de gas, dada la escasa energía cinética de ellos. La forma ideal de trabajo sería remover todo el aire de la columna, pero esto es imposible. Gases, principalmente aire y vapor de agua, penetran en el sistema y deben extraerse continuamente. La mayoría de los microscopios operan con un vacío del orden de 1.33×10^{-4} Pa; en estas condiciones, un electrón puede viajar teóricamente unos 2,5 m antes de encontrar moléculas de gas.

Un alto vacío correspondiente aproximadamente a 10^{-5} Torr. Se considera bajo vacío aquel comprendido entre 10 a 10^{-3} Torr. Un muy buen vacío es 10^{-6} Torr; un cm^3 de aire a esta presión contiene aproximadamente 10×10^{10} moléculas.

2. Para evitar descargas de alta tensión en el cañón electrónico. Cualquier molécula de gas presente entre el filamento y la placa anódica se convierte en un ión positivo al ser bombardeado por los electrones. Esto produciría una descarga eléctrica entre el filamento y el ánodo, lo que impediría la formación de un haz estable de electrones, además de interferir en el contraste de la imagen.
3. Para evitar contaminación del espécimen y de las aberturas. Los gases residuales se condensan en el espécimen y lo contaminan.
4. Para incrementar la vida útil del filamento. A bajo vacío, la vida del filamento se reduce significativamente por oxidación del tungsteno. Esta oxidación también afecta la eficiencia de filamento para emitir electrones.

Se ha comprobado experimentalmente que una presión de gas del orden de 10^{-4} mm de mercurio es suficiente para que la dispersión electrónica sea mínima, la duración del filamento aceptable y no se produzcan descargas.

El vacío de la columna se obtiene con diversos tipos de bombas: bomba mecánica o rotatoria, bombas de difusión de aceite o de mercurio, bombas termoiónicas, turbomoleculares, etc. Es difícil crear un alto vacío en una sola etapa. Por lo tanto se utiliza un sistema donde se emplean diferentes tipos de bombas, en serie. Esto es factible gracias a una serie de válvulas de distribución, cuyo movimiento es automático, en los modelos nuevos, y manual en los antiguos.

En una primera etapa se crea un pre-vacío de aproximadamente 10^{-1} a 10^{-3} Torr, que se obtiene con una bomba mecánica de rotación, de gran capacidad pero de bajo rendimiento. En la segunda etapa, se obtiene un alto vacío de aproximadamente 10^{-5} Torr, por medio de dos bombas difusoras que funcionan con vapores de Hg una, y vapores de aceite, la otra.

Las bombas difusoras deben funcionar continuamente mientras el microscopio está trabajando, por las pequeñas fugas de aire que puedan existir, y porque constantemente se producen gases que conviene eliminar ininterrumpidamente.

Por muy bueno que sea el sistema de bombas utilizado, es difícil obtener un vacío perfecto, ya que siempre existe gas residual. Por ejemplo, a temperatura ambiente y a una presión de 10^{-8} mm de mercurio, el número de moléculas por cm^3 es de aproximadamente 3×10^8 , y a temperatura ambiente y presión atmosférica existen alrededor 3×10^{19} moléculas por cm^3 . Es decir, se extraen millones de moléculas por cm^3 .

Las condiciones de presión del microscopio se controlan utilizando diferentes tipos de manómetros entre ellos: tubos de descarga de gases y manómetros térmicos, como el Pirani y el Penning. Estos últimos se basan en el hecho que la conducción térmica en gases a bajas presiones, es función de la concentración molecular.

Con el objeto de eliminar la necesidad de ventilar y reevacuar toda la columna después de cada cambio de espécimen o película fotográfica, se incorporan al sistema una serie de válvulas que

permiten que ciertas secciones de la columna sean aisladas de las restantes. Así, sólo estas áreas vuelven a la presión atmosférica y pueden ser rápidamente reevacuadas, y luego conectadas al resto de la columna.

Sistema de refrigeración.

Es un sistema que permite enfriar tanto las bombas difusoras (que generan considerable cantidad de calor), como las propias lentes, que también se calientan cuando pasa a través de ellas una corriente eléctrica. Esto se consigue haciendo circular a su alrededor agua tratada, filtrada y refrigerada. Deberá existir una unidad de refrigeración con bombas de agua que permitan el movimiento de ésta a través del sistema.

Las lentes de características más críticas disponen de un serpentín interior, por el cual circula una corriente de agua, que estabiliza su temperatura. De esta forma se evitan pequeñas pero importantes dilataciones de sus elementos.

Unidad óptico-electrónica.

Esta unidad incluye un cañón electrónico, un sistema de barrido y un sistema de lentes electromagnéticas que producen un haz finamente colimado.

▪ **Cañón electrónico.**

La fuente emisora de electrones más utilizada es un filamento de tungsteno que se calienta al rojo-blanco por medio de una corriente eléctrica, en un vacío del orden de 10^{-5} Torr. Entre el ánodo acelerador y el filamento se coloca un electrodo adicional, llamado cilindro de Wehnelt o placa catódica, que permite que los electrones emitidos por el filamento se focalicen en un punto ligeramente por debajo del cilindro de Wehnelt.

Con un diseño adecuado y un potencial convenientemente elegido, se puede lograr una zona de entrecruzamiento de diámetro menor que el diámetro de la zona emisora de electrones en el filamento. En efecto, mientras esta última es del orden de $90\ \mu\text{m}$, la zona de entrecruzamiento puede llegar a unos $10\ \mu\text{m}$. El voltaje de aceleración de los electrones puede variar entre 0.5 y 50 kV, dependiendo de las características de las muestras a observar. La intensidad de la corriente del haz fluctúa entre 10^{-7} y 10^{-12} Ampere.

Es posible obtener una fuente electrónica más brillante y de mayor duración utilizando un cátodo de hexaboruro de lantano (LaB₆), pero requiere un vacío de aproximadamente de 10^{-7} Torr.

Si se desea aumentar la emisión electrónica, se puede aumentar la temperatura de trabajo del emisor. Pero en la práctica este mecanismo tiene un límite, dado por la resistencia mecánica del filamento y la duración del mismo.

Otra forma de aumentar la emisión es utilizar el llamado cátodo frío. Este nuevo cañón electrónico está compuesto fundamentalmente por un cátodo de tungsteno de punta muy aguda, y un ánodo situado muy cerca del cátodo conectado a un potencial positivo. El campo eléctrico resultante, de aproximadamente 10^7 volt/cm sobre la punta, es suficiente para arrancar electrones de la misma. En esta forma, se obtiene un brillo considerablemente mayor que el producido por una emisión termoiónica. Este tipo de cañón electrónico requiere de un vacío de aproximadamente 10^{-10} Torr.

▪ **Sistemas de lentes electrónicas.**

El microscopio electrónico de barrido emplea dos, tres o cuatro lentes electromagnéticas, cuya función es disminuir el diámetro del haz de electrones de aproximadamente de 50 μm en su origen, a valores comprendidos entre 25 y 10 nm al incidir sobre la muestra. Así se obtiene un haz de electrones extremadamente fino y, de acuerdo con el voltaje de aceleración, penetra un poco en el espécimen, determinando un volumen de interacción haz/objeto de una forma aproximada, de donde se desprenden electrones secundarios, retrodifundidos y rayos X, además de otras radiaciones.

La resolución de un microscopio electrónico de barrido está directamente relacionada con las dimensiones de la zona de muestra que es excitada por el haz primario. La intensidad de las señales emitidas está influida por las dimensiones de las zonas de donde ellas se generan, y por la absorción por la muestra misma, lo que a su vez está determinado por la composición de la muestra y la energía de los electrones del haz incidente.

Como la energía de los electrones secundarios es muy baja (10-50 eV), éstos son totalmente absorbidos al atravesar una distancia del orden de 10 nm y por lo tanto, sólo una pequeña parte del volumen contribuye a emitir electrones secundarios que pueden llegar al detector. Las dimensiones de esta sección son ligeramente mayores que el diámetro del haz incidente. Reduciendo el diámetro del haz que incide sobre la muestra, se reducen las dimensiones del volumen excitado, y se mejora la resolución. Pero esto tiene un límite. Normalmente el haz de un microscopio de barrido tiene unos 8 nm de diámetro, y la resolución obtenida es de aproximadamente 10 a 20 nm, dependiendo de la naturaleza y condiciones de la muestra tanto como el voltaje de la operación y tamaño de la abertura del diafragma.

La resolución de la imagen de electrones secundarios se reduce al disminuir la tensión de aceleración de los electrones incidentes. En la resolución influyen también otros factores como el tipo de muestra, el tipo de electrones con que se trabaja, el tiempo de exposición, la contaminación, las vibraciones eléctricas y mecánicas, etc.

▪ **Sistema de barrido.**

Este sistema consiste en un campo de deflexión simple o doble, que puede ser electrostático o electromagnético, y que produce el desplazamiento del haz electrónico sobre la superficie de la muestra. Este campo se localiza cerca de la última lente condensadora, mal llamada "objetiva", en algunos casos.

El haz de electrones se mueve en líneas rectas superpuestas, barriendo la superficie del espécimen en un área rectangular. La misma señal que se aplica a las bobinas deflectoras, se utiliza para barrer en forma sincronizada el haz del tubo de rayos catódicos, produciéndose así una correspondencia punto a punto, entre la superficie de la muestra, que es barrida por el haz de electrones y la pantalla donde se observa la imagen. Este sistema es similar al de la televisión, pero con velocidades de barrido más bajas. El tiempo de barrido oscila entre 0.5 y 500 segundos, indicando con estos valores el tiempo que demora el haz parar barrer verticalmente la zona de la muestra que se está observando en la pantalla.

Usualmente se trabaja con un tiempo de barrido de 10 segundos, durante la observación preliminar de la muestra. Las fotografías se toman con un tiempo de 50 segundos, con lo cual se tiene un mayor número de líneas de barrido, y por lo tanto, una mayor definición.

Portaespecimen.

La cámara portaespecimen está situada en la base de la columna del microscopio y en línea con el haz electrónico. La pieza o platina que sostiene el espécimen permiten varios movimientos:

- a. Desplazamiento en coordenadas rectangulares (ejes X e Y) en un plano a lo largo de la superficie observada de la muestra.
- b. Movimiento de rotación sobre el propio plano de la muestra (en $\pm 180^\circ$) y movimiento de inclinación en el plano horizontal entre (-5 y $+45^\circ$).

Esto permite inclinar el espécimen, tomando como eje cualquier punto que se se está observando. También es posible inclinar el espécimen sin necesidad de variar el enfoque, lo que es indispensable si se desea tomar un par estereoscópico de fotografías.

Existen diferentes tipos de portamuestras, según el tamaño del espécimen a observar. Es preferible usar un portamuestra más pequeño con una distancia de trabajo menor, y obtener así mayor resolución. Dispositivos anexos permiten calentar la muestra por medios eléctricos, o bien enfriarla por medio del sistema de “dedo frío”. Es posible también tensarla o comprimirla mecánicamente.

Sistema de detección.

La emisión secundaria surge cuando el haz primario tiene energía de varios de cientos de electrón volts. Si bien en un principio la corriente secundaria es proporcional a esa energía, llega un momento que nuevos incrementos energéticos del haz primario saturan la superficie emisora, estabilizándose la salida de electrones, e incluso disminuyendo si la energía aumenta excesivamente.

Cada material presenta un coeficiente de emisión secundaria (δ) que es característico, y que se define como la relación entre los electrones emitidos por la superficie respecto a los primarios que la impactan.

Los electrones secundarios son de menor energía que los primarios, y por esta razón, aún cuando se produzcan profundamente, sólo pueden abandonar la muestra los que se generan muy superficialmente ($< 50 \text{ \AA}$).

Los electrones secundarios que se desprenden de cada punto, se detectan mediante un cristal de centello, cuya superficie se mantiene a un potencial positivo de 10 a 12 kV. Este cristal está unido al extremo de un bastón de Lucita, que tiene el otro extremo descansando contra la ventana del tubo fotomultiplicador. Así, los electrones secundarios colectados alcanzan un centellador, donde se origina una señal luminosa que, amplificada por un fotomultiplicador, se convierte en una cascada de fotones. Estos fotones inciden en el fotocátodo, que es parte del fotomultiplicador, y se genera finalmente una señal eléctrica amplificada, capaz de modular el haz de un tubo de rayos catódicos, obteniéndose de esta forma un punto correspondiente de la imagen.

El alto voltaje que se aplica a la grilla del detector hace que los electrones secundarios, de baja energía, recorran una trayectoria curva al dejar la superficie de la muestra. Esto permite obtener

señales aún de regiones muy inclinadas con respecto al detector, además de acelerarlas en dirección a él. Esto no sucede en el caso de electrones retrodifundidos, que viajan en línea recta produciendo imágenes de contraste muy marcado con efectos de luz y sombra bien definidos. Tanto electrones secundarios como retrodifundidos son captados por un mismo detector.

La variación de intensidad de las señales generadas por la muestra se convierte en señales eléctricas, lo que permite obtener imágenes en un microscopio de barrido. No es una imagen óptica de superficie, pero sí una buena aproximación.

Sistema de proyección o visualización de las imágenes.

Las imágenes se proyectan en dos tubos de rayos catódicos de alta resolución, que funcionan en sincronización con el barrido electrónico de la muestra. Uno de ellos, para observación visual, tiene una pantalla de gran persistencia. Fijando el tiempo de barrido en 10 segundos, se obtiene una imagen de 500 líneas. La pantalla del segundo tubo es azul, para registro fotográfico y de baja persistencia. Adosada a esta segunda pantalla va la cámara fotográfica. Aquí se utiliza un barrido más lento, de 1000 o más líneas. Cuando mayor sea el número de líneas en la pantalla fotográfica, mayor será la resolución de la imagen final.

Las dos pantallas pueden tener el mismo tamaño (100x100mm), siendo éste el tamaño máximo de la imagen, la cual puede reducirse hasta un mínimo de 10 x 10 mm, en cualquier parte de la pantalla fluorescente.

Al modular la intensidad del tubo de rayos catódicos con la señal eléctrica dada por los detectores, se obtiene en la pantalla una especie de imagen de la muestra. Es decir, en la pantalla se describe la variación de un tipo dado de emisión producida por la superficie de la muestra barrida por efecto del haz primario.

$$A = \text{largo pantalla} / \text{largo de la región barrida.}$$

El aumento lineal de esta imagen obtenida con un sistema de haces mellizos, es simplemente una relación de tamaño de los rastreos sincrónicos. En otras palabras, el aumento está dado por la relación entre el ancho de la pantalla de observación y la amplitud de la zona barrida por el haz primario. Para altos aumentos, la región barrida del espécimen es muy pequeña comparada con la región rastreada en la pantalla fluorescente. El MEB permite un rango de aumentos que va desde 15 a 100000 veces, dependiendo de la naturaleza y la forma del material examinado.

Imágenes obtenidas por electrones secundarios.

Se ha demostrado que un cambio de inclinación de la superficie de una muestra con respecto al haz electrónico incidente, aún de pocos grados, produce una variación apreciable en el número de electrones secundarios emitidos. Así, un borde agudo o una protuberancia sobre la superficie generan un gran número de electrones secundarios. Lo mismo sucede si se trata de un escalón profundo sobre la superficie de la muestra. Las hendiduras o depresiones producen menos electrones detectables. Estos hechos deben considerarse al analizar las imágenes obtenidas.

Los efectos de variación de la emisión secundaria en función de las características topográficas de una superficie, permiten que se pueda interpretar la imagen de electrones secundarios como una imagen óptica de dicha superficie. Entre los factores que influyen en el contraste de una imagen podemos mencionar:

- a. El ángulo de incidencia del haz electrónico sobre la superficie. Este es un factor determinante en la emisión de electrones secundarios: cuanto más rasante sea el haz, más electrones serán emitidos, ya que solamente los electrones originados en regiones muy próximas a la superficie pueden ser captados por el detector.
- b. La composición química del material en estudio. En las imágenes de electrones secundarios también se observan variaciones de contraste, debido a diferencias en la estructura atómica, ya que aparte de los electrones que llegan al detector son en realidad electrones secundarios producidos por electrones previamente retrodifundidos.

Las imágenes obtenidas con electrones secundarios son de gran utilidad para estudios topográficos y como hemos mencionado, sus trayectorias son curvas, de modo que la imagen aparece con sombras suaves y difusas; en un segundo plano se observan las depresiones o áreas escondidas.

9.6.4. Características del microscopio electrónico de barrido (SEM).

Las características más importantes de SEM son: el poder de resolución, la profundidad del campo y el contraste.

9.6.4.1. Poder de resolución.

El poder de resolución en el microscopio electrónico de barrido (SEM) depende de varios factores, tales como la dimensión del haz de electrones, la difusión del mismo en la muestra antes de la emisión de los electrones secundarios, y la corriente estabilizada de la lente. La dimensión del haz puede reducirse de muchas formas. Se pueden emplear filamentos apuntados o usando elevado potencial de Kv. Por ejemplo a potencia de 1 Kv, la resolución es 140 nm, mientras que a 30 Kv, la resolución les 20 nm (200 A).

Se puede prevenir la difusión del haz de electrones en la muestra, aumentando la potencia de la corriente. Finalmente, la alimentación de corriente debe ser muy estable, del orden de 1 parte en 100000 para conseguir alta resolución.

9.6.4.2. Profundidad de campo.

Se utilizan lentes magnéticas con simetría axial con el fin de producir un fino haz de electrones. De todos modos hay que considerar que la aberración esférica de las lentes magnéticas no puede conseguirse con ningún tipo de lente de simetría axial. Si se quiere obtener un fino haz de electrones, el ángulo de abertura de la lente del objetivo (2°) debe reducirse con el fin de permitir sólo los haces paraxiales.

El haz de electrones mide solamente 30 mm y se mueve en forma de líneas paralelas a través de la muestra. Se puede cambiar la amplificación en escalones de 20x a 100000x aunque la resolución de 25 nm es restringida a aumentos de 10000x a 30000x.

La gran profundidad de campo permite observaciones especiales de la muestra. En general, la profundidad del campo es tan grande como la mitad de una cara del área bajo observación.

9.6.4.3. Contraste.

El contraste en SEM es logrado por el sistema colector. La muestra recibe los electrones del haz de barrido y genera electrones secundarios. Estos electrones emitidos son recogidos por el colector. Los electrones se desplazan en línea recta cuando la muestra es uniforme. Se consigue el contraste óptimo cuando el colector puede recoger el máximo de electrones secundarios. La eficiencia de la emisión de los electrones es máxima cuando el plano de la muestra está inclinado con respecto al haz primario. Por este motivo las microfotografías obtenidas por SEM parecen muy naturales.

9.6.5. Instrumentación.

El microscopio electrónico de barrido utiliza un barrido de electrones sobre la superficie de las muestras a estudio, a diferencia del microscopio fotónico, que se observa el objeto por reflexión de fotones. Pero no siempre son las partículas de la misma naturaleza las utilizadas para formar la imagen o analizar su composición en el SEM. Se pueden distinguir tres grandes secciones: la columna de óptica electrónica, el sistema de vacío y el sistema de vacío de visualización.

La fuente de iluminación es un cañón de electrones que de forma ideal debería producir un haz coherente de electrones monocromáticos. La ausencia de una fuente de electrones equivalente a un láser, hace que la emisión de electrones se estimule desde una pequeña fuente y la no homogeneidad del haz de electrones se corrija a posteriori.

La fuente de iluminación más utilizada son los filamentos de wolframio, en horquilla o en punta, las fuentes de hexaboruro de lantano y las fuentes de emisión de campo. Los filamentos se calientan eléctricamente hasta unos 2700 K. Temperatura suficientemente elevada para producir la emisión termiónica de los electrones de filamento. Una parte importante de esta emisión sería recapturada por el filamento (ya que está cargado positivamente) si no fuera porque se aplica un alto voltaje negativo entre el filamento y un ánodo próximo en forma de disco, que acelera a los electrones alejándolos del filamento.

Esta velocidad depende del voltaje de aceleración. Encerrando al filamento se coloca un cilindro metálico que se llama cilindro de Wehnelt o cátodo, que forma el haz electrostáticamente y del cual emerge con un diámetro de 10 a 50 pm. Todo este sistema va conectado a una bomba de vacío, que se encarga de eliminar las moléculas de gas del recorrido del haz de electrones, para evitar las interacciones entre ellas.

En último extremo, la resolución del SEM está limitada principalmente por el diámetro del haz, los sistemas condensadores reducen el diámetro desde 50 pm hasta 5 pm. Las lentes condensadoras electrónicas son muy diferentes de sus homólogas ópticas. En esencia estas lentes constan de unas bobinas de alambre encerradas parcialmente en una funda cilíndrica de hierro, alineadas con el camino óptico, con una pequeña abertura taladrada en la parte interna de la funda.

Cuando una corriente atraviesa las bobinas se induce un campo electromagnético entre las dos partes de la funda de hierro, siendo las líneas de fuerza del campo magnético las que focalizan el haz. Si todos los electrones tuvieran la misma energía serían focalizados en un único punto, por ello resulta tan importante que el voltaje de aceleración sea muy estable ya que sus oscilaciones dan como resultado lo que se denomina aberración cromática o electrones con diferentes longitudes de onda. Análogamente, las lentes objetivo aseguran que el diámetro del haz incidente sobre la muestra sea la menor posible.

Cuando el haz de electrones incide sobre la muestra, se pueden producir todas las interacciones que se han comentado previamente. Los electrones retrodispersados, se recogen por un detector que los convierte en una señal eléctrica. Este detector contiene información sobre un solo punto de la muestra. Para formar la imagen se necesita bombardear un gran número de puntos de una superficie dada. El haz de electrones se desplaza sistemáticamente, punto a punto a lo largo de una línea e inmediatamente el haz se enfoca en la línea inferior, repitiéndose el barrido. Se barren unas mil líneas, cada una de las cuales contiene unos mil puntos para dar lugar a una imagen simple.

Para conseguir el movimiento del haz sobre la muestra se utilizan dos pares de bobinas de barrido (X e Y), colocadas en lados opuestos de la columna y perpendicularmente al haz, entre las lentes condensadoras y las lentes objetivo. Cada par de bobinas recibe del generador de ondas de corriente adecuadas para este propósito.

En el sistema electrónico de visualización se usa un tubo de rayos catódicos para presentar la señal de forma instantánea como una fotografía. Allí se genera un nuevo haz de electrones que tiene un sistema de focalización y control independiente, sincronizado con el sistema principal del SEM para conseguir una imagen análoga a la televisión (ya que se realizan barridos de imagen simple a una velocidad de 25 veces por segundo). Los detectores más utilizados para electrones de alta energía (> 10 keV) pueden ser del tipo fotomultiplicador de centelleo o de tipo detector de estado sólido.

9.6.6. Evolución del microscopio electrónico de barrido (SEM).

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones.

Cuando un haz de electrones interactúa con un espécimen determinado, este puede transmitir los electrones que inciden en él, reflejarlos, absorberlos, emitir electrones secundarios, producir calor, fotones, rayos X, o bien emitir electrones cargados positivamente.

Los electrones que atraviesan la muestra sin ser afectados se denominan electrones primarios. Gran parte de ellos modifican su trayectoria sin cambiar su energía, (dispersión elástica) y otros electrones sufren cambios en ella (dispersión inelástica). La interacción entre electrones puede producir diferentes fenómenos:

- Desprendimiento de electrones del átomo que son emitidos como electrones libres y debido a su baja energía, solo aquellos cercanos a la superficie pueden ser acelerados y ser captados por un detector.
- En lugar de desprenderse de la muestra los electrones excitados saltan a un nivel energético superior y volver a su estado de energía estable, emitiendo la diferencia de energía en forma de rayos X, luz visible o electrones Auger.
- Una porción de electrones puede ser reflejada en ángulos próximos a los 180°. Estos electrones que han perdido parte de su energía se denominan retrodifundidos.

Por otro lado el haz de electrones puede ser fijo, de 1 μ m a 1mm de diámetro, o móvil, que recorre punto por punto la muestra, de 2 a 200 angstrom.

Basándose en los diferentes tipos de interacciones entre el haz de electrones y los átomos de la muestra, y las distintas señales a que dan origen se han desarrollado distintos instrumentos de análisis.

Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el *Microscopio Electrónico de Transmisión*, MET (Transmission Electron Microscope, TEM) y el *Microscopio Electrónico de Barrido*, MEB (Scanning Electron Microscope, SEM).

Un MET utiliza un haz fijo de electrones, y en la formación de la imagen se aprovechan los electrones primarios, por esta razón solo es posible obtener imágenes de muestras lo suficientemente delgadas como para transmitir entre el 50% y 90% de los electrones que inciden en ella, de aproximadamente 0.1 μ m de espesor. Se han desarrollado microscopios electrónicos de alto voltaje de 200KV hasta 3MeV donde es posible observar preparados de hasta 5 μ m. Sus principales ventajas son:

- Alto poder de penetración de los electrones, para muestras más gruesas.
- Menor daño que sufre el espécimen, dado que el tiempo de interacción del haz y los átomos de la muestra es menor por la velocidad de los primeros.
- Alta resolución en muestras gruesas.

Otro ME que utiliza un haz fijo es el de Reflexión, que aprovecha los electrones reflejados. Sin embargo da imágenes de baja resolución.

Un MEB crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto, utilizando un haz móvil de electrones que recorre la muestra en áreas seleccionadas. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El MEB explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el MET, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse al alcanzar la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones dispersados y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de barrido pueden

ampliar los objetos 100.000 veces o más. Este tipo de microscopio es muy útil porque, al contrario que los MET o los microscopios ópticos, produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto.

Se han desarrollado otros tipos de microscopios electrónicos. Un microscopio electrónico de barrido y transmisión (Scanning Transmission Electron Microscope, STEM) combina los elementos de un MET y un MEB, ya que utiliza un haz de electrones móvil para recorrer una muestra delgada, para luego captar los electrones primarios transmitidos.

Otro tipo de MEB es el microscopio de sonda de barrido que utiliza una sonda que recorre la superficie de una muestra, proporcionando una imagen tridimensional de la red de átomos o moléculas que la componen. La sonda es una afilada punta de metal que puede tener un grosor de un solo átomo en su extremo. Un tipo importante de microscopio de sonda de barrido es el microscopio túnel de barrido (siglas en inglés de Scanning Tunnelling Microscope, STM) desarrollado en 1981. Este microscopio utiliza un fenómeno de la física cuántica, denominado efecto túnel, para proporcionar imágenes detalladas de sustancias conductoras de electricidad. La sonda se coloca a una distancia de pocos angstrom de la superficie del material y se aplica un voltaje pequeño entre la superficie y la sonda. A causa de la poca distancia entre el material y la sonda, algunos electrones se escapan a través del hueco, generando una corriente. La magnitud de la corriente del efecto túnel depende de la distancia entre la superficie y la sonda. El flujo de corriente es mayor cuando la sonda se acerca al material y disminuye cuando se aleja. A medida que el mecanismo de barrido mueve la sonda por encima de la superficie, se ajusta de modo automático la altura de la sonda para mantener constante la corriente del efecto túnel. Estos ajustes minúsculos permiten dibujar las ondulaciones de la superficie. Después de muchas pasadas hacia adelante y hacia atrás se utiliza una computadora para crear una representación tridimensional del material.

Otro tipo de microscopio de sonda de barrido es el microscopio de fuerza atómica (Atomic Force Microscope, AFM), que no emplea la corriente de efecto túnel y que, por tanto, se puede utilizar también en materiales no conductores. A medida que la sonda se mueve a lo largo de la superficie de la muestra los electrones de la sonda de metal son repelidos por las nubes electrónicas de los átomos de la misma. La altura de la sonda se ajusta de modo automático para mantener constante la fuerza de repulsión. Un sensor registra el movimiento ascendente y descendente de la sonda y entrega la información a una computadora, que a su vez la utiliza para dibujar una imagen tridimensional de la superficie del espécimen.

Un instrumento que se ha desarrollado para el análisis de muestras a través de un ME es el microanalizador de rayos X. El microanálisis de rayos X se basa en la excitación de los electrones presentes en una muestra, para producir un espectro de rayos X característico, ya que cada elemento presenta una distribución definida de electrones en sus átomos. El microanalizador de rayos X se anexa al ME (T/B) con el objeto de detectar dichas longitudes de onda y determinar en forma precisa la composición de la muestra en estudio. En análisis químico tanto cualitativo y cuantitativo puede hacerse a muestras biológicas o metales, minerales, semiconductores, etc.

9.6.7. Aplicaciones.

Junto con el desarrollo de la microscopía electrónica, el campo de aplicación de la misma se ha ido extendiendo, debido a algunas características que avalan su uso.

- Son ampliamente utilizados en la biología celular.
- Aunque permite una menor capacidad de aumento que el microscopio electrónico de transmisión, permite apreciar con mayor facilidad texturas y objetos en tres dimensiones que hayan sido pulverizados metálicamente antes de su observación.
- Por esta razón solamente pueden ser observados organismos muertos, y no se puede ir más allá de la textura externa que se quiera ver.
- Los microscopios electrónicos sólo pueden ofrecer imágenes en blanco y negro puesto que no utilizan la luz.
- Este instrumento permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado.

Las aplicaciones del microscopio electrónico de barrido son muy variadas, y van desde la industria petroquímica o la metalurgia hasta la medicina forense. Sus análisis proporcionan datos como textura, tamaño y forma de la muestra. Entre las áreas de aplicación de esta técnica, se pueden mencionar:

- **Ciencia e Ingeniería de Materiales.**

Permite la caracterización morfológica y analítica de materiales, así como el estudio de su microestructura:

- Identificación, análisis de fases cristalinas y transiciones de fases en diversos materiales tales como metales, cerámicos, materiales compuestos, semiconductores, polímeros y minerales.
- Estudio de superficies y tamaño de grano.
- Procesos de difusión.
- Segregación.
- Análisis de fallos. Identificación del tipo de degradación: fatiga, corrosión, fragilización, etc.
- Control de calidad. Valoración del deterioro de materiales, determinación del grado de cristalinidad y presencia de defectos
- Irregularidades de piezas fabricadas en cadena.

- **Geología.**

Una eficaz ayuda en estudios geométricos y morfológicos relacionados con la mineralogía y metalurgia: investigaciones geomineras, cristalográficas, mineralógicas y petrológicas.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra.

La trayectoria del haz pasa por una serie de lentes electromagnéticas que lo desmagnifican y focalizan, de modo que, cuando el haz finalmente incide sobre la muestra tiene un diámetro de sólo 10 nm.

El bombardeo de electrones sobre la muestra produce varias formas simultáneas de radiación, entre ellas, la emisión de electrones secundarios. La detección de esa señal en un gran número de puntos sobre el área barrida, previa transformación electrónica, genera la imagen que se visualiza en una pantalla de TV o es fotografiada mediante una cámara adosada al equipo. La excelente resolución (4nm) y la gran profundidad de foco (del orden de 2 micrones) permiten la aplicación del SEM a disciplinas del ámbito geológico-metalúrgico, biotecnología y ciencia de los materiales.

- Textura de rocas y minerales.
- Identificación de minerales y sustancias sintéticas.

▪ **Metalurgia.**

Control de calidad y estudio de fatiga de materiales, características texturales. Análisis de fractura (fractomecánica) en materiales.

- Observación de composición de materiales.
- Fenómenos de difusión.
- Composición de aleaciones.
- Crecimiento de granos.
- Estudios de corrosión de metales y aleaciones.

▪ **Odontología.**

En este campo son muchas las aplicaciones de las caracterizaciones morfológicas que se pueden realizar con el microscopio electrónico de barrido. Una aplicación específica de este microscopio se obtiene al estudiar la direccionalidad de las varillas del esmalte dental [104]. El esmalte dental posee varias fases de formación, en las cuales se van depositando elementos minerales que llegan al lugar por los vasos sanguíneos circundantes, produciéndose la mineralización total en la última fase de su formación. En esta etapa se forman cristales, que al depositarse toman una disposición en todo el tejido formado, creando las varillas del esmalte, estructura principalmente inorgánica (98%), adquiriendo una disposición muy particular de acuerdo al sector que se estudie de la pieza dentaría. Estas varillas son observadas con un microscopio electrónico de barrido, notando que estas se disponen en diferentes direcciones con un sólo sentido desde el límite amelodentinario a la superficie, entrecruzándose en las cúspides y en ciertos sectores de las caras libres y proximales, lo que se denomina multidireccionalidad de las varillas. Para ello se extraen piezas dentarias humanas (con indicación quirúrgica), las que son metalizadas con oro-paladio y luego son estudiadas en el SEM. De este modo se puede observar la disposición de las varillas, analizar los cambios de direcciones en el espesor del esmalte y comparar la disposición en los distintos sectores del esmalte (oclusal, 1/3 medio y 1/3 cervical). Además se pueden analizar a través del SEM las alteraciones que producen los ácidos producidos por la entrada de microorganismos y restos alimenticios en las superficies vestibulares de los dientes anteriores, ya que sobre ellos se produce la retención de los materiales odontológicos en fracturas, fisuras, ferulizaciones, etc. La entrada de los microorganismos se produce, ya que para la retención del material de

restauración, desde los comienzos de la odontología, se han realizado tallados en forma de retención mecánica en las piezas dentarias, formándose estos en la interfase restauración-diente.

▪ **Biología.**

- Observación de los distintos organelos intracelulares.
- Diferenciación de células.
- Estructura y ultra estructura de tejidos y órganos animales y vegetales.
- Inmunocitlocalización de macromoléculas.
- Patologías animales y vegetales.
- Estudios forenses (búsqueda de partículas, tejidos, hilos, semen...).

▪ **Control de calidad.**

En este campo, el microscopio electrónico de barrido es de gran utilidad para el seguimiento morfológico de procesos y su aplicación en el control de calidad de productos de uso y consumo. Algunas industrias que lo utilizan son:

Fibras. En fibras textiles el SEM se utiliza para examinar detalles superficiales de fibras, modificaciones en las formas de las fibras o en detalles superficiales, dañado de fibras, construcción de hilos y tejidos, fractografía de fibras rotas por diferentes causas, urdimbre, dimensiones de características de fibras desde diferentes ángulos,...

Un ejemplo de aplicación de la SEM en fibras textiles es el caso de la diferenciación entre la fibra de lana y las fibras denominadas especiales, tales como el mohair y el Kashmir. El precio de las fibras especiales es mayor que el de la lana, por lo que el fraude se puede presentar por etiquetar prendas de lana como compuestas por fibras especiales. La identificación, es decir, comprobar si una fibra es lana o fibra especial se realiza en el SEM midiendo la altura de los bordes distales de las células cuticulares.

Otra utilidad es la detección de productos nocivos en ciertas fibras. La fibra de vidrio y la fibra mineral de amianto tienen algunas aplicaciones comunes en la industria. Por ejemplo, ambas se utilizan como aislantes térmicos y eléctricos. El interés principal es detectar la enfermedad denominada asbestosis, lo que hace que esté altamente restringida su presencia de amianto, ya que el polvo de esta fibra es nocivo por inhalación, produciendo aplicación.

Curtidos. Esta es una técnica de fabricación de cueros, mediante la cual se somete la piel de ciertos animales a una preparación y tratamientos adecuados para transformarla en cuero, a fin de preservarla de la putrefacción natural y de que conserve su flexibilidad y elasticidad al secarse, sin adquirir consistencia córnea. Por lo general, el cuero se somete a un proceso denominado aserrado, mediante el cual se divide en dos hojas, quedando así desdoblado en la parte correspondiente al pelo o exterior (forma de flor), de espesor uniforme, y la parte correspondiente al lado de la carne que conserva las irregularidades de espesor o grosor del cuero antes del aserrado. Por diferentes razones, la parte denominada flor está considerada de mayor calidad y por tanto es más cara.

▪ **Otros.**

- Biodeterioro de obras de arte.

9.7. Determinación de las características morfológicas y topográficas de las muestras; estudio cualitativo y cuantitativo de la presencia de elementos químicos en las muestras.

9.7.1. Introducción.

En esta fase del estudio, una vez evaluado el contenido de metales, concretamente aluminio, procedentes del implante de titanio Ti6Al7Nb presente en los fluidos biológicos de los animales de experimentación (minipig), lo que se pretende es evaluar los efectos sobre las características mecánicas del hueso y el comportamiento de la interfase implante metálico-hueso. En resumen, realizar un estudio microanalítico cuantitativo de las muestras de tejido tomadas mediante un microscopio electrónico de barrido SEM con analizador EDX para evaluar el efecto de la placa metálica "in vivo" sobre su entorno (debilitación de hueso, crecimiento óseo, inducción ósea).

Para estudiar la estructura de las células, tejidos y órganos que constituyen los componentes del cuerpo humano y organismos pluricelulares, el hombre ha desarrollado diversos métodos y técnicas, y ha ido perfeccionando los instrumentos necesarios para conocer con más profundidad la morfología y función de los diferentes niveles de organización de la materia. Es pues importante conocer, antes de estudiar la estructura y la composición de las células y los tejidos, algunos métodos, técnicas e instrumentos de los que se dispone para llegar a estos conocimientos.

El hueso es una combinación única de células de muchos tipos, las cuales sintetizan un característico subgrupo de componentes de tejido conectivo [105]. Además de las funciones del hueso obviamente relacionadas con el esqueleto (soporte, protección y locomoción), el hueso es un importante reservorio de elementos hematopoyéticos, células madre y minerales. Almacena el 99% del calcio del cuerpo, 80% del fosfato y un alto porcentaje de las reservas de magnesio, sodio y carbonato; actúa como un mecanismo de defensa contra la acidosis y asiste al sistema renal y respiratorio a mantener el balance ácido-básico [106].

El tejido óseo contiene un 60% de sustancias minerales, 20% de agua y 20% de componentes orgánicos. Alrededor del 90% de la matriz orgánica del tejido óseo está representado por fibras de colágeno tipo I y el 10% restante por sustancias no colágenas; de ellas el 8% son glicoproteínas, fosfoproteínas y proteoglicanos y el 2% restante compuestos que aún no han podido ser caracterizados [107].

9.7.2. Métodos de estudio de los tejidos biológicos.

9.7.2.1. Microscopía electrónica analítica.

El desarrollo progresivo de la Microscopía Electrónica en el último tercio del siglo XX y la aplicación conjunta de la misma y los sistemas de detección de rayos X desarrollados sincrónicamente, han permitido conocer, en un corto periodo de tiempo e in situ la morfología y composición química de una determinada muestra biológica por medio de técnicas no destructivas.

Existe un amplio número de técnicas analíticas para estimar el contenido de los elementos inorgánicos en los especímenes biológicos como la espectroscopía por absorción atómica y la fotometría de llama

[108] [109] [110]. Estas técnicas, aparte de requerir un número elevado de células, tan solo consideran uno o dos cationes simultáneamente. Así mismo, el empleo de métodos electrofisiológicos o fluorimétricos, mediante el uso de indicadores fluorescentes específicos para iones (Fura-2, Fluo-3) para evaluar las actividades de los diferentes iones, no proporcionan información sobre la localización subcelular debido a su baja resolución microscópica.

Por el contrario, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X es una técnica que combina la posibilidad de análisis químico con el poder de resolución del microscopio electrónico y, por tanto, posibilita correlacionar la información estructural con el contenido elemental. Además, permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ($Z \leq 11$) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones y requiere tan solo un número de células pequeño.

La determinación en la microscopía analítica se lleva a cabo cuando un haz de electrones acelerados incide sobre la superficie de una muestra y se produce, entre otros fenómenos, la ionización de los átomos de la misma, esto es, la pérdida de los electrones de los orbitales internos. Cuando un átomo se encuentra en un estado ionizado, otro electrón de una capa más externa salta inmediatamente a la capa deficitaria y rellena el defecto producido. Este salto implica una liberación de energía que se manifiesta en forma de radiación electromagnética (rayos X) que es dependiente del número atómico del elemento. Los rayos X generados como resultado de la colisión entre los electrones del haz primario con los electrones de los orbitales que se encuentran alrededor del núcleo. Por el contrario, los rayos X continuos, o radiación continua, son producidos como consecuencia de la desaceleración que sufren los electrones del haz primario al interactuar con el núcleo atómico. La energía de los rayos X característicos depende del número atómico del elemento y puede ser utilizada para identificar el elemento químico presente en la muestra [111] [112].

En análisis de rayos X emitidos por la muestra va a permitir conocer la composición de la misma, pudiendo analizarse de forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa [113]. Dicho análisis consiste en medir la energía de los fotones producidos, previa transformación de su energía electromagnética en señal eléctrica, utilizando un espectrómetro de dispersión de energía. Posteriormente, los impulsos eléctricos son clasificados utilizando un analizador multicanal acoplado a dicho sistema, originando un espectro a partir del cual es posible derivar la composición química del espécimen visualizado en el microscopio electrónico. El espectro es un histograma de frecuencia que muestra el número de rayos X detectado para cada rango de energía y está constituido por una serie de picos, designados indistintamente como líneas de intensidad variable (rayos X característicos) los cuales están superpuestos a un fondo continuo de menor intensidad (rayos X continuos, radiación de fondo o radiación blanca).

La aplicación de la microscopía electrónica analítica ha tenido una amplia difusión entre los diferentes campos de la ciencia, incorporándose en alguno de ellos con carácter casi indispensable. Tal es el caso de la metalurgia, mineralogía, petrología y, en general, en las ciencias de los materiales. Su aplicación al estudio de la composición elemental de las muestras biológicas está permitiendo obtener una importante información relacionada con la identificación y transporte de iones difusibles, la identificación de depósitos orgánicos y la composición de las macromoléculas, por lo que su utilización es cada vez mayor en distintos campos de la investigación, tales como la microbiología, biología vegetal y animal, toxicología, medioambiente y medicina.

Un aspecto fundamental relacionado con la aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X al estudio de las muestras biológicas lo constituye la diferencia existente entre la dureza de los distintos tipos de muestras, lo que ha llevado a clasificar las mismas en tejidos duros y tejidos blandos [114]. El microanálisis de tejidos duros está ampliando considerablemente, entre otros aspectos, el conocimiento de sus diferentes grados de mineralización, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y experimentales [115] [116]. Así mismo, la posibilidad de valorar la reacción del organismo frente a la aplicación de diferentes prótesis e implantes, vasculares o no, mediante la utilización de a microscopía electrónica analítica, está favoreciendo los estudios relacionados con los procesos de biocompatibilidad y degradación [117] [118] [119] [120].

En relación con los tejidos blandos, ha sido a partir de la última década cuando un número creciente de laboratorios de investigación ha desarrollado y empleado dicha metodología para analizar el contenido elemental de las células aisladas y en cultivo, lo que ha supuesto una importante fuente de información en su aplicación a la patología para el estudio de enfermedades de distinta índole y fundamentalmente las relacionadas con los cambios iónicos, como la fibrosis quística, la enfermedad de Alzheimer y aquellas en las que es posible la identificación de partículas como la asbestosis, beriliosis y silicosis [121] [122] [123] [124].

La aplicación de la microscopía electrónica analítica al estudio de células aisladas y en cultivo, de gran interés en biomedicina por el fácil control de su microambiente, puede aportar una información suplementaria a los estudios ultraestructurales, bioquímicos y fisiológicos, al ofrecer más ventajas que otras metodologías utilizadas en el análisis de la composición elemental de células en cultivo como la absorción atómica y la fotometría de llama, ya que permite el análisis in situ de células individuales, subpoblaciones dentro del cultivo y organelas, así como el análisis simultáneo de todos los elementos presentes en la muestra ($Z \geq 5$).

9.7.2.2. Microscopio óptico de campo brillante.

Este tipo de microscopio utiliza como fuente de iluminación la luz visible. Cuando la muestra a observar es transparente a la luz empleada, el haz luminoso la atraviesa iluminando el campo que se quiere observar. Aquí se emplea un *sistema de iluminación de luz transmitida*.

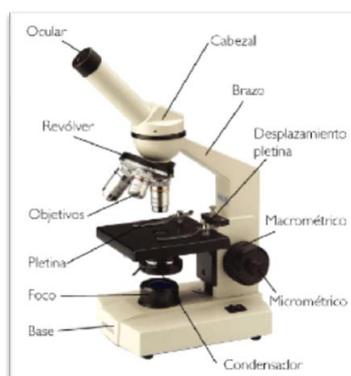


Ilustración 91. Microscopio óptico de campo brillante.

Este tipo de microscopio, se encuentra formado por un *sistema de iluminación* compuesto por una fuente de luz que puede ser emitida por una lámpara incandescente en la base del equipo, o proyectada por un espejo. Este haz de luz atraviesa una lente condensadora que lo concentra sobre la muestra, para obtener una iluminación óptima de la misma. Otra parte importante del equipo es el *sistema óptico*, el cual está constituido por varias lentes las que están diseñadas y construidas para evitar o corregirlos defectos y las aberraciones que pueden producirse durante la proyección de la imagen.

La lente *objetivo* recibe este nombre por ser la que se encuentra más cerca del objeto a examinar. Esta lente forma una imagen primaria ampliada del objeto, en el plano focal de una segunda lente compuesta, la lente *ocular*, que recibe este nombre por estar cerca del ojo del observador. La lente ocular amplía la imagen primaria y forma una *final ampliada en la retina del observador*. Además del sistema de iluminación y del sistema óptico, en el microscopio existe un *sistema mecánico* que está constituido por aquellas partes que sostienen los sistemas de 3 lentes y de la muestra, y que además sirve para el enfoque y el movimiento de la muestra bajo el objetivo.

Este tipo de microscopio puede trabajar acoplado a distintos instrumentos, uno de ellos, el micromanipulador, que permite mediante movimientos en los distintos planos del espacio, y de una forma muy precisa, hacer disecciones sobre tejidos y células, introducir micropipetas y microelectrodos para suministrar sustancias o medir potenciales eléctricos en las células.

El esquema básico del microscopio de campo brillante, sirve para el estudio de los diferentes microscopios ópticos, los que al presentar un aditamento, dispositivo o accesorio adicional permitirá una observación más especializada; por ejemplo, el invertido, el de polarización, el de fluorescencia, el de contraste de fase, etc.

9.7.2.3. Microscopio óptico de contraste de fase.

Cuando una muestra, por ejemplo una célula, debe ser observada viva, no se puede procesar por ninguna de las técnicas que serán descritas más adelante (inclusión, corte y coloración) y, por tanto, al ser vistas en un microscopio de campo brillante, serían pocos los detalles observables de la muestra. Para una visualización con suficiente contraste, se utiliza un microscopio especial que tiene un dispositivo que transforma las diferencias de fase de la longitud de onda de la luz empleada, en diferencias de amplitud. La luz, al atravesar una muestra, es desfasada normalmente con respecto a la luz que atraviesa el medio donde se encuentra dicha muestra (agua, aire, aceite. etc.). Este desfasaje es pequeño y el ojo humano no es capaz de distinguirlo; ahora bien, mediante dispositivos que existen en los llamados microscopios de contraste de fase, la diferencia de fase se aumenta lo suficiente como para que el ojo lo distinga, pudiéndose apreciar distintas intensidades de luz que van desde la oscuridad hasta el brillo intenso. Los diferentes tonos intermedios están determinados por las diferencias de espesor en la muestra.

9.7.2.4. Microscopio óptico de luz ultravioleta y de fluorescencia.

La luz ultravioleta, que no es visible al ojo humano, pero que si se puede utilizar en microfotografía, tiene una longitud de onda muy corta (300 μm) y es absorbida por algunos componentes celulares como los ácidos nucleicos, o por determinadas sustancias que se le pueden suministrar a las células.

El microscopio de luz ultravioleta puede utilizarse para la toma de microfotografías usando una película sensible a esta radiación, o mediante la visualización de las imágenes captadas por una cámara de televisión sensible a la luz ultravioleta.

La luz ultravioleta, por ser una radiación de alta energía, se utiliza en las técnicas de fluorescencia que consisten en la excitación de los electrones de sustancias presentes en las células o tejidos, o que pueden ser suministrados previamente.

Para esto se utilizan colorantes especiales o fluorocromos, los cuales, dependiendo del tipo empleado y de la energía de excitación, emitirán con una longitud de onda que mediante filtros puede ser observado por ojo humano.

Un ejemplo de esta técnica, consiste en suministrar a células vivas en cultivo o a animales de investigación vivos, uno de estos reactivos y examinar después al microscopio de fluorescencia el sitio donde este material se acumula, por ejemplo, usando naranja acridina como fluorocromo se puede demostrar la localización de ADN, al cual se le observa una fluorescencia de color verde naranja en el núcleo de las células que han captado dicho colorante.

9.7.2.5. Microscopio electrónico de transmisión, TEM.

Los electrones al tener una longitud de onda muy pequeña (0.005 nm) permiten a este instrumento un alto poder de resolución. El microscopio electrónico se asemeja en algunos aspectos al microscopio óptico, ya que consta de:

- a. Sistema de iluminación.
- b. Sistema de manipulación de la muestra.
- c. Sistema de formación de la imagen.
- d. Sistema de proyección de la imagen.

La fuente de iluminación es un fino filamento de tungsteno (cátodo) que al ser calentado por el paso de una corriente emite electrones, los cuales son desprendidos a gran velocidad al establecerse una diferencia de potencial eléctrico entre el cátodo y el ánodo (este se encuentra cerca del primero), pasando a través de este último por una apertura hacia una columna metálica hueca, donde existe un alto vacío para evitar que los electrones que viajan a través de ella sean difractados por moléculas extrañas.



Ilustración 92. Microscopio electrónico de transmisión.

Una vez acelerados los electrones por el ánodo, atraviesan un campo magnético producido por la condensadora, la cual concentrará los electrones en un haz fino y lo dirigirá hacia la muestra. Esta última se introduce dentro de la columna por un dispositivo especial que expone el objeto a estudiar al haz de electrones el cual constituye el *sistema de manipulación de la muestra*.

La muestra se contrasta con sustancias que contienen metales pesados de alta densidad electrónica en sus átomos, los cuales presentan diversas afinidades por determinados componentes celulares; una vez que el haz de electrones atraviesa la muestra, los mismos chocan con la nube electrónica de estos compuestos que se han depositado sobre los componentes celulares lo que produce un retardo y dispersión de la trayectoria de alguno de los electrones, mientras que otros continuarán su trayecto hasta llegar a la pantalla fluorescente, donde se forma la imagen.

El dispositivo con la muestra puede moverse en distintas direcciones en un plano perpendicular al eje de la columna o puede ser ligeramente inclinado para algunos estudios en que se requiere este movimiento.

Luego de atravesar la muestra, los electrones pasan inmediatamente a través de la *lente objetivo*, donde se *forma una imagen primaria invertida*, la cual es rectificadora por una *lente intermedia* y proyectada hacia una pantalla fluorescente, formando la imagen final aumentada al chocar los electrones y producirse una emisión de ondas en el rango de la luz visible. Por debajo de esta pantalla existe una cámara fotográfica donde se registran las imágenes, una vez retirada la pantalla fluorescente.

9.7.2.6. Microscopio electrónico de barrido, SEM, con analizador de energía EDX.

Existe otro tipo de microscopio electrónico que recibe el nombre de microscopio electrónico de barrido y que se basa en el estudio de los electrones reflejados por una superficie. Un dispositivo integra la imagen, la cual se observa en un sistema de televisión; mediante este equipo es posible estudiar la estructura tridimensional de las superficies; por ejemplo, los cilios de una célula, la forma bicóncava de los hematíes, etcétera. Adicionalmente, la emisión de la radiación X característica se utiliza como una técnica complementaria para el análisis químico cualitativo, y en algunos casos semicuantitativo. En SEM, diferentes detectores amplifican la radiación emitida por la superficie de la muestra cuando es barrida por un delgado haz de electrones. La intensidad de la señal amplificada es visualizada en una pantalla de televisión convencional.

Este tipo de microscopio electrónico, dado su poder de resolución (alrededor de 20 nm o más), permite el estudio detallado de estructuras cuyas dimensiones se encuentran entre los límites de resolución del microscopio óptico (0.2 μm) y el microscopio electrónico de transmisión que puede alcanzar de 0.3-0.1 nm.

Finalmente, los microscopios electrónicos de barrido pueden incorporar un detector de rayos X (EDX, espectrómetro de dispersión de energía) que permite realizar análisis de los rayos X característicos de determinadas zonas de la muestra, identificando la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos químicos que se encuentran presentes en ella a través de gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución (microanálisis de la muestra). Es pertinente señalar que el analizador EDX de rayos x

identifica y evalúa el contenido de elementos químicos desde el carbono al uranio en superficies planas o secciones finas de las muestras en todo tipo de material, biológico e inerte [125].

Además de la obtención de un espectro químico en un punto concreto de la muestra, existen dos formas gráficas de obtener información de la señal de rayos X:

- a. Los perfiles de línea que permiten identificar gráficamente la variación de la concentración de uno o varios elementos entre dos puntos.
- b. Los mapas de RX que sirven para ver gráficamente la distribución de los elementos en la zona seleccionada, asignando un color diferente a cada uno.

Los mapas de RX también ofrecen imágenes semicuantitativas de la concentración de los elementos mediante la densidad de puntos de un determinado color en la zona.

9.7.3. Técnicas de preparación de muestras para observarlas al microscopio.

Al observar una estructura al microscopio óptico o al electrónico, la luz o los electrones atraviesan la muestra, dando lugar a la formación de imágenes que son ampliadas por las lentes del microscopio. Para esto es necesario que los objetos examinados sean lo suficientemente delgados, para que la luz o los electrones los atraviesen.

En el caso de la microscopía óptica las muestras deben tener un grosor de 5-8 μm aproximadamente, y para microscopía electrónica, valores entre 20 y 40 nm. Es necesario, por tanto, cortar el material que ha de ser estudiado en "lascas" muy finas.

Los requerimientos específicos que deben presentar las muestras con respecto a su tamaño y espesor, vienen dadas por la pletina del microscopio. Además de su estabilidad y que pueden permanecer a potencial constante durante el tiempo de examen.

Por ello las muestras deben ser metálicas, estar metalizadas o simplemente recubiertas por una capa conductora, sin que la magnitud de la conductividad sea crítica incluso cuando esta es relativamente baja.

En el SEM se puede introducir tanto muestras masivas como muestras particuladas, e incluso muestras en disolución que deberían ir montadas sobre un portaobjetos de vidrio del propio microscopio. En todos los casos, las muestras deben ir fijadas a un brazo que se introduce en el microscopio de tal manera que puedan ser desplazadas según tres direcciones perpendiculares entre si dentro del microscopio para obtener imágenes con distintas orientaciones.

En general, la preparación de las muestras es sencilla y los requisitos que deben cumplirse son: fijación, deshidratación y secado; además, la superficie debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no en las muestras biológicas, por lo que éstas se recubren con una capa de carbón o de oro, según las condiciones en las que se trabaje la muestra y el objetivo del estudio, es decir, para ser analizadas por EDX o para ser vistas al microscopio. Antes de tratar las muestras se debe tomar en cuenta el material a ser observado y guiarse por los parámetros específicos para cada muestra.

La preparación del material biológico muerto, para su estudio al microscopio óptico o al electrónico, consta de cuatro pasos fundamentales.

1. La fijación.
2. La inclusión.
3. El corte.
4. La coloración.

Mediante la *fijación* se logra detener los procesos de destrucción, celular o hística, que se producen por las enzimas contenidas en ellos, una vez muerto el organismo o al separarla de él. Este proceso de destrucción celular recibe el nombre de autólisis.

Por otra parte, la estructura se conserva lo más natural posible, ya que las sustancias fijadoras actúan sobre los componentes celulares deteniendo la autólisis mediante reacciones químicas con reactivos como el formol, el glutaraldehído, el tetraóxido de osmio, etc., o pueden actuar coagulando las proteínas cuando se utiliza el calor.

A continuación se realiza la *inclusión* del tejido, para que el material tenga la suficiente firmeza al cortarse. El agua que contiene el tejido se sustituye por una sustancia que le da rigidez y evita que se deforme. Esto se logra introduciendo el material a procesar en alcoholes de gradación creciente, lo que irá sustituyendo el agua por el alcohol. Después el alcohol es sustituido por un solvente orgánico como es el xilol, la acetona, etc., para de esta forma terminar incluyendo el tejido en una sustancia que es miscible en este solvente orgánico. Estas sustancias son la parafina, que se utiliza en microscopía óptica, y las resinas sintéticas, que se utilizan en microscopía electrónica.

Una vez incluido el material se realiza el corte utilizando equipos especiales, los cuales presentan una cuchilla que corta "lascas" del material. Para microscopía óptica se utilizan cuchillas de acero y el equipo recibe el nombre de micrótopo. En microscopía electrónica se utilizan los ultramicrotopos, que emplean cuchillas de vidrio o diamante.

Los cortes para su observación al microscopio óptico, se montan en una lámina de vidrio llamada *portaobjetos*. Para microscopía electrónica se montan en unas rejillas metálicas pequeñas que presentan perforaciones, las cuales permiten el paso del haz electrónico.

Para el estudio de cortes al microscopio óptico de campo brillante es necesario colorear previamente la muestra con diferentes compuestos químicos (colorantes), que tienen la capacidad de reaccionar con los diversos componentes de las estructuras celulares.

La posibilidad de observar una coloración dada en una estructura se debe a que esta se comporta como un filtro de color, dejando pasar solamente la luz de determinada longitud de onda. Los colorantes que corrientemente se emplean para la observación de láminas histológicas, son sales neutras que presentan radicales ácidos o básicos, es decir, colorantes ácidos y básicos. Una coloración de uso corriente en histología es la hematoxilina y eosina (H/E) que emplea ambos tipos de colorantes. Con esta coloración se observa que el núcleo se tiñe con el colorante básico (azul), y el citoplasma se colorea con el colorante ácido (rosado).

El núcleo, al tener afinidad por el colorante básico (el ADN capta el colorante básico), es *basófilo* y la propiedad que manifiesta esa estructura se denomina *basofilia*. Por su parte, el citoplasma, excepto en células secretoras de proteínas, es generalmente *acidófilo*, es decir, tiene afinidad con el colorante ácido eosina. La propiedad de reaccionar con los colorantes Ácidos, es la *acidofilia*.

Otro grupo de colorantes, los básicos de anilina, incluyen el azul de toluidina, el azul A, el azul de metileno. Se emplean para identificar los mucopolisacáridos. Al colorearse las estructuras, lo hacen de un color distinto al del colorante original. Esa propiedad se denomina *metacromasia*. Los colorantes básicos de anilina son el azul brillante, el rojo neutro y el verde Janus.

Las técnicas de tinción incluyen también la utilización de varios colorantes. Ejemplo de ellos son los métodos tricrómicos como el Mallory, el Mallory-Azan y el método de Masson utilizados para demostrar las fibras del tejido conjuntivo, etc. Otra técnica de coloración muy empleada es la tinción con sales de plata, que tiñe de negro o carmelita oscuro las estructuras celulares, estas se denominan por la afinidad con las sales de platas *argirófilas*.

Por otra parte, el fenómeno fundamental que permite la visualización de las estructuras al microscopio electrónico, esta dado por la dispersión electrónica que provocan los elementos químicos que componen las estructuras de la muestra. Estos elementos tienen por lo general bajo peso atómico (C, O, N, H, etc.), por lo que se hace necesario asociar a estas estructuras, compuestos que contengan metales pesados de mayor peso atómico, por ejemplo el tetraóxido de osmio y las sales de uranio, que reaccionan con zonas específicas de la muestra, provocando una mayor dispersión y, por tanto, un contraste entre las diferentes zonas.

La imagen que se observa en la pantalla fluorescente del microscopio electrónico está formada por los electrones que atraviesan la preparación sin una gran dispersión. Los diferentes tonos están determinados por la llegada o no de ellos, donde las zonas brillantes corresponden, al lugar en el que un mayor número de electrones chocan con la pantalla fluorescente.

9.7.4. Procedimiento para la determinación de las características morfológicas y topográficas de las muestras.

9.7.4.1. Aspectos preanalíticos. Obtención y almacenamiento de los especímenes.

Tras el sacrificio de los animales, se procedió a la disección de las extremidades intervenida. Mediante una osteotomía de la tibia se obtuvieron los fragmentos con la porción ósea que contenían los implantes. Los especímenes se colocaron en frascos debidamente identificados con el número de animal al que pertenecían. Posteriormente, en laboratorio estas muestras se disecaron con el objeto de eliminar todos los tejidos blandos (músculo, fascia, tendones y periostio).

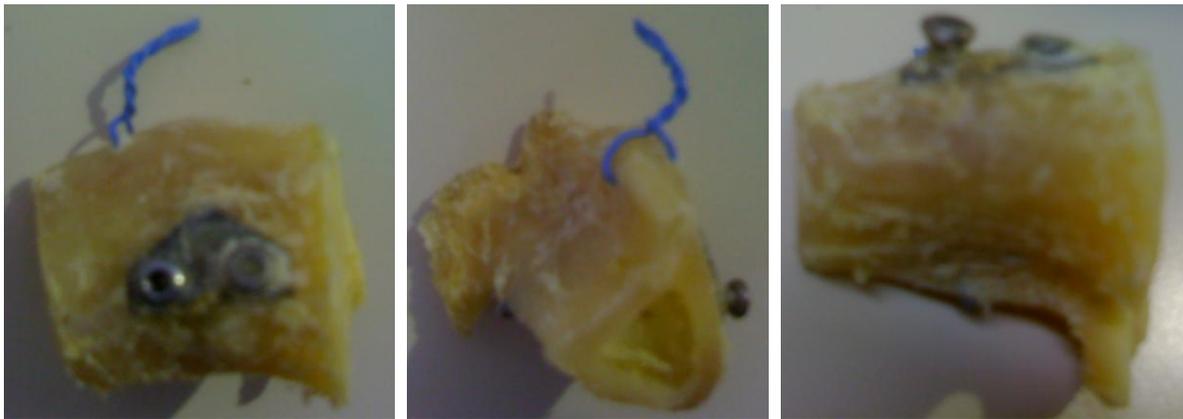


Ilustración 93. Muestras de porción ósea con implantes.

La preparación de las muestras para su posterior estudio histológico, se describe a continuación.

En primer lugar, se prepararon los bloques para la fijación, realizando los cortes con una sierra circular con filo de diamante e irrigación, para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, y se sumergieron en una solución de formol al 10% tamponado a pH=7.2-7.4, para su posterior procesado.

Después, las muestras fueron deshidratadas en series de alcoholes de gradaciones crecientes; dado el tamaño de las piezas, se probarán periodos de tiempo largo, de 5 a 7 días en cada uno de los alcoholes, como se especifica a continuación:

- Alcohol 70º de 5-7 días.
- Alcohol de 80º de 5-7 días.
- Alcohol de 96º de 5-7 días.
- Alcohol 100º de 5-7 días.
- Tolueno 3 días.

Posteriormente, los especímenes son embebidos en una resina metilmetacrilato para su inclusión, según el siguiente protocolo:

- Resina I, 2 días.
- Resina I, 2 días.
- Resina I, 2 días.
- Resina II, 2 días.
- Resina II, 2 días.
- Polimerización en estufa a 32 °C.

Tras el paso de toluol o xilol, ambos válidos, las muestras se pasan a la resina. Hay varios baños en los dos tipos de resina, la diferencia entre ambas es únicamente la cantidad del acelerador (peróxido de benzoílo).

- La resina I se obtiene mezclando 100 ml de metil metacrilato, más 25 ml de dibutil ftalato, más 2.5 g de peróxido de benzoílo.
- La resina II se consigue mezclando 100 ml de metil metacrilato, más 25 ml de dibutil ftalato, más 4.5 g de peróxido de benzoílo.

La resina II es la que contiene la cantidad definitiva de acelerador y, en ella, se dan los dos últimos baños. Esta mezcla es la que se utiliza para la inclusión o el empastillamiento. Los tiempos que aparecen en el protocolo son los que se utilizaron, pero hay que tener en cuenta que al no hacer el vacío, los tiempos se reducen al aplicarlo⁴. Tras el proceso de polimerización, la muestra queda incrustada en la resina.

A continuación, se realizaron los cortes longitudinales del implante, según el protocolo establecido, con una sierra circular, a baja velocidad e irrigando para evitar el sobrecalentamiento de la muestra y el deterioro de los tejidos que rodean el implante.

Con el objetivo de asegurar el paralelismo de las caras del bloque, una vez expuesto el implante (debido al primer corte), el bloque se adhiere con la ayuda de una prensa de precisión, a un portaobjetos que mantendrá la superficie de corte paralela al portaobjetos empleado.

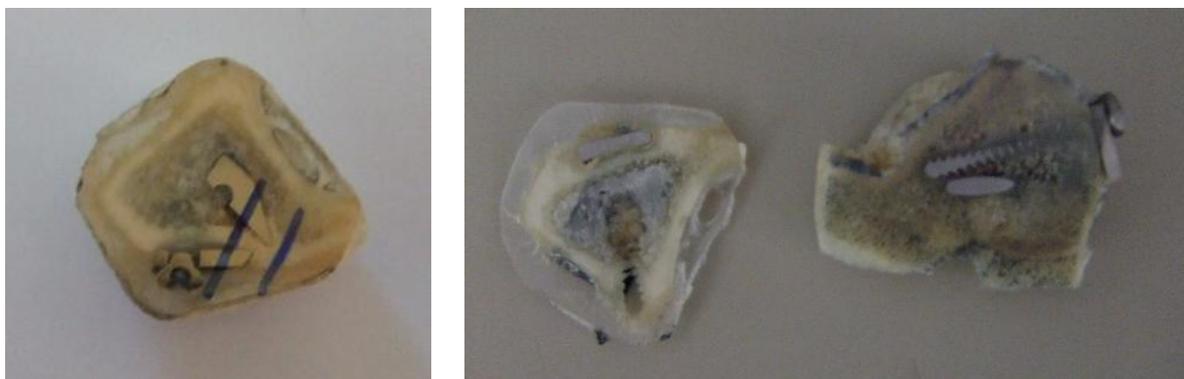


Ilustración 94. Muestras empastilladas de porción ósea con implantes.

Una vez realizados los cortes, se procedió al pulido de las muestras hasta que quedara expuesta la superficie del implante al nivel deseado, y después se terminó la preparación con el fin de obtener una superficie tan lisa como fuera posible. Finalmente, los especímenes se fijaron al portaobjetos definitivo.

Con el objetivo de estudiar la interfaz entre los implantes bioactivos y el hueso, se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) con un analizador de dispersión de energías de rayos X (EDX).

Para ello, las muestras se recubrieron con oro para garantizar la conductividad de toda la muestra y así optimizar la calidad de las imágenes obtenidas.

9.7.4.2. Aspectos intra-analíticos.

El SEM está compuesto por tres detectores que se clasifican en imágenes de electrones secundarios, imágenes de electrones de retrodispersión y analizador EDX de rayos x, los cuales están instalados dentro de la cámara de vacío.

⁴ El oxígeno inhibe la polimerización.

La muestra se coloca en el portamuestras de la cámara de vacío del microscopio, en donde es escaneada por medio de un haz de luz de electrones, convirtiendo las señales eléctricas en una imagen tridimensional que se observa en el monitor del ordenador.

En el analizador EDX de rayos X del SEM se realizan diversos análisis representados con histogramas e imágenes de distribución de los elementos químicos presentes en la muestra. La formación de un espectro EDX de Rayos x se obtiene mediante un software que recoge durante un determinado tiempo (minutos) los fotones emitidos por la muestra, clasificándolos según su energía. El espectro se presenta como un histograma en donde el eje de las X tiene unidades de energía (Kiloelectrovolts) y el eje de las Y el Número de cuentas o intensidad. En el espectro se realiza de forma automática la identificación y el análisis cualitativo y cuantitativo de los diferentes elementos a través de picos en la campana de Gauss observados en el histograma. En una muestra se elige uno o varios sitios de interés para ver si toda la muestra contiene los mismos elementos o hay variación de estos en un cm^2 .

Una vez obtenido el espectro, se identifican los elementos en los picos de un histograma espectral de un punto elegido de la muestra.

CAPÍTULO

10

Bibliografía

1. **Hayat, M.** *Fixation for Electron Microscopy*. s.l. : Academic Press, 1981.
2. **López, M.L.** *Serie Científica Avanzada: El Microscopio Electrónico*. s.l. : Centro de Extensión Biomédica Facultad de Medicina Universidad de Chile, 2003.
3. *Ciencia De Los Materiales: Microscopia Electrónica De Barrido*. **Etal, Víctor Poblete P.M. Pilleux C.** Universidad de Chile- Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas : s.n., 2001.
4. **group, Oxford Instrument microanalysis**. Link ISIS operator's guide. *Oxford instruments (UK). Limited microanalysis group*. England, UK : s.n., 1997. Vol. I, pp. 1-14.
5. **J., De Palacios y Carvajal.** "*Bases biomecánicas y metalúrgicas de los implantes utilizados en cirugía ortopédica y traumatológica*". Madrid : Editorial Garsi, 1979.
6. **Hobo S, Ichida E y García L.T.** "*Osteointegración y rehabilitación oclusal*". Tokio, Japón : Quintessence Publishing Co., 1997.
7. **Welz B., Sperling M.** *Atomic Absorption Spectrometry, 3rd edition*. s.l. : Wiley-VCH, 1999.
8. <http://chem.ch.huji.ac.il/history/wollaston.html>. [Online]
9. <http://www.elmundo.es/elmundo/2009/06/01/ciencia/1243875330.html>. [Online]
10. **Douglas A. Skoog, F. James Holler, Donald M. West.** *Fundamentos de química analítica*. s.l. : Reverte, 1997.

11. **Frederic Walton Harnold, Harold F. Walton, J Reyes.** *Análisis químico e instrumental moderno.* s.l. : Reverte, 1983.
12. **Jack Cazes, Galen Wood Ewing.** *Ewing's analytical instrumentation handbook.* s.l. : CRC Press, 2004.
13. *Which technique Should I use?* United Kingdom : s.n., 2001, Thermo Elemental, pp. 2-10.
14. <http://www.pandeo.com/cache.asp?IDRes=463>. [Online]
15. **Bouguer, Pierre.** *Essai de optique sobre la gradación de la lumière.* 1729.
16. **Robertson, J J O'Connor and E F.** <http://www-groups.dcs.st-andrews.ac.uk/history/Biographies/Lambert.html>. [Online]
17. **Isidore Singer, Edgar Mels.** <http://www.jewishencyclopedia.com/view.jsp?letter=B&artid=505>. [Online]
18. http://es.wikipedia.org/wiki/Unidades_de_Planck. [Online]
19. **Olsen, Eugene D.** *Métodos ópticos de análisis.* s.l. : Reverte, 2003.
20. <http://www1.us.es/pautadatos/publico/personal/pdi/1790/14326/12%20-%20ABSORCI%20AT%20MICA%2006-07.pdf>. [Online]
21. http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_absorcin_atmica. [Online]
22. **Slavin, W.** *Graphite Furnace AAS-A.* Norwalk, Conneticut : s.n., 1984.
23. *Aluminium homeostasis in man.* **Skalsky, Harry L. and Carchman, Richard A.** 6, 1983, International Journal of Toxicology, Vol. 2, pp. 405-423.
24. *Interaction of Metal (III) –adenosine-5-triphosphate complexes with hexoquinasa.* **Viola RE, Morrison JF, Cleland WW.** 1980, Biochemistry, Vol. 19, pp. 3131-3137.
25. *Aluminium, hot water tanks and neurobiology.* **S., Brenner.** 1989, Lancet, Vol. 1, pp. 781-782.
26. *Aluminium bone content in patients undergoing renal haemodialysis. In Recent Developments in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology.* **Fernández MD, De Francisco ALM, Garrido JC, Aguayo FJ, Alvarez C.** 1992, Irving Sunshine, pp. 639-642.
27. *El aluminio en la insuficiencia rena lcrónica, hemodiálisis y trasplante renal.* **De Francisco ALM, Fernández MD, Ordóñez R, Álvarez C, Cotorruelo JG, Arias M, Sousa F, Llamazares C.** 1983, Nefrología, Vol. 3, pp. 96-99.
28. *Screening plasma aluminium levels in relation to aluminium bone disease among asymptomatic dialysis patients.* **Kausz AT, Antonsen JE, Hercz G, Pei Y, Weiss NS, Emerson S, Sherrard DJ.** 1999, American Journal of Kidney Diseases, Vol. 34, pp. 688-693.

29. *The Clinical impact of aluminium overload in renal failure.* **Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL.** 2002, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Vol. 17, pp. 9-12.
30. **González M, García de Jalón A, Calvo ML, Zapatero MD, Escanero JF.** Serum aluminium: its relation with anemia and iron metabolism in uraemic patients on intermittent haemodialysis program. *Metals Ions in Biology and Medicine.* s.l. : John Libbey, 1992, Vol. 2, pp. 215-219.
31. *Aluminium.* **Habs H, Simon B, Thiedemann KU, Howe P.** 1997. United Nation Environment Programme. International Labour Organisation World Health Organisation. International Programme on Chemical Safety report 194.
32. *Infant formula as a cause of aluminium toxicity in neonatal uremia.* **Freundlich M, Silleruelo G, Arbitol C, Strauss J, Faugere M, Malluche HH.** 1985, Vol. ii, pp. 527-539.
33. *Excretion and retention of low o moderate levels o aluminium by human subjects.* **Greger JL, Baier MJ.** 1983, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 21, pp. 473-477.
34. *Bioavailability of Aluminium.* **Fleming LW, Prescott A, Stewart WK, Cargill RW.** 1989, *Lancet*, Vol. 2, p. 433.
35. *Aluminium in the environment and human health.* **Sorenson JRJ, Campbell IR, Tepper LB, Lingg RD.** 1974, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 8, pp. 3-95.
36. **Berman, E.** *Toxic Metals and Their Analysis.* London : Heyden & Sons, 1980.
37. *Variability in reported plasma Al-concentrations.* **R., Cornelis.** Luxembourg : s.n., 1982. International Workshop on the Role of Biological Monitoring in the Prevention of Aluminium Toxicity in Man "Aluminium Analysis un Biological Fluids".
38. *Current Biological Monitoring Practices fot the Prevention of Dialysis Encephalopathy.* **Ward MK, Parkinson IS.** Luxembourg : s.n., 1982. International Workshop on the Role of Biological Monitoring in the Prevention of Aluminium Toxicity in Man "Aluminium Analysis un Biological Fluids".
39. *Measurement of Aluminium in clinical samples.* **Taylor A, Walker AW.** 1992, *Annals of Clinical Biochemistry*, Vol. 29, pp. 377-389.
40. **Savory J, Wills MR.** Analytical Techniques for the analysis of Aluminium. [book auth.] H. J. Gitelman. *Aluminum and Health: A Critical Review* . New York : Marcel Dekker, 1989, pp. 1-26.
41. *Kinetic fluorimetric determination of aluminium in serum.* **Ioannou PC, Piperaki EA.** 1986, *Clinical Chemistry*, Vol. 32, pp. 1481-1483.
42. *Quality Assurance for Aluminium Analysis.* **Berlin A, Mattiello G, Taylor A.** Copenhague : s.n., 1987. Trace Elements in human health and disease, WHO Environmental Health report 26. pp. 37-38.
43. *Aluminio sérico y función renal normal: efecto de la edad y de la exposición ambiental al aluminio.* **Fernández JL, Macho M, Gómez E, Díaz B, Sanz-Medel A, Cannata JB.** 1989, *Revista Clínica Española*, Vol. 185, pp. 388-390.

44. *Aluminio: toxicidad y aspectos metabólicos*. **MD., Fernández**. 1992, Rev Quim Clin, Vol. 11, pp. 399-408.
45. **P., Chapuis**. *Médecine et Biologie*. Paris : s.n., 1990.
46. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **B.V., L'vov**. 1990. Vol. 5, p. 163.
47. —. **V., L'vov B.** 1990. Vol. 5, p. 167.
48. *Spectrochimica Acta*. **B.V., L'vov**. 1996. Vol. B 51, p. 535.
49. **M., Lamoureux**. *Spectrochimica Acta Part B*. 1995, Vol. 50, pp. 1847-1867.
50. *Shadow spectral filming : a method of investigating electrothermal atomization I. Dynamics of formation and structure of the absorption layer of thallium, indium, gallium and aluminium atoms*. **Gilmudtinov, A.Kh., Zakharov, Yu.A., Ivanov, V.P.** 7, 1991, Journal of analytical atomic spectrometry, Vol. 6, pp. 505-519. ISSN 0267-9477 .
51. *Shadow spectral filming : a method of investigating electrothermal atomization II : Dynamics of formation and structure of the absorption layer of aluminium, indium and gallium molecules*. **Kh. Gilmudtinov, Yu.A. Zakharov, VP Ivanov, AV Voloshin, K Dittrich.** 4, 1992, Journal of analytical atomic spectrometry , Vol. 7, pp. 675-683. ISSN 0267-9477.
52. *Digital imaging of atomization processes in electrothermal atomizers for atomic absorption spectrometry*. **Chuni L. Chakrabarti, Albert K. Gilmudtinov, J. Craig Hutton**. 1993, Analytical Chemistry, Vol. 65, pp. 716-723.
53. **B.V., L'vov**. *Spectrochimica Acta Part B*. 1993, Vol. 48, pp. 1633-1993.
54. **Kantar T., Bazur L., Pungor E. y Winefordner J.D.** *Spectrochimica Acta Part B*. 1983, Vol. 38, p. 581.
55. **Motzfeldt K., Steinmo M.** Polyteknin Forlag. 1973, Vol. 2.
56. *Improved electrothermal determination of aluminum in serum by atomic absorption spectroscopy*. **FR Alderman, HJ Gitelman**. 1980, Clinical Chemistry, Vol. 26, pp. 258-260.
57. **N., De Baets**. *Licentiaatsthesis, Rijksuniversiteit Gent* . Belgium : s.n., 1978.
58. *The aluminum content of human serum determined by atomic absorption spectroscopy with a graphite furnace*. **O., Oster**. 1981, Clinica Chimica Acta, Vol. 114, pp. 53-60.
59. *Aluminum transfer during hemodialysis*. **Kaehny WD, Alfrey AC, Holman RE, Shorr WJ**. 1977, Kidney Int , Vol. 12, pp. 361–365.
60. **E., Verhaeven**. *Licentiaatsthesis, Rijksuniversiteit Gent*. 1981.
61. *Determination of aluminium in blood plasma or serum by electrothermal atomic absorption spectrometry*. **Gardiner P. E., Ottaway J. M., Fell G. S., Halls D. J.** 1981, Analytica Chimica Acta , Vol. 128, pp. 57-66.

62. *Trace metal changes in dialysis fluid and blood of patients on hemodialysis.* **Salvadeo A, Minoia C, Segagni S, Villa G.** 1979, *The International journal of artificial organs*, Vol. 2, pp. 17-21.
63. *The determination of aluminium in human-plasma.* **Wawschinek O., Petek W., Lang J., Pogglichsch H, Holzer H.** 1982, *Mikrochim Acta*, Vol. 1, pp. 335-339.
64. *Serum aluminium levels in patients on peritoneal dialysis.* **Gilli P, Farinelli A, Fagioli F, De Bastiani P, Buoncristiani U.** 1980, *Lancet*, Vol. II, pp. 742-743.
65. *Die Analyse von Aluminium im Serum und Urin zur Überwachung exponierter Personen.* **Valentin H, Preusser P, Schaller KH.** 1976, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, Vol. 38, pp. 1-17.
66. *Aluminium toxicity during regular haemodialysis.* **Elliot HL, Dryburgh F, Fell GS, Sabet S, MacDougall AI.** 1978, *British Medical Journal*, Vol. I, pp. 1101-1103.
67. *Aluminum, zinc and copper concentrations in plasma in chronic renal insufficiency.* **Zumkley H, Bertram HP, Lison A, Knoll O, Losse H.** 1979, *Clinical Nephrology*, Vol. 12, pp. 18-21.
68. *Dosage de l'aluminium dans les liquides biologiques par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite.* **Clavel JP, Jaudon MC, Galli A.** 1978, *Annales de Biologie Clinique*, Vol. 36, pp. 33-38.
69. *Determination of aluminum in biological samples by atomic absorption spectrophotometry with a graphite furnace.* **Gorsky JE, Dietz AA.** 1978, *Clinical Chemistry*, Vol. 24, pp. 1485-1490.
70. *Dosage de l'aluminium dans les liquides biologiques par absorption atomique sans flamme.* **Y., Pegon.** 1978, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 101, pp. 385-391.
71. *Aluminium-Bestimmung im Serum mit Flammenloser Atomabsorption.* **Fuchs C., Brasche M., Paschen K.** 1974, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 52, pp. 71-80.
72. *Osteomalacic dialysis osteodystrophy: Evidence for a Water-borne aetiological agent, probably aluminum.* **Ward MK, Feest TG, Ellis HA, Parkinson IS, Kerr DNS, Herrington J, Goode GL.** 1978, *Lancet*, Vol. I, pp. 841-845.
73. *Determination of aluminum in blood, urine, and water by inductively coupled plasma emission spectrometry.* **Allain P., Mauras Y.** 1979, *Analytical Chemistry*, Vol. 51, pp. 2089-2091.
74. *Direktbestimmung von Aluminium in Serumproben mittels Inductively Coupled Plasma (ICP)-Emissionsspektralanalyse.* **Schramel P., Wolf A., Klose B. J.** 1980, *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*, Vol. 18, pp. 591-593.
75. *Comportamiento dell'alluminio plasmatico e urinario in soggetti professionalmente esposti.* **Alessio L., Mussi I., Calzaferrri G., Buratti M.** Cagliari : s.n., 1983. IV Convegni sulla Patologia da Tossici Ambientali ed Occupazionali. pp. 285-292.

76. *Sampling conditions for biological fluids for trace elements monitoring in hospital patients: A critical approach.* **Pineau A, Guillard O, Chappuis P, Arnaud J, Zawislak R.** 1993, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Vol. 30, pp. 203-222.
77. *Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine.* **Cornelis R, Heinzow B, Herber RFM, Molin Christensen J, Poulsen OM, Sabbioni E, et al.** 1996, *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, Vol. 10, pp. 103-127.
78. **MD., Zapatero González.** *Niveles de aluminio sérico en la población de Zaragoza: Estudio transversal y factores relacionales.* Universidad de Zaragoza. 1994. Tesis Doctoral.
79. *Serum aluminium levels in Alzheimer's disease and other senile dementias.* **Zapatero MD, García de Jalón A, Pascual F, Calvo ML, Escanero JF, Marro A.** 1994, *Biological Trace Element Research*, Vol. 47, pp. 235-239.
80. *Human exposure to metals: some factors influencing the metal concentration.* **Torra M, Rodamilans M, Corbella J.** 2002, *Trace Elements and Electrolytes*, Vol. 19, pp. 192-196.
81. *Measuring aluminium in serum and tissues: overview and perspectives.* **De Broe ME, Van der Vyver FL, Silva FJE, D'Haese PC, Verbueken AH.** 1986, *Nefrologia*, Vol. 6, pp. 41-46.
82. *Measurement picogram amounts of aluminium in biological tissue by flameless atomic absorption analysis of chelate.* **LeGendre GR, Alfrey AC.** 1976, *Clinical Chemistry*, Vol. 22, pp. 53-56.
83. **Philip J, Metcalfe J, Philip D, Fiona M, Garstang M, Kenneth C, Hodge, Ackrill P.** The determination of aluminium in bone. [book auth.] Savory J. Brown SS. *Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals.* : Academic Press New York, 1983, pp. 53-56.
84. *Hiperalbuminemia osteomalacia due to aluminium toxicity.* **Boyce BF, Fell G, Elder HY.** 1982 : s.n., *Lancet*, pp. 1009-1113.
85. *Nanocrystalline Hydrogen Absorbing Mg-Ni Alloy Processed by Mechanical (ball) milling.* **J Bystrzycki, T Czujko, RA Varin, D Oleszak, J Bystrzycki, T. Durejko, W. Darlewski, Z. Bojar and W. Przetaliwicz.** s.l. : Advanced Study Center Co. Ltd., Julio 25, 2003, *Reviews on Advanced Materials Science*, pp. 450-454.
86. **J. J. Thomson, 44, 293 (1897).** 1897, *Philosophical Magazine*, Vol. 44, p. 293.
87. **Davisson, C. J.** 1927, *Nature*, Vol. 119, p. 558.
88. **J. J. Thomson, G. P. Thomson.** 1927, *Nature*, Vol. 119, p. 890.
89. **Broglie, De.** 1924, *Philosophical Magazine*, Vol. 47, p. 446.
90. **Busch, H.** 1926, *Annalen der Physik*, Vol. 81, p. 974.
91. **Ruska, M. Kndl and E.** 1932, *Annalen der Physik*, Vol. 12, p. 607.
92. **f., Zeit.** 1931, *Phy*, Vol. 12, p. 389.

93. **L. Morton, Hnn. Bull.** Bruselas : s.n., 1934, Soc. Roy Med. Nat. , Vol. 92, p. 106.
94. **Love, V.D. Scott & G.** *Quantitative Electron-Probe Microanalysis*. s.l. : Ellis Horwood Ltd., 1983.
95. **J.I. Goldstein, et al.** *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York : Plenum, 1992.
96. **Nixon, W.** *History and Early Developments of the Scanning Electron Microscopy*. Mexico : XIV, 1998.
97. **Breton, B.C.** *The Early History and Development of the Scanning Electrón Microscope*. Cambridge University Engineering Department : s.n., 2004.
98. **Kimoto, S.** *The Scanning Microscope as a System*. s.l. : Jeol Ltd., 1985.
99. **LEO.** *The New Force in Electrón Microscopy*. UK : LEO Electron Microscopy Ltd., 1995.
100. **Optics, FEI Electron.** *Todo lo que quiso saber sobre la Microscopía Electrónica*. 1990. 90-9007555-3.
101. *Remote Microscopy in the Real World*. al., **B.C. Breton et.** s.l. : Microscopy and Analysis, Septiembre 1997.
102. *Making SEMs Smarter*. al., **N.H.M. Caldwell et.** s.l. : Microscopy and Analysis, Noviembre 1996.
103. *Introduction to Scanning Electron Microscopy*. **Nixon, W. C.** [ed.] Patrocinado por IIT Research Institute. 1969. Proceedings of and Annual Scanning Electron Microscopy Symposium.
104. "Multidireccionalidad de las varillas del esmalte. Estudio al Microscopio Electrónico de Barrido (S.E.M). Implicancias Clínicas. **Belloni F, Lazo G, Durso G, Lazo S Ivanov M. Abal A, Tanevich A, Pazos F, Perez P.** Facultad De Odontología. Argentina : s.n.
105. **Robey PG, Bianco P, Termine JD.** Disorders of Bone and Mineral Metabolism. s.l. : Ed. Frederic. Coe and Murray J. Favus, 1992, 11.
106. **GR., Mundy.** Bone Remodeling and its Disorders. Segunda. London : Martin Dunitz Ltd., 1999.
107. **Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A.** Histología y Embriología Bucodental. Madrid : Ed. Médica Panamericana S.A., 1999.
108. *Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolted hepatocytes exposed to hypoxia o mitochondrial toxins.* **Carini R, Autelli R, Bellomo G, Dianzani MU, Albano E.** 1995, Biochim Biophys Res comun, Vol. 206, pp. 180-185.
109. *Glycine protect aganinst hepatocyte killing by KCN or hipoxia by preventing intracellular Na+ overload in the rat.* **Carini R, Bellomo G, De Cesaris MG, Albano E.** 1997, Hepatolgy, Vol. 26, pp. 107-112.
110. *Alterations of Na+ homeostasis in hepatocyte reoxygenation injuri.* **Carini R, de Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Bellomo G, Albano E.** 2000, Biochim Biophys Acta, pp. 297-305.

111. *Scanning electron microscopy an X-ray microanalysis*. **Goldstein JI, Roming AD, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Fiore C, Joy DC Lifshin E**. New York : s.n., 1992, Plenum Press.
112. *X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology*. **Romans GM, Von Euler A**. 1996, Cell Biol Int , pp. 103-109.
113. *Quantitative elemental analysys of individual micro particles with electron beam instruments*. **JY, Armstrong**. New York : Heinrich KFJ and Newbury DE EDX, 1991, Plenumm Press, pp. 261-315.
114. *Preparation of biological samples for transmission X-ray microanalysis: a review of alternative procedures to the use of sectioned material*. **DC, Sigg**. 1988, Scanning Micros, pp. 925-935.
115. *Mineralization of human premolar occlusal fissures. A quantitative histochemical microanalysis*. **Campos A, Rodríguez IA, Sanchez-Quevedo MC, García JM, Nieto-Albano OH, Gomez de Ferraris ME**. April 2000, Histol Histopathol, pp. 499-502.
116. *Dentine structure and mineralization in hypocalcifies amelogenesis imperfecta: a quantitative X-ray histochemical study*. **Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Luna JD, Rodríguez IA, Campos A**. Marz 2004, Oral Dis, pp. 94-98.
117. *Evaluation in vitro bioactivity and biocompatibility of Bioglass (R)-reinforced polyethylene composite*. **Huang J, Silvio LD, Wang M, Rehman I, Ohtsuki C, Bonfield W**. 1997, Mater Sci Mater Med, pp. 809-813.
118. *Elemental analysis and clinicak implications ol calcification deposits associated with silicone breast implants*. **Raso DS, Greene WB, Kalasinsky VF, Riopel MA, Luke JL, Askin FB, Silverman JF, Young VL**. Feb 1999, Ann Plast Surg, pp. 117-123.
119. *Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tamtalum and rhenium*. **Matsuno H, Yokohama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T**. 2001, Biomaterials, pp. 1253-1262.
120. *In vitro corrosion behavior of bioce- ramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants*. **Fathi MH, Salehi M, Saatchi A, Mortazavi V., Moosavi SB**. 2003, Dent Mater , pp. 188-198.
121. *X-ray microanalysis of airway surface liquid collected in cystic fibrosis mice*. **Zahm JM, Baconnais S, Davidson DJ, Webb S, Dorin J, Bonnet N, Balossier G, Puchelle E**. 2001, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, pp. 309-313.
122. *Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases*. **Ramonet D, Pugliese M, Rodríguez MJ, de Yebra L, Andrade C, Adroer R., Ribalta T, Mascort J, Mahy N**. Paris : s.n., 2002, J. Physiol, pp. 307-312.
123. *Detection and qualitative identification of mineral fibers and particles in alveolar macrophages of BAL fluid by SEM and EDXA*. **F, Perna, et al**. 2002, Monaldi Arch Chest Dis, pp. 193-195.

124. *Beryllium detection in human lung tissue using electron probe X-ray microanalysis*. **Butnor KF, Sporn TA, Ingram P, Gunasegaram PS, Pinto JF, Roggli VL**. 2003, *Mod Pathol*, pp. 1171-1177.

125. **Etal, Víctor Poblete P.M. Pilleux C.** "*Microscopia Electrónica De Barrido*". s.l. : Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2001.

FUENTES CONSULTADAS

Carlos A. Toledo, Raquel Varela. *40 años del microscopio electrónico de barrido*. Laboratorio Central de Criminalística, Zulueta No.465 Ciudad Habana, Cuba. Facultad de Ingeniería Eléctrica, ISPJAE.Habana, Cuba. Trabajo presentado en el V Congreso de Microscopía Electrónica. Habana- Cuba 2005.

cbe.ivic.ve/ftp/confhfm/confhfmarg99.ppt

<http://sociedadunefm.tripod.com/id4.html>

Seminario ID42A, Ciencia de los Materiales II, "Microscopía de Barrido", **Víctor Poblete P., Mauricio Pilleux C.**, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas (IDIEM).

http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido

http://www.cedex.es/lceym/eq_labce/eq_cmmeb.html

<http://www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm#MEB>

<http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/sem.htm>

<http://www.hiperbiologia.net/microscopia/meb.htm>

<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S04.htm#ch4>.

Schrenk, W.G. *Applied Spectroscopy*. 40 (1), XIX, 1986.

Slavin, M. *Atomic Absorption Spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York. 1978.

Van Loon, J.C. *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy*. Academic Press, New York. 1980.

Welz, B. *Atom-Absorptions Spektroskopie*. Verlag Chemie, Weinheim. 1983.

<http://www.iaca.com.ar/>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_de_absorc%C3%B3n_at%C3%B3mica_\(AA\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_de_absorc%C3%B3n_at%C3%B3mica_(AA))

http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_absorc%C3%B3n_at%C3%B3mica

Hollas, M. J. "*Modern Spectroscopy*" Ed. J. Wiley, New York (1987).

Morcillo, J. y Orza, J. M. "*Espectroscopia, Estructura y Espectroscopia Atómica*" Ed. Alhambra, Madrid (1975).

Olsen, E. D. "*Métodos Ópticos de Análisis*" Ed. Reverté, Barcelona (1986).

Skoog, D. A. y West, D. M. "*Análisis Instrumental*" Ed. McGraw Hill, México (1989).

III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados Experimentales y Discusión

CAPÍTULO 11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	281
CAPÍTULO 12. BIBLIOGRAFÍA	321

Resultados Experimentales y Discusión

CAPÍTULO 11. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	281
11.1. RESULTADOS CLÍNICOS.....	281
11.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO SBF EN LOS IMPLANTES DE Ti6Al7Nb.	281
11.3. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LAS MUESTRAS POR ANÁLISIS DE ABSORCIÓN ATÓMICA.	292
11.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LAS MUESTRAS POR SEM. ENSAYOS DE LAS MUESTRAS POR ANÁLISIS EDX.....	294
11.5. RESULTADOS HISTOLÓGICOS DE LOS ENSAYOS DE LAS MUESTRAS.	309
11.6. DISCUSIÓN.....	311
11.7. CONCLUSIONES.....	317
CAPÍTULO 12. BIBLIOGRAFÍA	321

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Implantes de Ti6Al7Nb.	281
Ilustración 2. Composiciones evaluadas en el tratamiento SBF.....	282
Ilustración 3. De izq. a der. se muestra la superficie del Ti6Al7Nb y el patrón XRD.	283
Ilustración 4. Deposición después de 5 días de inmersión en la solución SBF modificada.	284
Ilustración 5. Deposición después de 10 días de inmersión en la solución SBF modificada.	284
Ilustración 6. Deposición después de 15 días de inmersión en la solución SBF modificada.	285
Ilustración 7. Polarización de curvas para una solución Ringer de pH=2.33.	285
Ilustración 8. Polarización de curvas para una solución Ringer de pH=7.10.	286
Ilustración 9. Polarización de curvas para una solución Ringer de pH=9.10.	286
Ilustración 10. Principales parámetros electroquímicos en la solución Ringer a 37°C.	286
Ilustración 11. Velocidad de corrosión en la solución Ringer a 37°C.	287
Ilustración 12. Expresión histoquímica de la fosfatasa alcalina en un cultivo de células osteoblásticas. ..	287
Ilustración 13. Resultados de los ensayos MTT para cultivo de células osteoblásticas a las 48 horas.....	288
Ilustración 14. Cultivo de control.	288
Ilustración 15. Monocapa celular en la interface para muestra inmersa en SBF después de 5 días.....	289
Ilustración 16. Monocapa celular en la interface para muestra inmersa en SBF después de 10 días.	289
Ilustración 17. Monocapa celular en la interface para muestra inmersa en SBF después de 15 días.	289
Ilustración 18. Muestra inmersa en SBF después de 5 días (observación en fluorescencia)	290
Ilustración 19. Muestra inmersa en SBF después de 5 días (observación en contraste-fase).....	290
Ilustración 20. Muestra inmersa en SBF después de 10 días (observación en fluorescencia)	290
Ilustración 21. Muestra inmersa en SBF después de 10 días (observación en contraste-fase).....	291
Ilustración 22. Muestra inmersa en SBF después de 15 días (observación en fluorescencia).	291
Ilustración 23. Muestra inmersa en SBF después de 15 días (observación en contraste-fase).....	291
Ilustración 24. Diagrama de barras.	293
Ilustración 25. Diagrama de líneas.....	293
Ilustración 26. Radiografía del implante: placa tibial y tornillos fabricados en Ti6Al7Nb.	294
Ilustración 27. Muestra hueso-tejido sometida a ensayo EDX.	295
Ilustración 28. Zona analizada, spectrum 1, correspondiente a la muestra hueso-tejido.	295
Ilustración 29. Zona analizada, spectrum 2, correspondiente a la muestra hueso-tejido.	296
Ilustración 30. Zona analizada correspondiente a la formación de tejido óseo.	297

Ilustración 31. Análisis interfaz hueso-implante en la zona de la punta mediante barrido de 1.5 mm. ...	298
Ilustración 32. Proporción de cada elemento en función de la zona de análisis.	298
Ilustración 33. Proporción de calcio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	299
Ilustración 34. Proporción de fósforo en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	299
Ilustración 35. Proporción de oxígeno en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	300
Ilustración 36. Proporción de carbono en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	300
Ilustración 37. Proporción de titanio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	300
Ilustración 38. Proporción de aluminio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	301
Ilustración 39. Proporción de niobio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	301
Ilustración 40. Análisis interfaz hueso-implante en la zona del tornillo mediante barrido de 1.5 mm. ...	302
Ilustración 41. Proporción de cada elemento en función de la zona de análisis (tornillo).	302
Ilustración 42. Proporción de fósforo en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	303
Ilustración 43. Proporción de aluminio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	303
Ilustración 44. Proporción de oxígeno en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	304
Ilustración 45. Proporción de carbono en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	304
Ilustración 46. Proporción de calcio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	304
Ilustración 47. Proporción de titanio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.	305
Ilustración 48. Análisis interfaz hueso-implante en la zona punta-placa mediante barrido de 1.5 mm. ..	305
Ilustración 49. Proporción de cada elemento en función de la zona de análisis (punta-placa).	306
Ilustración 50. Proporción de titanio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	307
Ilustración 51. Proporción de aluminio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	307
Ilustración 52. Proporción de niobio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	307
Ilustración 53. Proporción de calcio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	308
Ilustración 54. Proporción de fósforo en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	308
Ilustración 55. Proporción de oxígeno en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	308
Ilustración 56. Proporción de carbono en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.	309
Ilustración 57. Presencia de hueso en contacto con el implante en una muestra sin teñir.	309
Ilustración 58. Hueso mineral formado en contacto con el implante.	310

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición química de la aleación de Ti6Al7Nb.	282
Tabla 2. Residuos de Aluminio en distintos órganos del cerdo (mg/Kg).	292
Tabla 3. Composición química correspondiente al punto de análisis spectrum 1.	296
Tabla 4. Composición química correspondiente al punto de análisis spectrum 2.	296
Tabla 5. Composición química correspondiente al punto de análisis de la ilustración anterior.	297

CAPÍTULO

11

Resultados Experimentales y Discusión

11.1. Resultados clínicos.

Del total de 22 implantes colocados (dos implantes en cada animal, cada implante con un tratamiento distinto) se produjeron tres fracturas durante la fase experimental, de las cuales dos se pudieron recuperar mediante reducción y fijación de la fractura, y uno se perdió. Uno de los animales con la tibia fracturada, tuvo que ser reintervenido y, por tanto, se modificó la fecha de rescate del implante de acuerdo con esta última intervención. En los animales restantes no se manifestó clínica alguna.

11.2. Resultados de la evaluación del tratamiento SBF en los implantes de Ti6Al7Nb.

Cuando se implanta en vivo una superficie bioactiva, se forma una capa de hidroxiapatita que se adhiere químicamente a esta superficie bioactiva y actúa como una capa intermedia entre el nuevo hueso y el implante. En general, las aleaciones sin tratamientos no son bioactivas pero se utilizan como material implantable debido a su biocompatibilidad y buenas propiedades mecánicas.



Ilustración 1. Implantes de Ti6Al7Nb.

En esta Tesis se ha pretendido mejorar la osteoinducción y la bioactividad de los implantes, mediante la aplicación de dos tratamientos superficiales, en aras de facilitar la unión ósea *in vivo*, uno de ellos completamente novedoso.

Por este motivo, se ha estudiado la interacción entre una superficie biocompatible artificial expuesta a un cultivo celular. La superficie biocompatible fue preparada por la deposición de soluciones similares al plasma sanguíneo (soluciones SBF), con el objetivo de obtener recubrimientos de hidroxiapatita a nivel nanoescalar. El sustrato para recubrimientos consistió en una aleación de Ti6Al7Nb. El potencial citotóxico manifestado por recubrimientos tipo de hidroxiapatita se determinó a partir de un cultivo celular de osteoblastos.

Al	Nb	Ta	O2	N2	C	Fe	Ti
5.5 – 6.5	6.5 – 7.5	max. 0.5	max. 0.2	max. 0.05	max. 0.08	max. 0.25	rest

Tabla 1. Composición química de la aleación de Ti6Al7Nb.

Este nuevo tratamiento, denominado SBF (synthetic or simulated body fluids), presenta la ventaja de inducir la formación de apatita (recubrimiento de hidroxiapatita) en los metales, y otros materiales, inmersos en soluciones que simulan los fluidos biológicos (Ringer, Earl, Hanks). La innovación de este tratamiento se encuentra en el uso de partículas biovitrocerámicas como sustitutas.

Con el objetivo de demostrar la viabilidad de este tratamiento en aplicaciones médicas, se evaluó *in vitro* mediante su aplicación a los implantes objeto de esta Tesis.

	Blood plasma	Ringer	EBSS	HBSS
Na ⁺	142.0	130	143.5	142.1
K ⁺	5.0	4.0	5.37	5.33
Ca ²⁺	2.5	1.4	1.8	1.26
Mg ²⁺	1.5	-	0.8	0.9
Cl ⁻	103.0	109.0	123.5	146.8
HCO ₃ ⁻	27.0	-	26.2	4.2
HPO ₄ ²⁻	1.0	-	1.0	0.78
SO ₄ ²⁻	0.5	-	0.8	0.41
Ca / P	2.5	-	1.8	1.62
Buffer	-	-	-	-
pH	7.4	6.5	7.2÷7.6	6.7÷6.9

Ions	SBF
Na ⁺	142,0
K ⁺	5,0
Mg ²⁺	1,5
Ca ²⁺	2,5
Cl ⁻	147,8
HPO ₄ ²⁻	4,0
HCO ₃ ⁻	4,2
SO ₄ ²⁻	0,5
Buffer	Biovitroceramic

Ilustración 2. Composiciones evaluadas en el tratamiento SBF.

Antes de aplicar el tratamiento superficial de deposición de hidroxiapatita en los implantes, éstos fueron pulidos y arenados. El recubrimiento micro-nanocristalino de hidroxiapatita en dos pasos: inmersión en solución de NaOH más tratamiento térmico y inmersión en solución SBF con contenido adicional de PAW1 biovitrocerámico. El procedimiento fue el siguiente:

- Inmersión en una solución NaOH de -10 mol.
- Tratamiento térmico: 60 horas a 60 °C.
- Limpieza con agua destilada y alcohol.
- Tratamiento de densificación térmica: calentar desde 20 °C hasta 600 °C a una velocidad de 5 °C/min, mantener una hora a 600 °C y refrigerar en el horno; obtenemos una capa de titanato de sodio.

- Inmersión durante dos días en una solución SBF con partículas PAW1 biovitrocerámicas adicionales (partículas por debajo de 20 μm) a 36 $^{\circ}\text{C}$. la solución SBF fue preparada según los datos escritos por T. Kokubo.
- Inmersión en una solución 1.5 SBF (sin contenido biovitrocerámico) durante 19 días, refrigerándose la solución diariamente.

Para observar la deposición de hidroxiapatita en la superficie de los implantes de Ti6Al7Nb se emplearon diferentes intervalos de tiempo, de 5 a 15 días, y el equipo de microscopía electrónica de barrido con analizador EDX descrito en esta Tesis.

Los análisis de biocompatibilidad consistieron en ensayos *in vitro* de células osteoblásticas (cultivo de osteoblastos) cedidas por la Colección de Cultivos Tipo Americana (American Type Culture Collection). Las células osteoblásticas fueron cultivadas con una densidad inicial de $1 \times 10^4 \text{ cell}\cdot\text{cm}^{-2}$ en un medio que consiste en una mezcla 1:1 de Dulbecco's modified Eagle's medium y Ham's F12 medium conteniendo 0.3 mg/ml G418, 10% suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina and 100 g/ml estreptomycin, en una atmósfera húmeda y un 5% de CO_2 . Dependiendo de la temperatura de incubación, el cultivo celular puede mostrar características preosteoblásticas similares.

Los ensayos llevados a cabo fueron de dos tipos:

- *Expresión de la fosfatasa alcalina*, para confirmar que las células osteoblásticas pertenecen al fenotipo osteoblástico. Las células se fijaron en formol al 4% para inducir la reacción en presencia de sustrato NBT/BCIP.
- *Determinación del potencial citotóxico y la morfología de las células osteoblásticas* en diferentes intervalos de tiempo. Para la evaluación del potencial citotóxico, las células osteoblásticas fueron tratadas usando hipericina ($1\mu\text{M}$) para hacerlas fluorescentes. Los ensayos MTT fueron realizados en muestras preparadas mediante determinaciones espectrofotométricas.

Análisis del sustrato (aleación Ti6Al7Nb)

Los análisis de la superficie de los implantes a nivel microestructural, así como los patrones XRS se muestran a continuación.

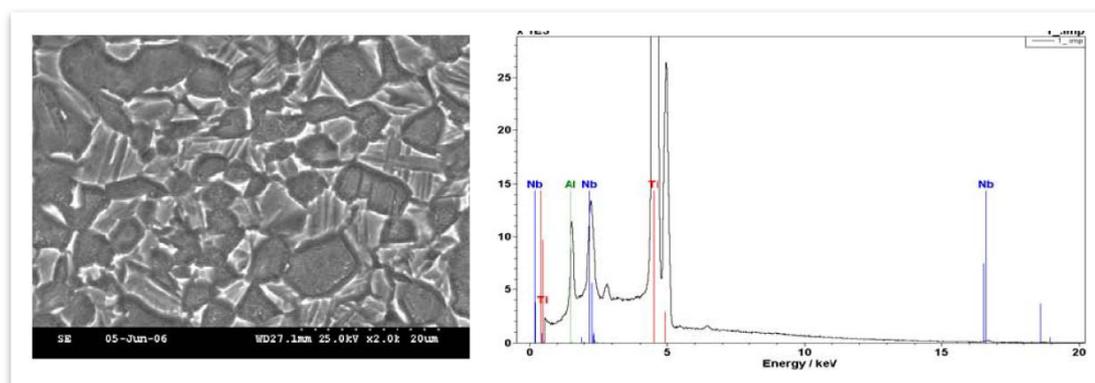


Ilustración 3. De izq. a der. se muestra la superficie del Ti6Al7Nb y el patrón XRD.

Resultados Experimentales y Discusión

En la imagen de la microestructura del Ti6Al7Nb se observan los granos primarios de la fase metaestable y en la gráfica se muestran los picos característicos de la aleación de Ti6Al7Nb.

Análisis de la deposición de capas de hidroxiapatita

En todos los implantes, los análisis se realizaron en todas las capas depositadas de hidroxiapatita. A continuación, se muestran los resultados más relevantes.

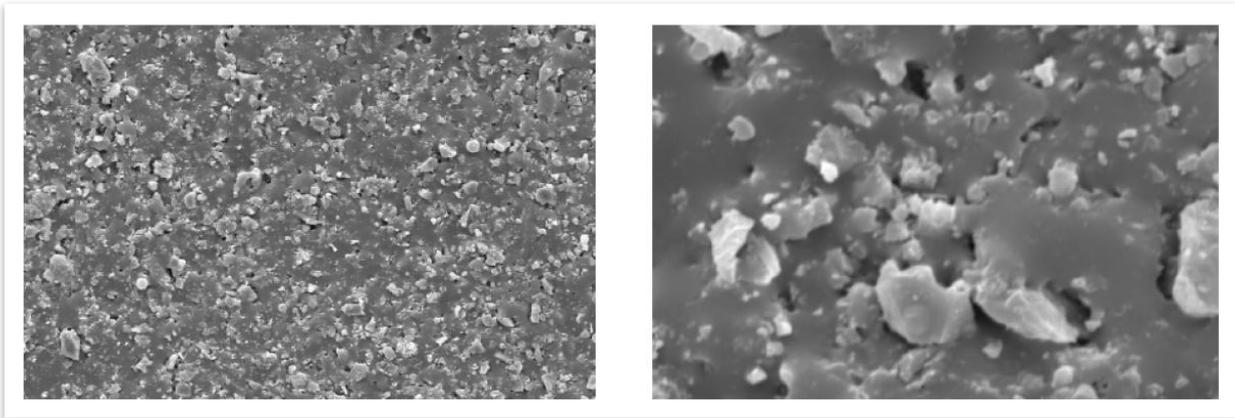


Ilustración 4. Deposición después de 5 días de inmersión en la solución SBF modificada.

Las muestras después de 5 días de inmersión en la solución SBF modificada presentan deposiciones fragmentadas, observándose superficies de longitudes hasta 10 μm y espesores hasta 1 μm . También se puede apreciar que las capas depositadas son homogéneas en lo relativo a los aspectos microscópicos y composicionales.

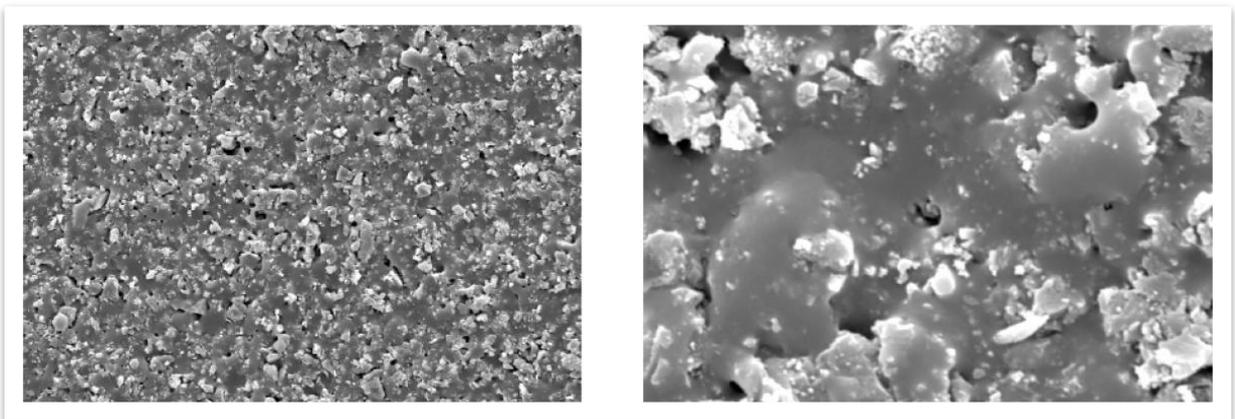


Ilustración 5. Deposición después de 10 días de inmersión en la solución SBF modificada.

En lo que respecta a las muestras después de 10 días de inmersión en la solución SBF modificada, se pueden observar deposiciones fragmentadas en la superficie, habiendo superficies de longitudes comprendidas entre 50- 100 μm y espesores de 1 a 10 μm , así como una red de poros interconectados. También se puede apreciar homogeneidad en la deposición de las capas.

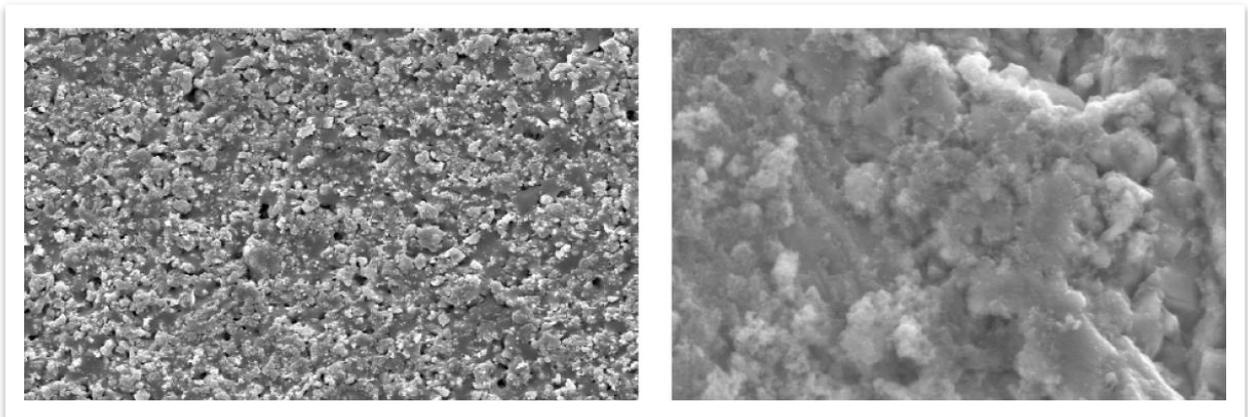


Ilustración 6. Deposición después de 15 días de inmersión en la solución SBF modificada.

Como se observa en la figura de la izquierda, se aprecia relativa homogeneidad en las capas depositadas, que incluyen algunos pequeños poros de 0.1- 2.0 μm . En la figura de la derecha se muestran zonas de núcleos de crecimiento de hidroxiapatita. El crecimiento de hidroxiapatita parece desarrollarse espontáneamente usando precursores biovitrocéramicos y también formación de iones de fósforo y calcio en la solución SBF. La deposición de hidroxiapatita tiene un aspecto cristalino similar al de las colonias de coral.

Ensayos de corrosión mediante uso de soluciones Ringer con distintos pH

En lo que respecta a los resultados preliminares de los tests de corrosión, los datos experimentales se muestran en las siguientes figuras.

Hay que destacar que los análisis de corrosión se han realizado bajo condiciones funcionales extremas, utilizando soluciones Ringer con diferentes pH (2.33, 7.1, 9.1). Esto es debido a que en cirugía el pH puede variar desde 5 hasta 2, la concentración de hidrógeno del tejido dañado puede aumentar y puede provocar una respuesta inflamatoria.

Las soluciones Ringer empleadas en los tests fueron: NaCl-6.8; KCl-0.4; CaCl₂-0.2; MgSO₄.7H₂O-0.2048; NaH₂PO₄.H₂O-0.143; NaHCO₃-2.2; glucosa-1 (el pH ácido fue obtenido con ayuda de HCl y su alcalino con ayuda de KOH) a 37 \pm 1°C.

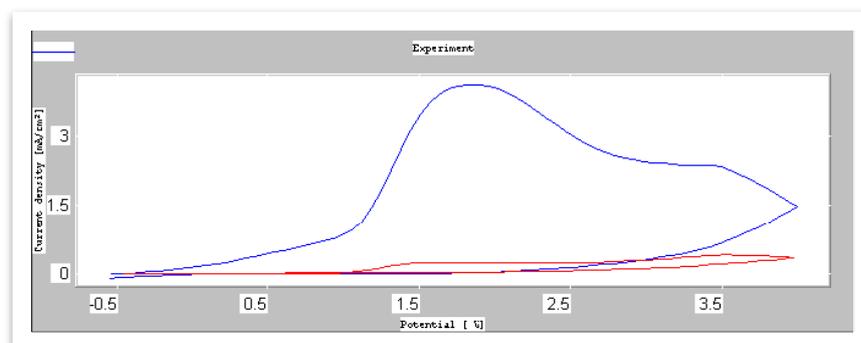


Ilustración 7. Polarización de curvas para una solución Ringer de pH=2.33.

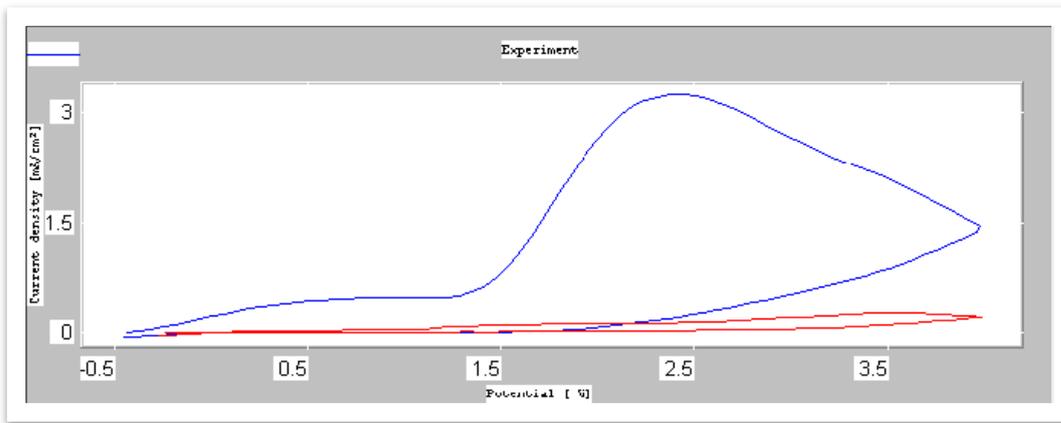


Ilustración 8. Polarización de curvas para una solución Ringer de pH=7.10.

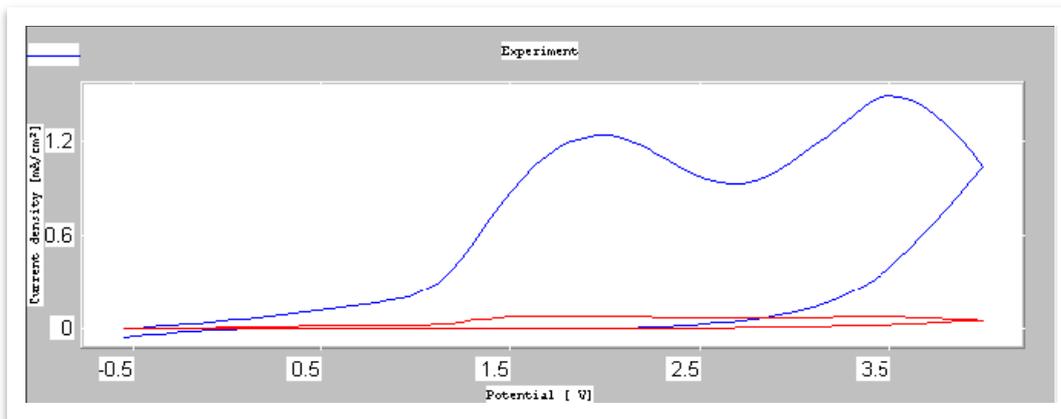


Ilustración 9. Polarización de curvas para una solución Ringer de pH=9.10.

En las ilustraciones anteriores, la curva de color azul representa la aleación Ti6Al7Nb y la curva de color rojo hace referencia a la misma aleación pero con recubrimiento de hidroxiapatita.

A continuación, se muestran dos tablas, una que indica los principales parámetros electroquímicos, y otra que muestra la velocidad de corrosión en la solución Ringer a 37 °C.

Aliaj	E_{corr} (mV)	E_p (mV)	ΔE_p (mV)	i_p ($\mu A/cm^2$)
pH = 2.33				
Ti6Al7Nb	-443.5	-443.5	> +4000	80
Ti6Al7Nb + HA	-412.0	-412.0	> +4000	8
pH = 7.1				
Ti6Al7Nb	-432.2	-432.2	> +4000	50
Ti6Al7Nb + HA	-206.5	-206.5	> +4000	0.1
pH = 9.1				
Ti6Al7Nb	-439.2	-439.2	> +4000	50
Ti6Al7Nb + HA	-461.2	-461.2	> +4000	9

Ilustración 10. Principales parámetros electroquímicos en la solución Ringer a 37°C.

pH	Aliaj	R_p ($k\Omega \cdot cm^2$)	i_{corr} ($\mu A/cm^2$)	V_{corr} ($\mu m/an$)	Ion release
2.33	Ti6Al7Nb	18.19	0.44	5.33	541.5
	Ti6Al7Nb + HA	58.42	0.15	1.86	188.9
7.1	Ti6Al7Nb	72.89	0.30	3.71	376.9
	Ti6Al7Nb + HA	207.78	0.11	1.36	138.2
9.1	Ti6Al7Nb	15.43	0.59	7.18	819.6
	Ti6Al7Nb + HA	46.19	0.21	2.55	259.1

Ilustración 11. Velocidad de corrosión en la solución Ringer a 37°C.

Evaluación de la biocompatibilidad mediante ensayos in vitro

Los resultados referentes a la expresión de la fosfatasa alcalina confirman que las células osteoblásticas pertenecen al fenotipo osteoblástico. La imagen tomada por microscopía revela reacción histoquímica positiva.

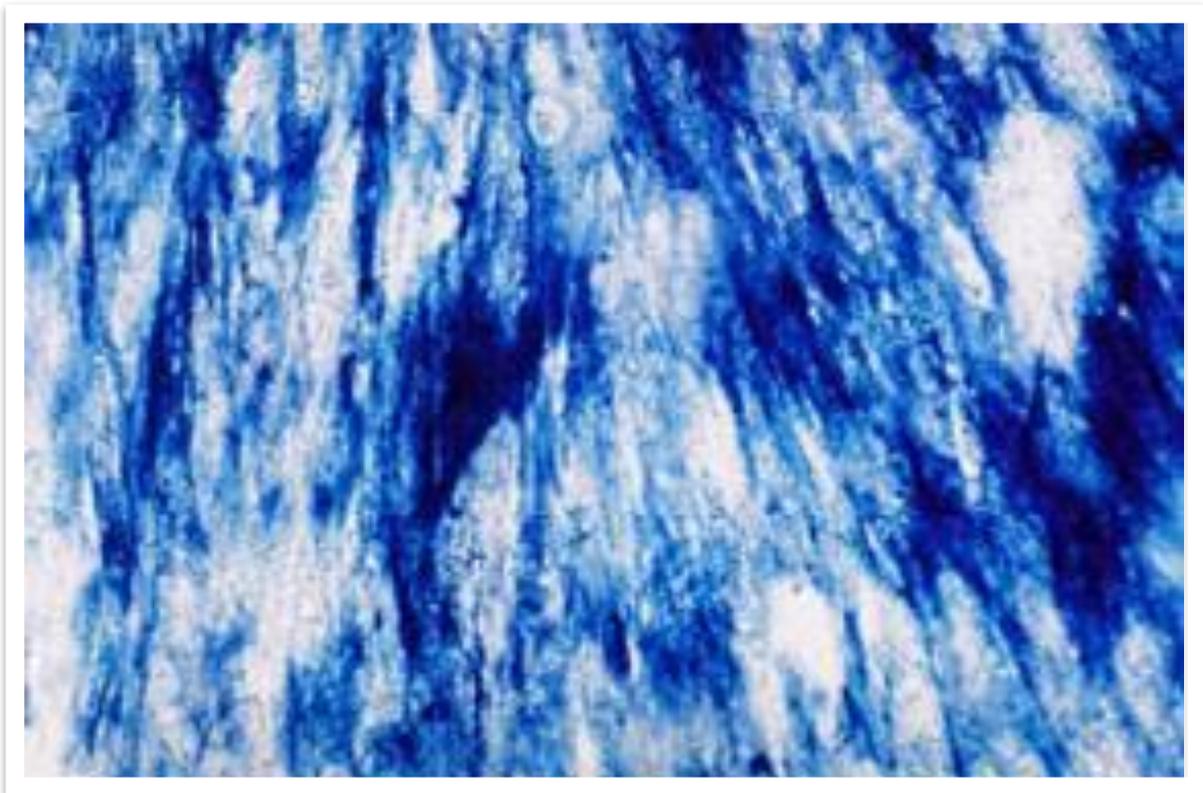


Ilustración 12. Expresión histoquímica de la fosfatasa alcalina en un cultivo de células osteoblásticas.

El potencial citotóxico del material estudiado muestra la viabilidad y proliferación de las células. Los tests MTT fueron realizados comparativamente en el microscopio fase-contraste y en el microscopio por fluorescencia. Los resultados espectrofotométricos dan una función de la absorbancia (concentración coloreada) frente al número de células metabólicas activas del cultivo. Los resultados se muestran en la siguiente ilustración para el cultivo de control y las muestras inmersas después de 5, 10 y 15 días en una solución SBF.

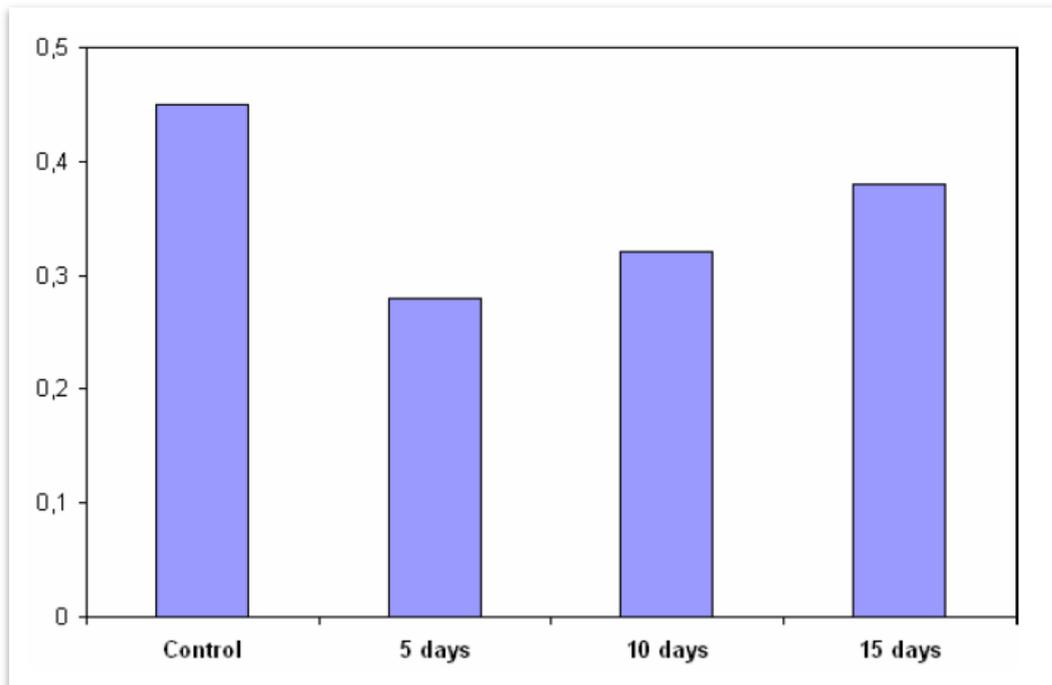


Ilustración 13. Resultados de los ensayos MTT para cultivo de células osteoblásticas a las 48 horas.

La citomorfología osteoblástica fue observada en dos intervalos, a las 24 y a las 48 horas del inicio del experimento. Se pueden observar cambios en la citomorfología de los osteoblastos en el microscopio fase-contraste, como se muestra en las figuras 49, 50 y 51. Para apreciar los cambios inducidos en el material, en la figura a se muestra la citomorfología osteoblástica en el cultivo de control, en un sustrato epoxi, después de 24 horas.

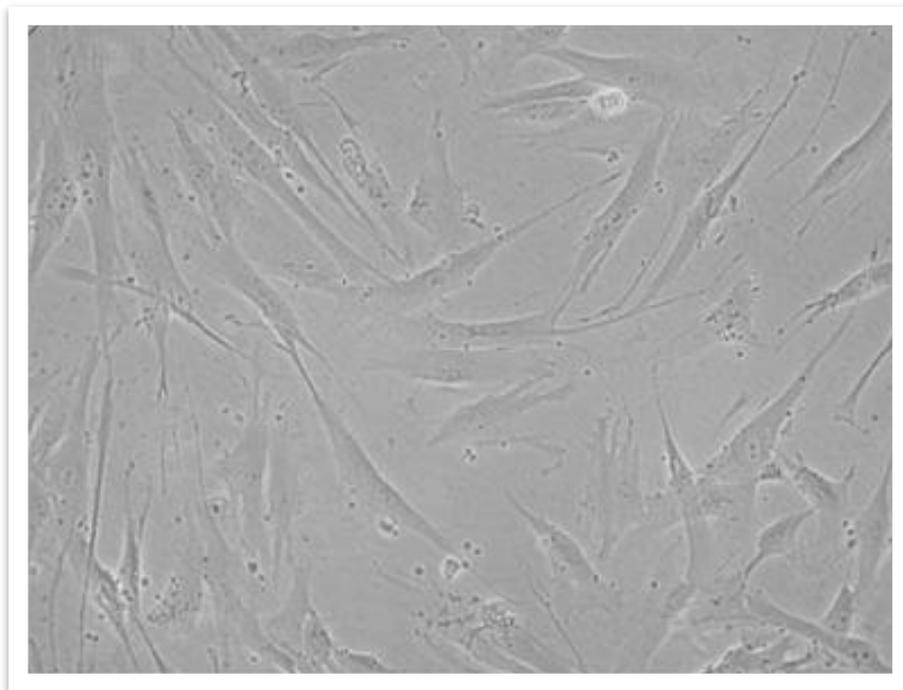


Ilustración 14. Cultivo de control.

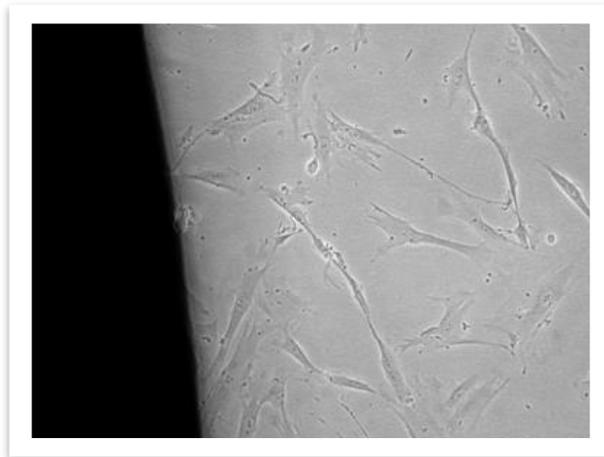


Ilustración 15. Monocapa celular en la interface para muestra inmersa en SBF después de 5 días.

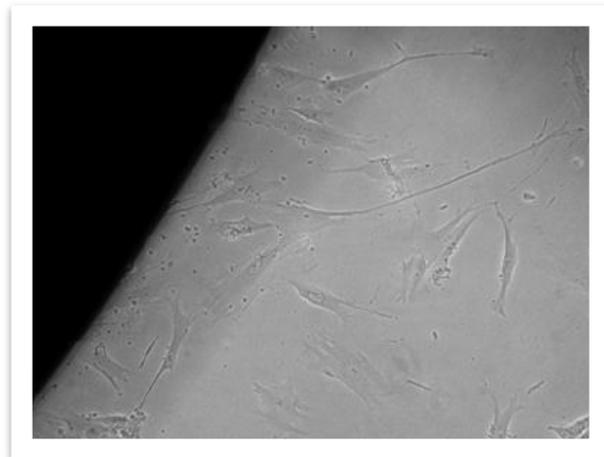


Ilustración 16. Monocapa celular en la interface para muestra inmersa en SBF después de 10 días.

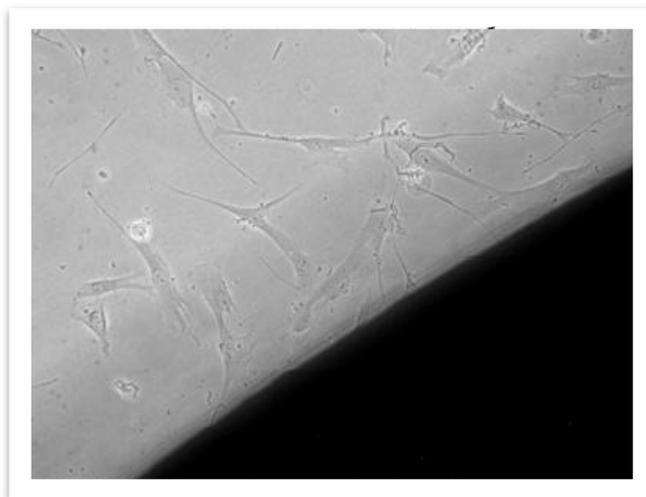


Ilustración 17. Monocapa celular en la interface para muestra inmersa en SBF después de 15 días.

Resultados Experimentales y Discusión

A continuación, se muestra una comparativa de la citomorfología osteoblástica en un microscopio de fluorescencia y en un microscopio contraste-fase después de 48 horas desde el inicio del cultivo.

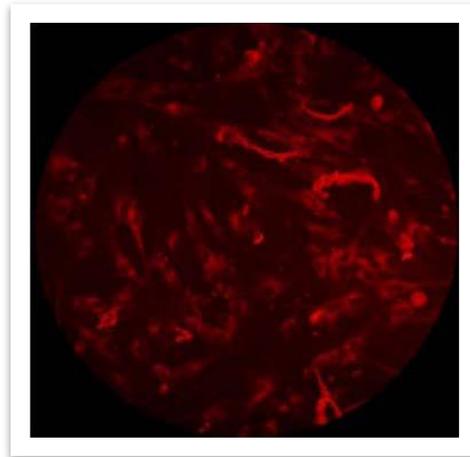


Ilustración 18. Interfaz de una muestra inmersa en SBF después de 5 días; células observadas en fluorescencia.



Ilustración 19. Interfaz de una muestra inmersa en SBF después de 5 días; células observadas en contraste-fase.

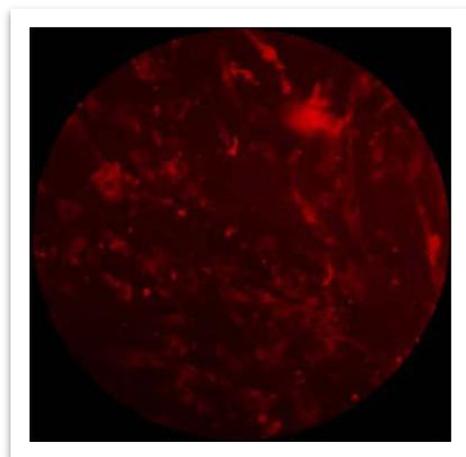


Ilustración 20. Interfaz de una muestra inmersa en SBF después de 10 días; células observadas en fluorescencia.

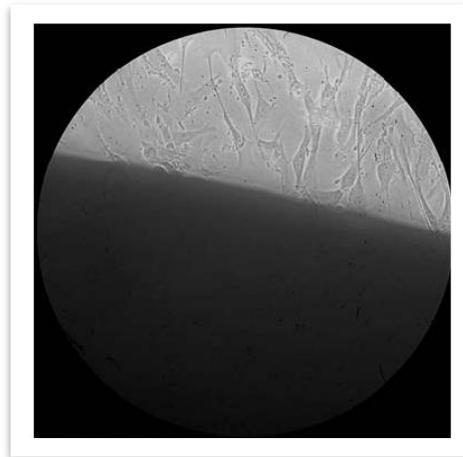


Ilustración 21. Interfaz de una muestra inmersa en SBF después de 10 días; células observadas en contraste-fase.

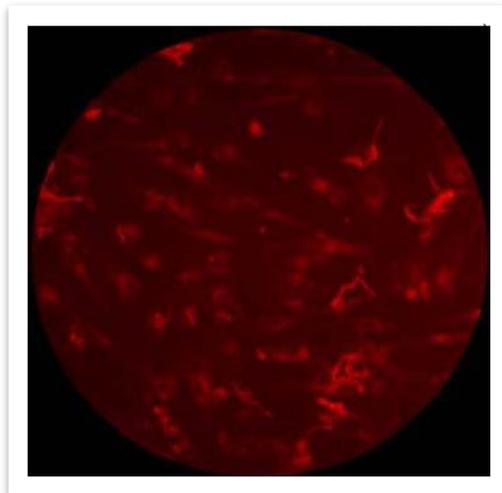


Ilustración 22. Interfaz de una muestra inmersa en SBF después de 15 días; células observadas en fluorescencia.

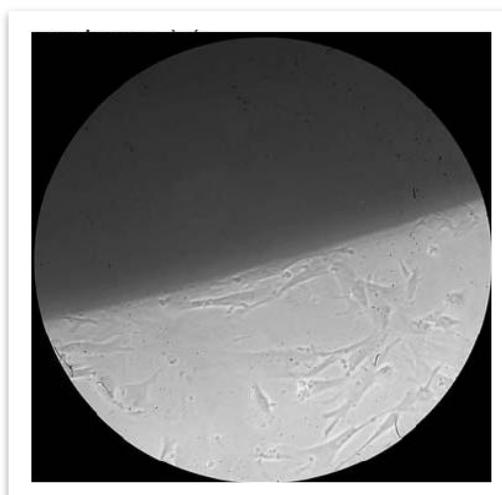


Ilustración 23. Interfaz de una muestra inmersa en SBF después de 15 días; células observadas en contraste-fase.

11.3. Resultados de los ensayos de las muestras por análisis de absorción atómica.

Uno de los objetivos de esta Tesis, ha sido evaluar la toxicidad de la placa metálica implantada, cuya aleación es Ti6Al7Nb, mediante la determinación de la concentración de aluminio por absorción atómica en los distintos órganos de los animales de experimentación, incluido el blanco, que se tomará como referencia para comparar los resultados.

En la tabla 1, se observan los niveles de aluminio que presentan los animales con implantes y el animal sin implante (blanco) en los diferentes órganos. Tras determinar los valores medios, máximos y mínimos se llega a la conclusión de que la contaminación que puede provocar el aluminio de los implantes por estar en contacto con el hueso es despreciable, si se compara con los niveles de aluminio encontrados en el pienso alimenticio. Para ello se puede observar la diferencia que existe entre los niveles de concentración de aluminio en el hígado de los animales implantados, escogiendo el valor medio de 22 mg/kg, y el nivel de aluminio del hígado del blanco (cerdo sin implante), de valor 23 mg/kg, ambos similares, lo cual nos demuestra que no ha habido influencia.

IDENTIFICADOR	CEREBRO (mg/kg)	GRASA (mg/kg)	RIÑÓN (mg/kg)	BAZO (mg/kg)	HÍGADO (mg/kg)
7	17,2	1,3	28,3	28,9	18,3
13	19,1	1,5	26,3	28	22,4
15	19,6	<1	22,4	28,5	17,8
17	22	<1	21	26,2	17,9
18	18,9	<1	28,1	25,4	19,9
24	24	<1	28	26,3	23,8
25 (Sin Tratar)	23,8	<1	23,9	28,5	23,4
26	17	<1	23,3	26,5	22,2
27	23,5	<1	29	21	24,3
34	22,6	<1	29	26,2	21,7
MEDIA	20,77	1,085	25,93	26,55	21,37
MAX.	24	1,55	29	28,9	25,4
MIN.	17	1	21	21	17,8
DESV.TÍP.	2,57955423	0,1789553	2,85308605	2,18323155	2,62604265
C.V. PEARSON	0,12419616	0,16493576	0,11003031	0,08223094	0,12288454
CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO EN EL PIENSO: 120 mg/kg					
CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO EN HÍGADO DE CERDO LOCAL: 44.8 mg/kg					

Tabla 2. Residuos de Aluminio en distintos órganos del cerdo (mg/Kg).

Un aspecto que llama bastante la atención y que se desprende de este estudio, reside en que los valores obtenidos de la concentración de aluminio en los distintos órganos eran muy altos. Esto se debió principalmente a la alimentación de los cerdos, dado que los niveles de aluminio del pienso eran de 120 mg/kg, es decir, muy altos.

No obstante, con el objetivo de tener otro dato comparativo, se seleccionó un cerdo de granja, se sacrificó en el matadero municipal de la isla y se analizó su hígado, dando una concentración de Al de 44.8 mg/kg, bastante superior a los estudiados.

Esta diferencia aclara mucho los datos y nos ofrece conclusiones muy importantes sobre la influencia insignificante que supone la migración de iones de aluminio debida al implante, comparadas con la ingestión diaria de este elemento.

En la ilustración 24, se exponen los resultados obtenidos en el análisis en un diagrama de barras, donde se puede observar cómo varía la concentración de aluminio en cada órgano (mg/Kg) en función de cada cerdo.

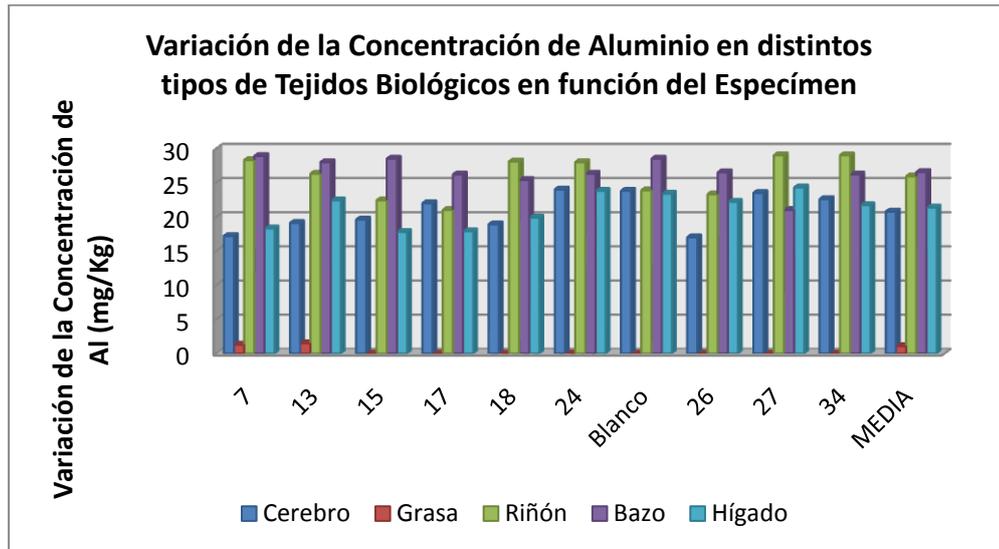


Ilustración 24. Diagrama de barras.

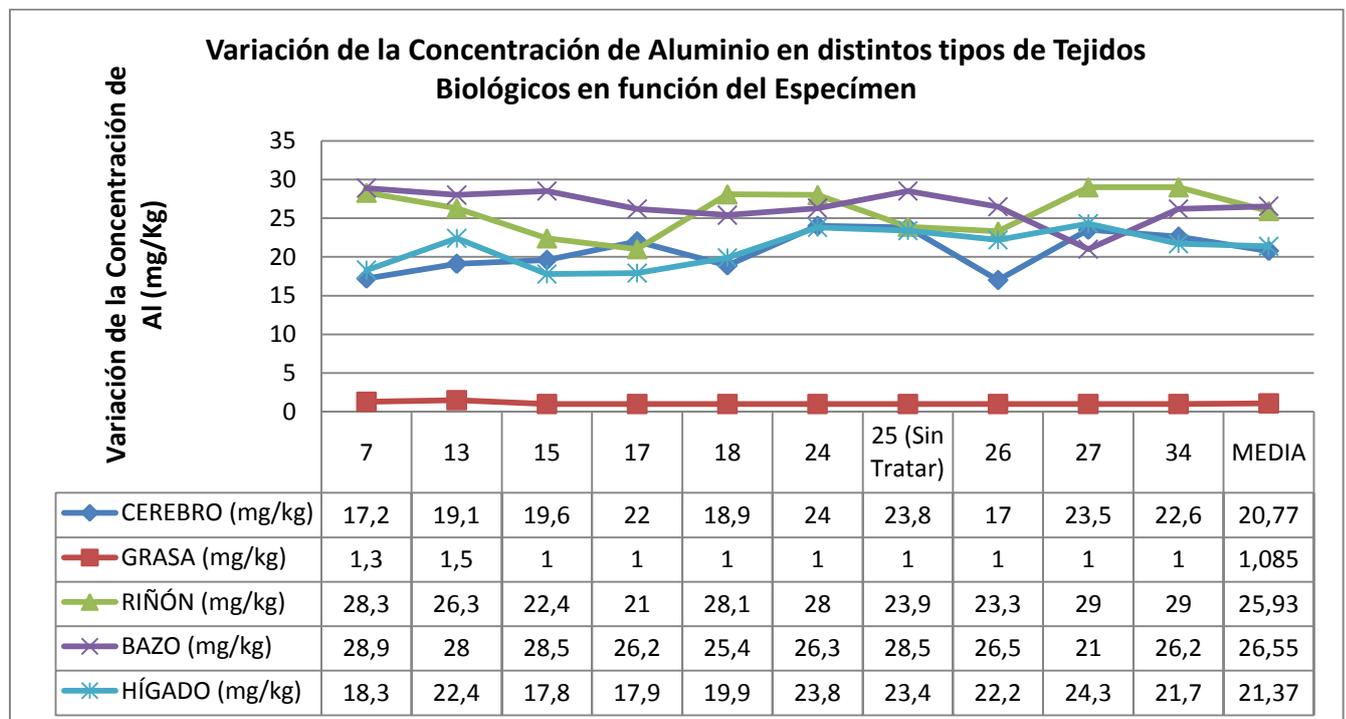


Ilustración 25. Diagrama de líneas.

Los resultados de esta variación se exponen también en el diagrama de líneas que se muestra en la ilustración 25.

En ambas gráficas no se aprecian variaciones significativas, pero como conclusiones derivadas directamente de los datos, se desprenden que los valores de la concentración de aluminio en los distintos órganos no superan los 30 mg/kg y que los niveles de aluminio en la grasa son menores a 1mg/kg.

11.4. Resultados de los ensayos de las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM). Ensayos de las muestras por análisis EDX.

Las muestras de hueso-implante rescatadas de los animales de experimentación y preparadas adecuadamente¹, se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido con analizador EDX, con el objetivo de estudiar la interfaz entre el implante y el hueso desde el punto de vista de la osteointegración, osteoinducción y el grado de toxicidad² que pudiera darse tras implantarlo en el cuerpo humano. Por tanto, se trata de demostrar que un material no soluble sin contenido en calcio y fósforo, como es el caso de la aleación Ti6Al7Nb, puede ser un material óseo inductivo siempre que su superficie se trate para tener una microestructura y nanoestructura adecuada.



Ilustración 26. Radiografía del implante: placa tibial y tornillos fabricados en Ti6Al7Nb.

La composición química de la materia prima³ a partir de la cual se mecanizaron los implantes reúne todos los requisitos para su aplicación en clínica implantológica.

Esta técnica nos permite generar imágenes composicionales con la finalidad de observar materiales inorgánicos presentes en el material orgánico, es decir, el microanálisis químico realizado permite obtener el porcentaje en peso de la composición química elemental en forma semi-cuantitativa. De

¹ Proceso descrito en el capítulo II de esta Tesis, relativo a las Técnicas Aplicadas.

² Posible existencia de otros elementos, como el aluminio, capaces de migrar a otras partes del cuerpo.

³ Aleación Ti6Al7Nb.

esta manera podemos averiguar también si existen elementos en la interfaz hueso-implante, no comunes en el organismo humano, que podrían tener un alto potencial tóxico, como el aluminio.

En la siguiente figura se observa una imagen ampliada de lo que sería una muestra de hueso-tejido, a la que sometimos a un ensayo de difracción por rayos X para comprobar la composición del material en las diferentes zonas. En este caso se puede observar perfectamente en la imagen dos partes bien diferenciadas, una zona lisa que corresponde a la parte de tejido y una parte más abrupta que parece haber sido arrancada dejando al descubierto ciertas protuberancias pertenecientes a una formación ósea.

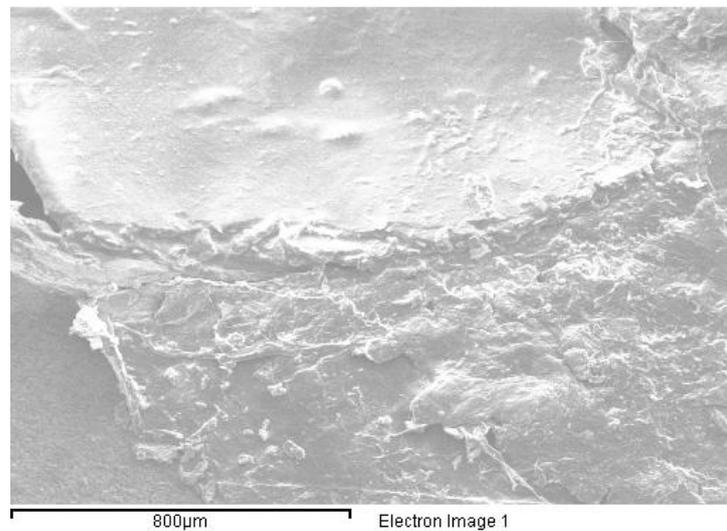


Ilustración 27. Muestra hueso-tejido sometida a ensayo EDX.

En esta muestra, se toman dos medidas correspondientes a las distintas zonas (spectrum 1 y spectrum 2) para obtener la composición química de los elementos e identificar cada zona, asegurando que corresponden realmente a la parte del hueso y la parte de tejido.

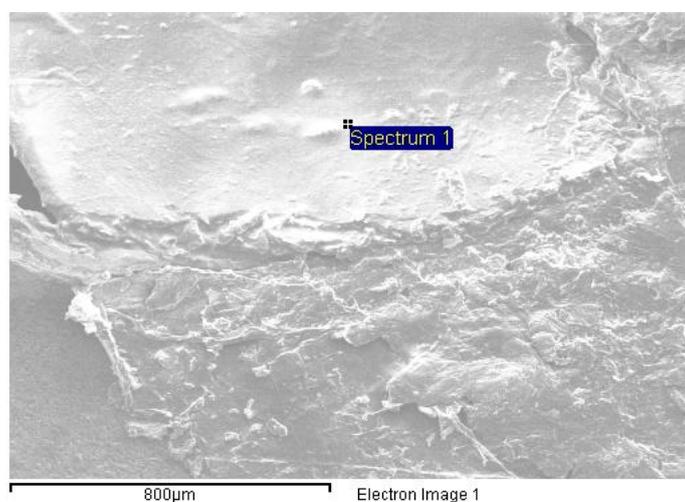


Ilustración 28. Zona analizada, spectrum 1, correspondiente a la muestra hueso-tejido.

Element	Weight %	Atomic %
C K	77.55	82.92
O K	20.50	16.45
P K	0.00	0.00
Ca K	1.96	0.63
Totals	100.00	

Tabla 3. Composición química correspondiente al punto de análisis spectrum 1.

En el punto analizado (Spectrum 1), la técnica utilizada nos permite identificar perfectamente la presencia de un tejido blanco (composición de carbono y oxígeno) sin formación de hueso. Como se puede ver en los resultados, no existe ninguna formación ósea, ya que los valores de fósforo y calcio son insignificantes o nulos.

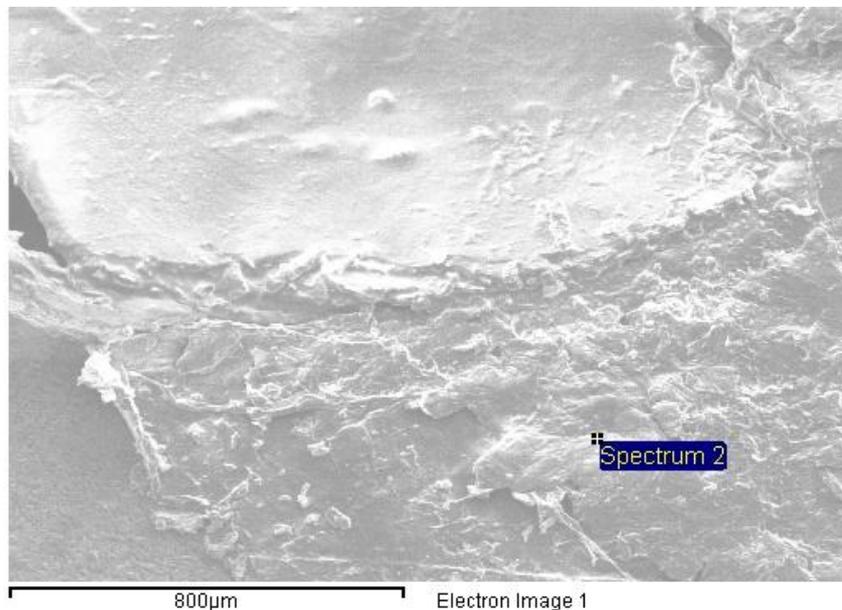


Ilustración 29. Zona analizada, spectrum 2, correspondiente a la muestra hueso-tejido.

Element	Weight %	Atomic %
C K	30.85	42.97
O K	42.62	44.56
Na K	1.35	0.98
P K	7.93	4.28
Ca K	17.25	7.20
Totals	100.00	

Tabla 4. Composición química correspondiente al punto de análisis spectrum 2.

En esta imagen donde analizamos el punto correspondiente al spectrum 2, se observa una serie de protuberancias sobre la superficie. Los resultados obtenidos, determinan una composición química

que identifica la presencia de calcio (Ca) y de fósforo (P). Para identificar la fase mineral de hidroxiapatita del hueso se necesita obtener la relación calcio/fósforo en la muestra y compararlo con el de hidroxiapatita, cuyo valor es — .

Este ratio se determinó mediante el cálculo del *background* o ruido de fondo del calcio y del fósforo por separado, sumando el valor bruto y neto de cada elemento en el espectro y dividiéndolo después por el valor bruto, para obtener así el valor (*pickbackground*) de cada elemento. Esta operación se repitió para cada zona de tejido analizada y se estableció una relación entre el calcio y el fósforo presente en dicho tejido para cada muestra (análisis semi-cuantitativo).

En nuestro caso la proporción — — está dentro de los valores admitidos lo que identifica la formación ósea en el punto analizado. La presencia de carbono y oxígeno es algo normal por ser los elementos principales de estructuras orgánicas.

Tomando una imagen más ampliada que las anteriores y analizando otro punto, también se observa unas proporciones de calcio/fósforo que entran dentro de los valores admitidos para tratarlo como formación ósea (—). Este punto entonces pertenece a la parte mineral del hueso lo que demuestra una buena osteoinducción del material.

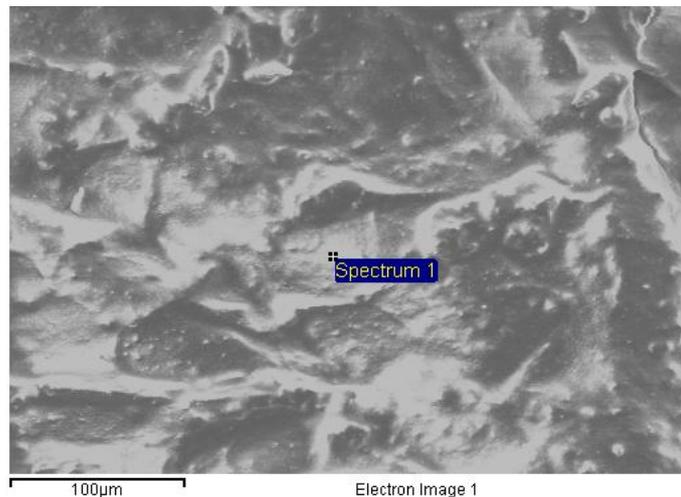


Ilustración 30. Zona analizada correspondiente a la formación de tejido óseo.

Element	Weight %	Atomic %
C K	55.56	66.33
O K	32.96	29.54
P K	0.19	0.09
Ca K	11.29	4.04
Totals	100.00	

Tabla 5. Composición química correspondiente al punto de análisis de la ilustración anterior.

Resultados Experimentales y Discusión

El análisis de la interfaz hueso-implante se llevó a cabo en distintas zonas de contacto entre el hueso y el implante: punta, tornillo y punta-placa.

En primer lugar, se analizó la punta mediante un barrido de 1.5 mm, recogiendo puntos de la parte ósea, de la interfase hueso-metal y del metal. Además, se examinó con detenimiento la interfase con el objetivo de averiguar si existe contaminación del metal en la estructura ósea-orgánica.

En esta imagen se muestra el análisis de una de las muestras que contiene parte de Ti-6Al-7Nb, concretamente la punta. Se pueden diferenciar perfectamente dos partes que corresponden a la zona metálica del implante y a la zona correspondiente al hueso y tejido orgánico.

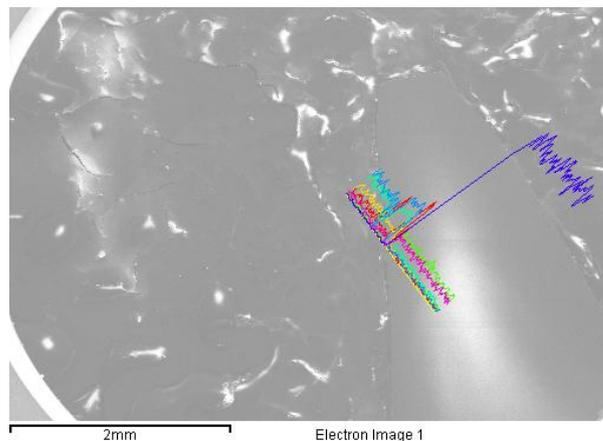


Ilustración 31. Análisis interfaz hueso-implante en la zona de la punta mediante barrido de 1.5 mm.

En este gráfico, que corresponde al barrido realizado en la muestra anterior, se determina la proporción de cada microelemento en la zona donde se encuentra.

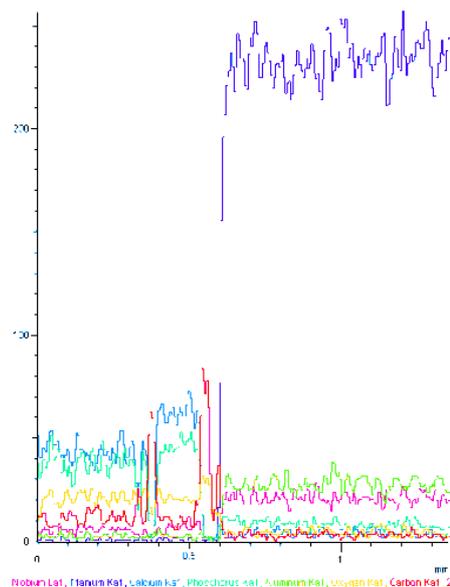


Ilustración 32. Proporción de cada elemento en función de la zona de análisis.

Para poder interpretar razonablemente los resultados obtenidos en el análisis de barrido, hay que diferenciar tres partes:

- **Zona 1:** Formación ósea (0 mm-0.5 mm).
- **Zona 2:** Interfase (0.5 mm-0.6 mm).
- **Zona 3:** Implante metálico (0.6 mm- 1.4 mm).

En la *Zona 1*, perteneciente a la formación ósea, la composición es principalmente calcio, fósforo, oxígeno y carbono. La *Zona 2* de la interfase hueso-metal contiene en su mayor parte carbono y oxígeno y la última zona, parte metálica, está formada por titanio, aluminio y niobio, como corresponde.

Los valores tan altos de carbono son debidos a la degradación que sufre el tejido orgánico durante el corte de la muestra.

Los gráficos que se presentan a continuación ofrecen información individual de los diferentes elementos que constituyen el barrido.

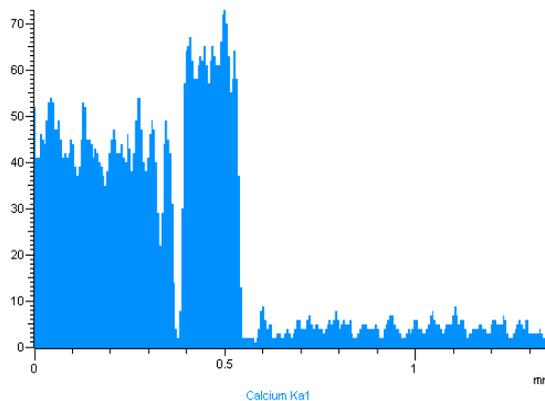


Ilustración 33. Proporción de calcio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

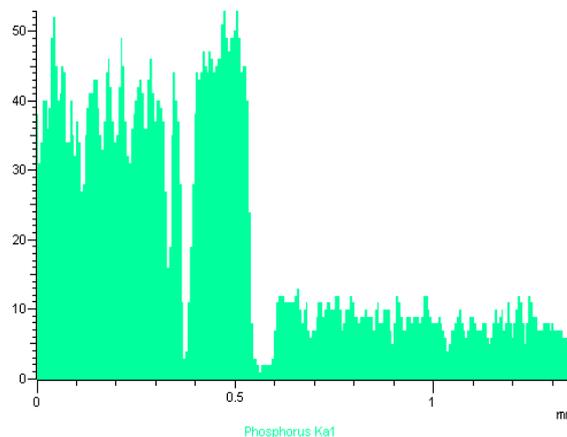


Ilustración 34. Proporción de fósforo en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

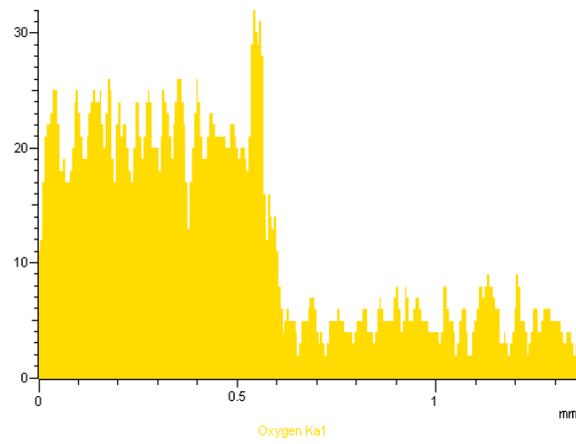


Ilustración 35. Proporción de oxígeno en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

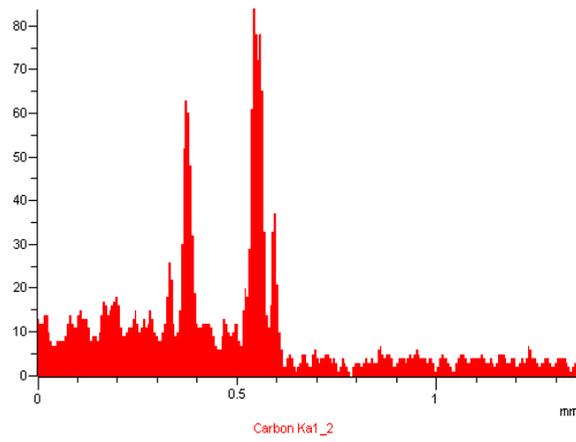


Ilustración 36. Proporción de carbono en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

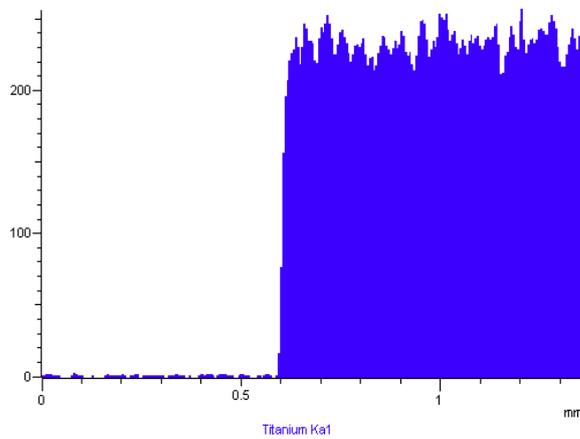


Ilustración 37. Proporción de titanio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

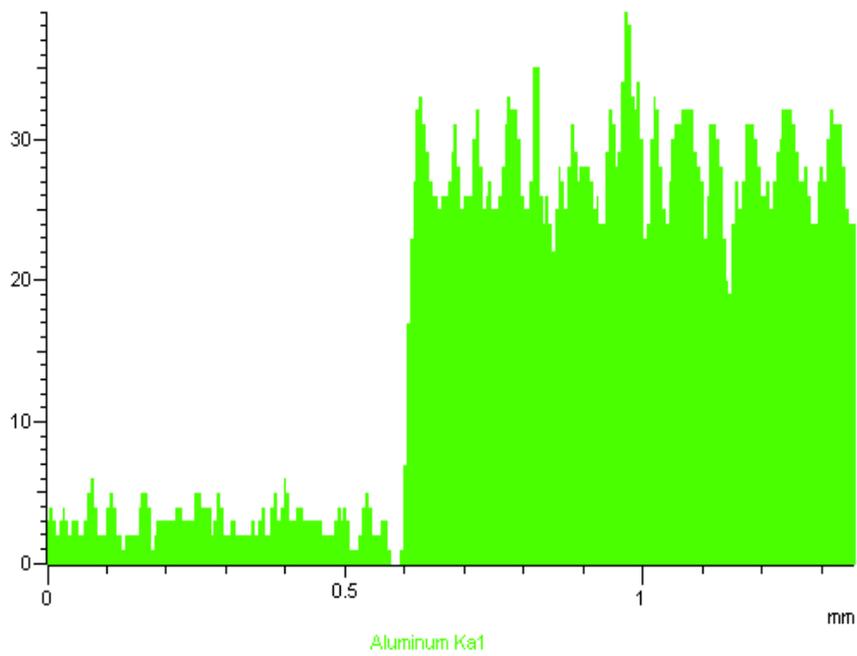


Ilustración 38. Proporción de aluminio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

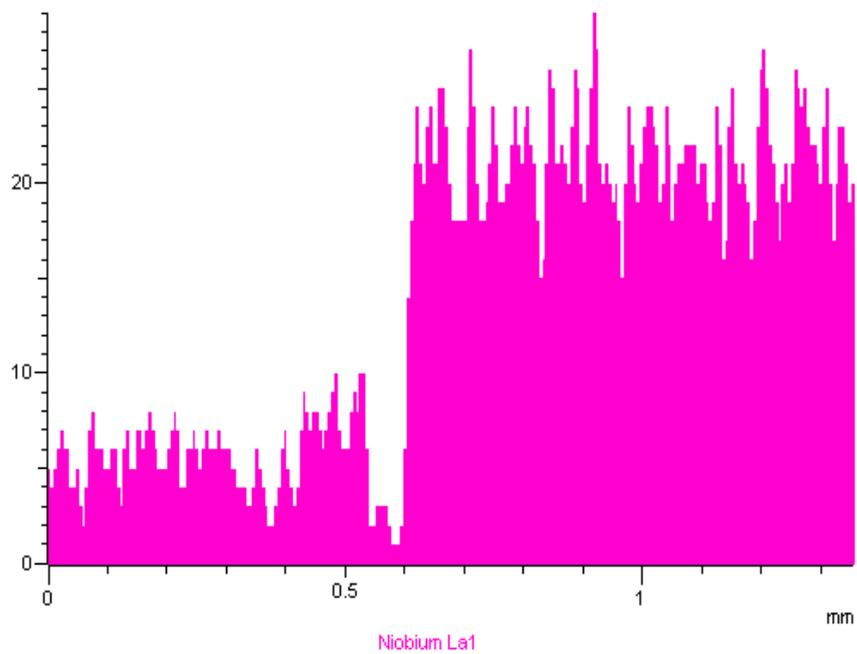


Ilustración 39. Proporción de niobio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

En segundo lugar, se analizó la zona del tornillo mediante un barrido de 1.5 mm, recogiendo puntos de la parte ósea, de la interfase hueso-metal y del metal. Igualmente que en el caso anterior, se examinó

con detenimiento la interfase con el objetivo de averiguar si existe contaminación del metal en la estructura ósea-orgánica.

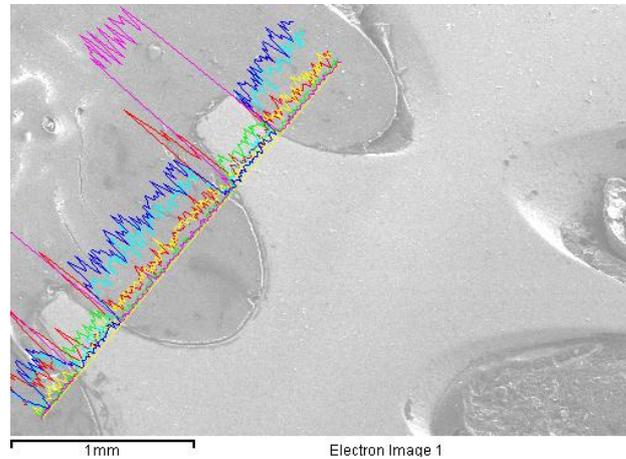


Ilustración 40. Análisis interfaz hueso-implante en la zona del tornillo mediante barrido de 1.5 mm.

De la misma manera, obtenemos la gráfica que corresponde al barrido realizado en la muestra anterior, determinando la proporción de cada microelemento en función de la zona donde se encuentra.

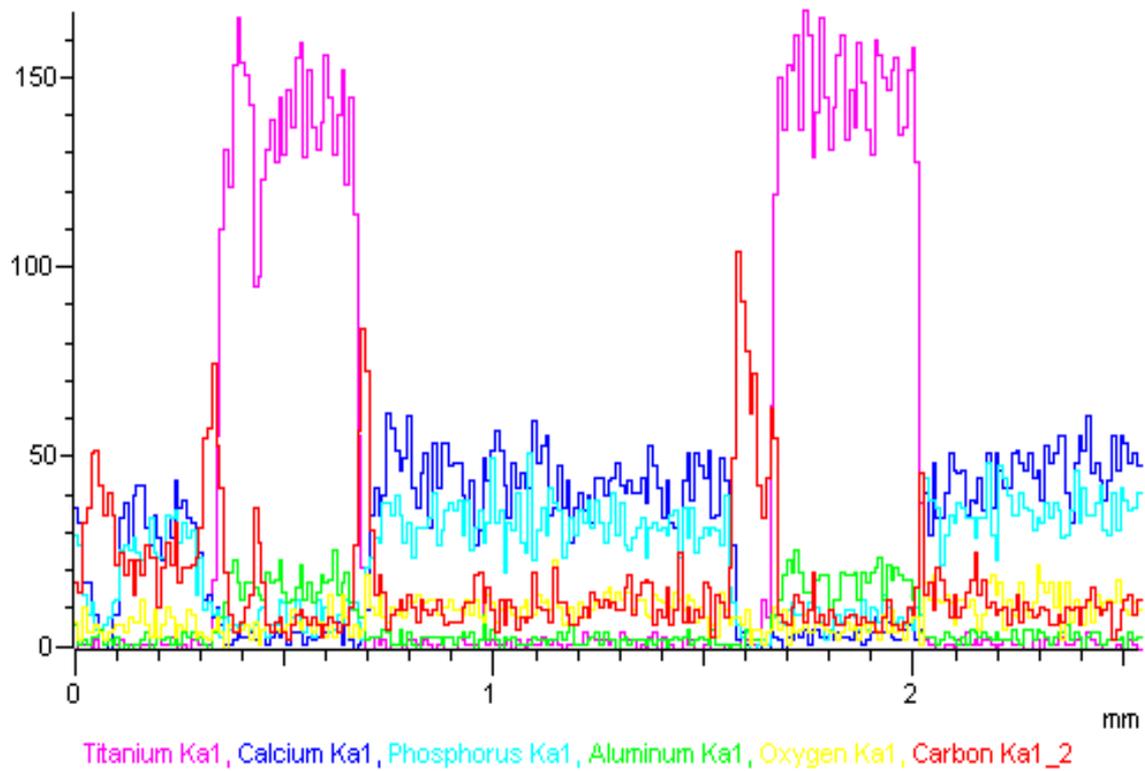


Ilustración 41. Proporción de cada elemento en función de la zona de análisis (tornillo).

Como se puede observar, se distinguen varias zonas que corresponden a zonas de hueso y zonas donde hay metal, cada zona con composiciones similares a las del caso anterior. Por tanto, se puede perfectamente interpretar la cantidad de microelementos que se recogen en el barrido. En este caso el barrido atraviesa dos partes diferenciadas de metal y dos de tejido óseo junto con partes orgánicas. Hay que examinar las zonas que se encuentran en la interfase y tras recoger los datos y observarlos, no se aprecia contaminación.

Hay que destacar que el contenido de aluminio es bastante bajo, excepto en la zona donde hay implante, como es de prever. Se puede destacar que el aluminio recoge ciertos valores en las zonas que no son del metal, aunque son tan insignificantes que no los tendremos en cuenta.

Con respecto al contenido en carbono, es bastante alto en la interfase debido principalmente al proceso de corte de las muestras, como ya se comentó.

A continuación, se muestran los gráficos que ofrecen información individual de los diferentes elementos que constituyen el barrido.

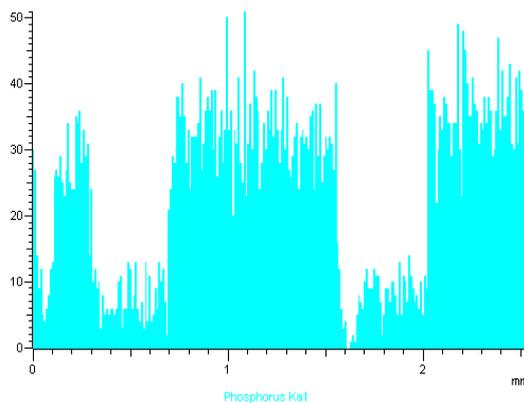


Ilustración 42. Proporción de fósforo en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

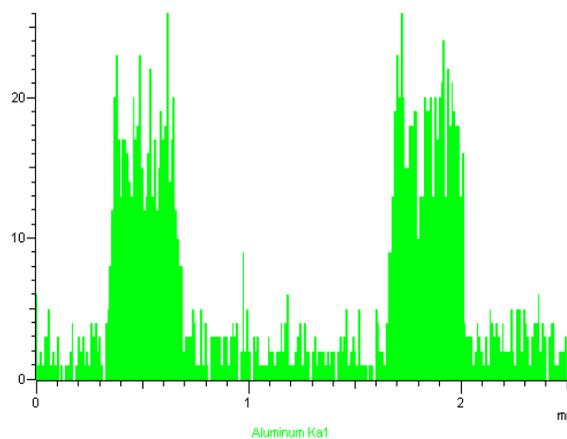


Ilustración 43. Proporción de aluminio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

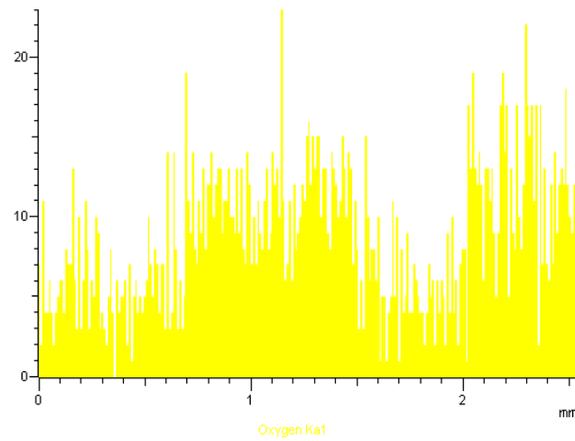


Ilustración 44. Proporción de oxígeno en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

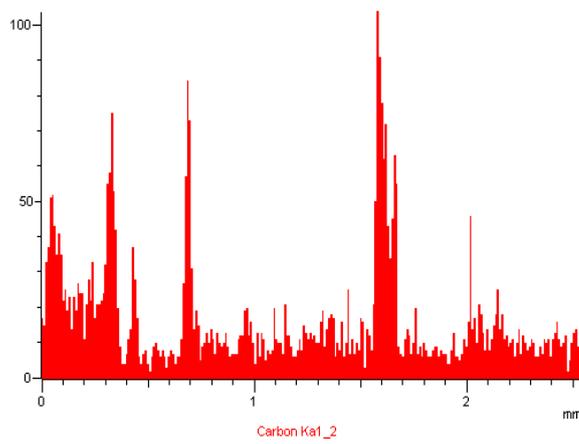


Ilustración 45. Proporción de carbono en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

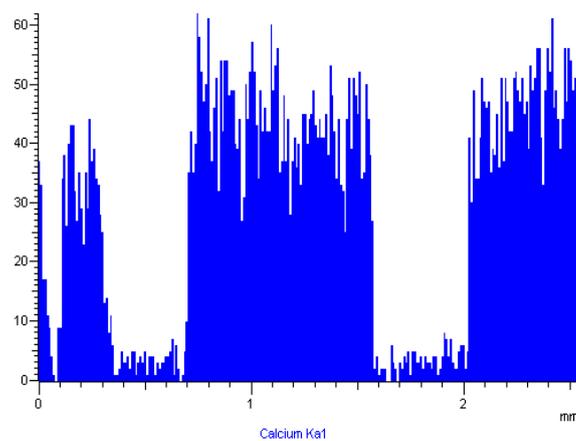


Ilustración 46. Proporción de calcio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

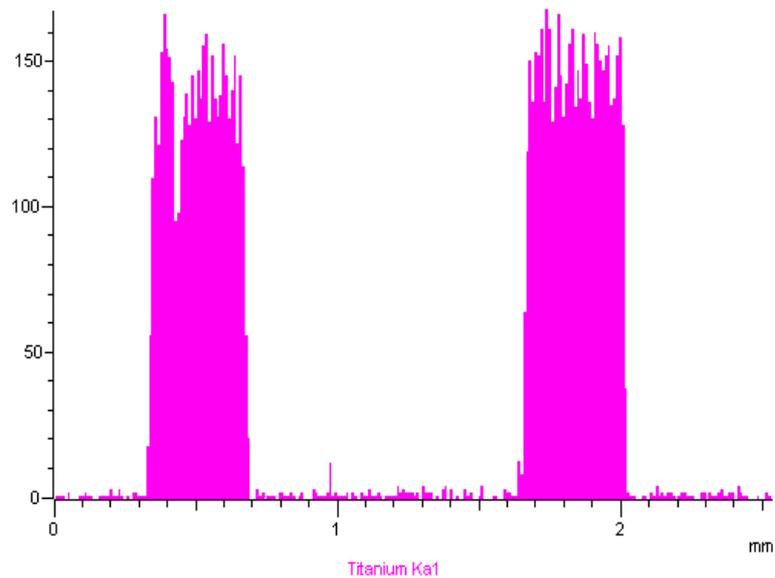


Ilustración 47. Proporción de titanio en la muestra (punta) mediante barrido de 1.5 mm.

Por último, se analizó la zona denominada punta-placa mediante un barrido de 1.5 mm, recogiendo puntos, igual que en los otros casos, de la parte ósea, de la interfase hueso-metal y del metal. Igualmente, se examinó con detenimiento la interfase con el objetivo de averiguar si existe contaminación del metal en la estructura ósea-orgánica.

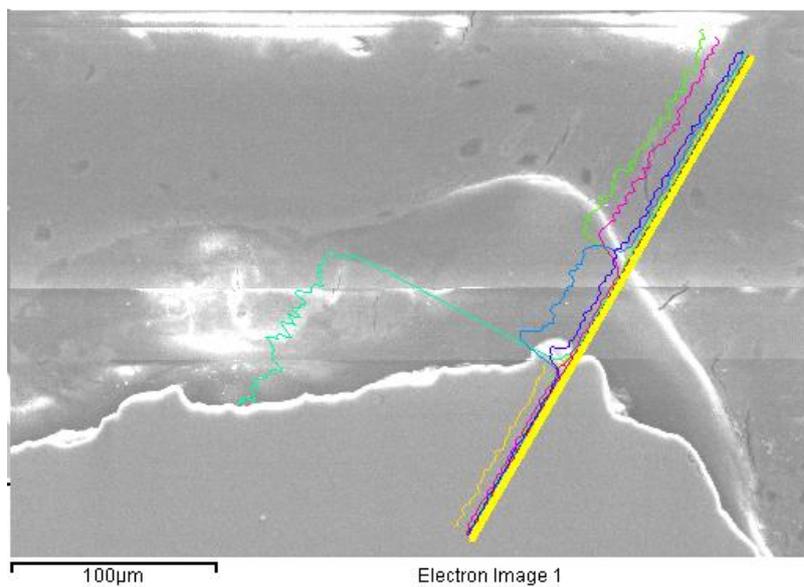


Ilustración 48. Análisis interfaz hueso-implante en la zona de la punta-placa mediante barrido de 1.5 mm.

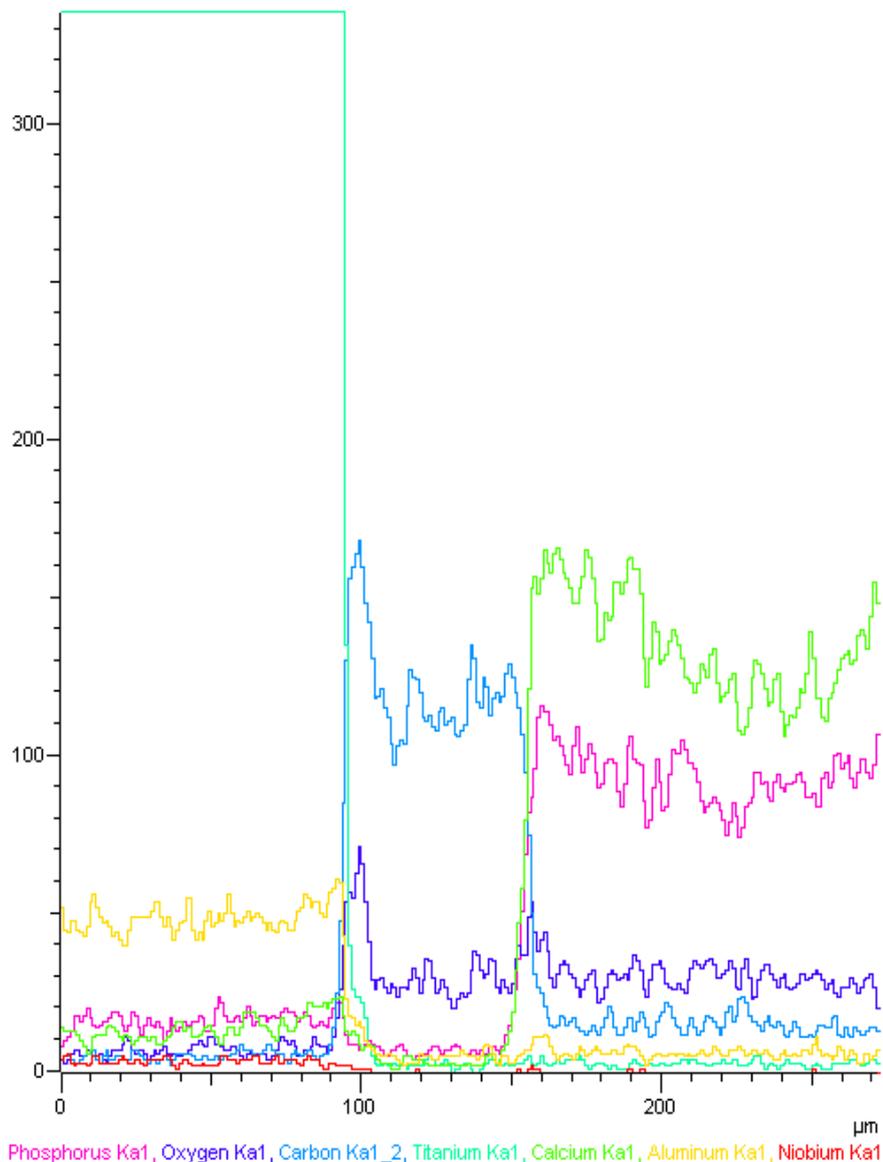


Ilustración 49. Proporción de cada elemento en función de la zona de análisis (punta-placa).

Al igual que en las gráficas anteriores la interpretación sobre la contaminación de los diferentes tejidos es nula. En este caso el rango de barrido es mucho mejor y la escala se ha reducido a 280µm. Se observa perfectamente una diferenciación entre la parte metálica y la formación ósea.

En este caso cabe destacar la zona de la interfase con contenidos en carbono y oxígeno. Es apreciable la falta de tejido óseo (calcio y fósforo) y también falta de elementos metálicos (titanio, aluminio, niobio) en esta zona.

A continuación, se muestran los gráficos que ofrecen información individual de los diferentes elementos que constituyen el barrido.

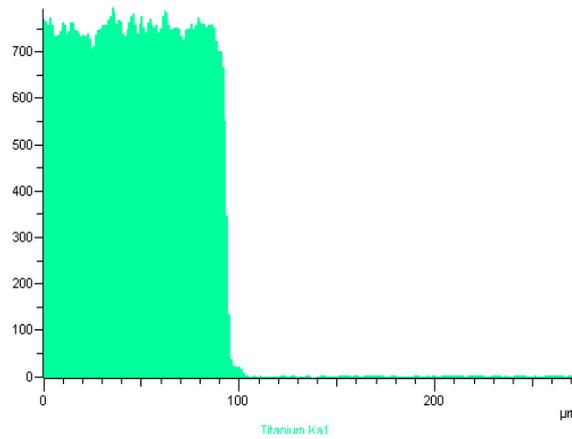


Ilustración 50. Proporción de titanio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

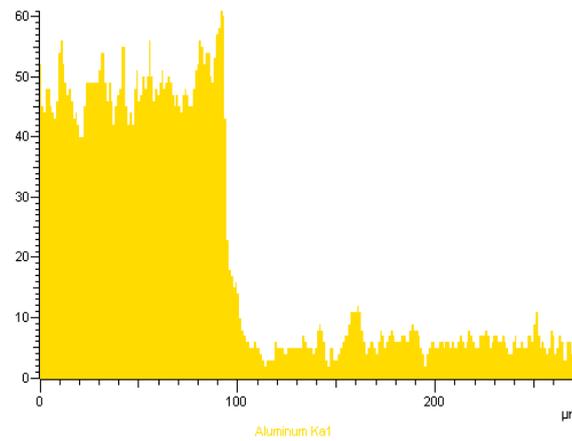


Ilustración 51. Proporción de aluminio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

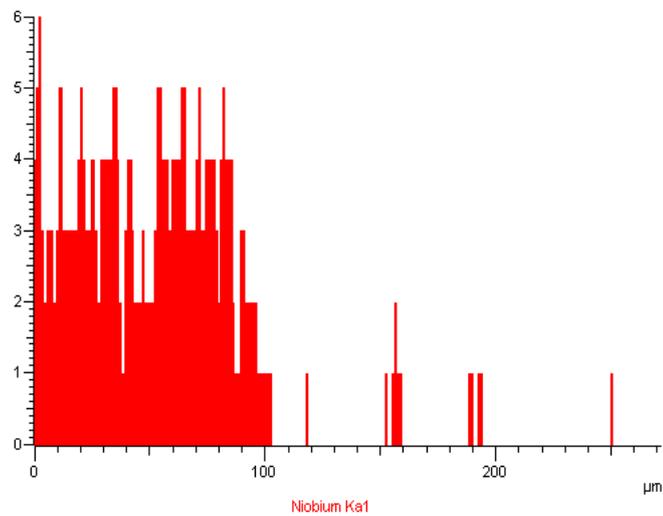


Ilustración 52. Proporción de niobio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

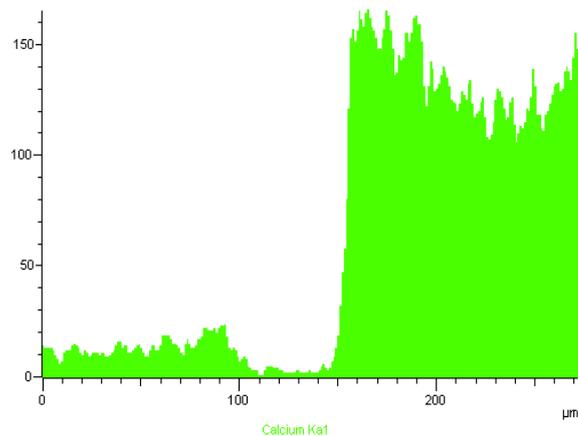


Ilustración 53. Proporción de calcio en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

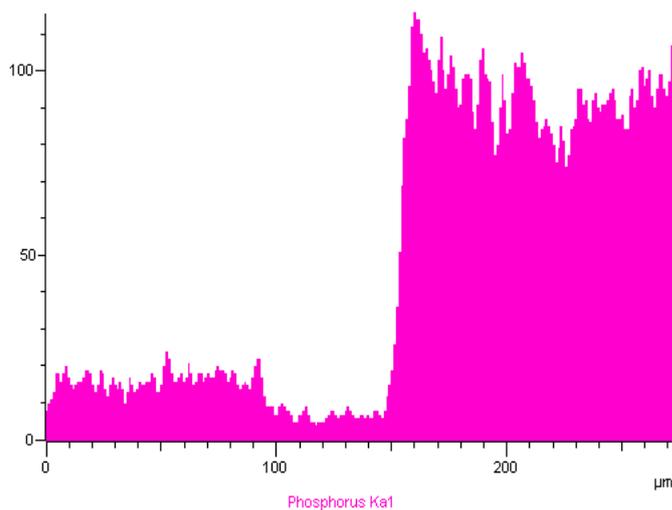


Ilustración 54. Proporción de fósforo en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

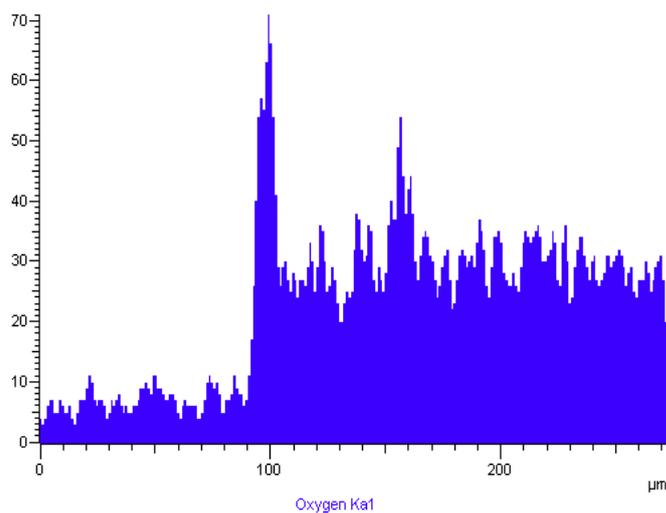


Ilustración 55. Proporción de oxígeno en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

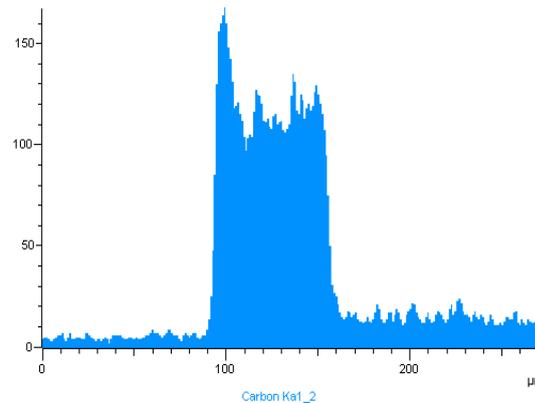


Ilustración 56. Proporción de carbono en la muestra (punta-placa) mediante barrido de 1.5 mm.

11.5. Resultados histológicos de los ensayos de las muestras.

Las histologías obtenidas a raíz del análisis de las muestras implante-hueso correspondientes a los animales de experimentación, permiten identificar el hueso y los tejidos blandos alrededor del implante, como se muestran en las ilustraciones.

El tejido óseo se identifica en la mayoría de los casos por la observación de las osteonas y de los vasos sanguíneos en general, demostrando la presencia de un hueso maduro ordenado. Sin embargo, también se ha identificado como hueso, un segundo tipo de hueso inmaduro u osteoide.

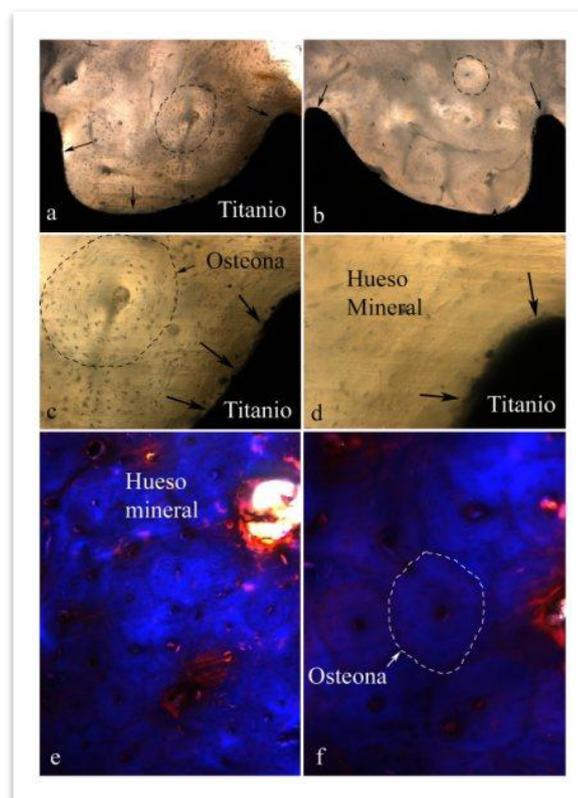


Ilustración 57. Presencia de hueso en contacto con el implante en una muestra sin teñir.

Las figuras *a*, *b*, *c* y *d* son secciones sin teñir en las que se observa claramente la presencia de hueso mineral en estrecho contacto con la superficie del implante de titanio (flechas). Los círculos en línea discontinua marcados indican la presencia de las unidades estructurales básicas características de hueso compacto. Son las osteonas o sistemas de havers, que consisten en un canal central denominado canal o conducto de havers por el que va la vascularización del hueso (arterias, venas, vasos linfáticos e inervación); alrededor de este conducto se disponen láminas concéntricas de matriz ósea formándose las unidades circulares que se observan. Las imágenes *e* y *f* se ven teñidas con la técnicas de Masson-Goldner, técnica en la que se tiñe de manera diferencial el hueso mineral maduro (teñido en azul) y el hueso inmaduro que aún no se ha mineralizado (teñido de rojo). Los puntos más oscuros, sobre todo en las figuras *a* y *c*, dispuestos de forma concéntrica en el interior de las osteona, son las lagunas óseas, es decir, cavidades que quedan en el hueso mineral y que albergan los osteocitos, que son las células óseas en su última etapa de maduración; estas células presentan ramificaciones a su alrededor por las que se comunican entre ellas y con el canal central de havers, a través del que obtienen los nutrientes necesarios para su mantenimiento.

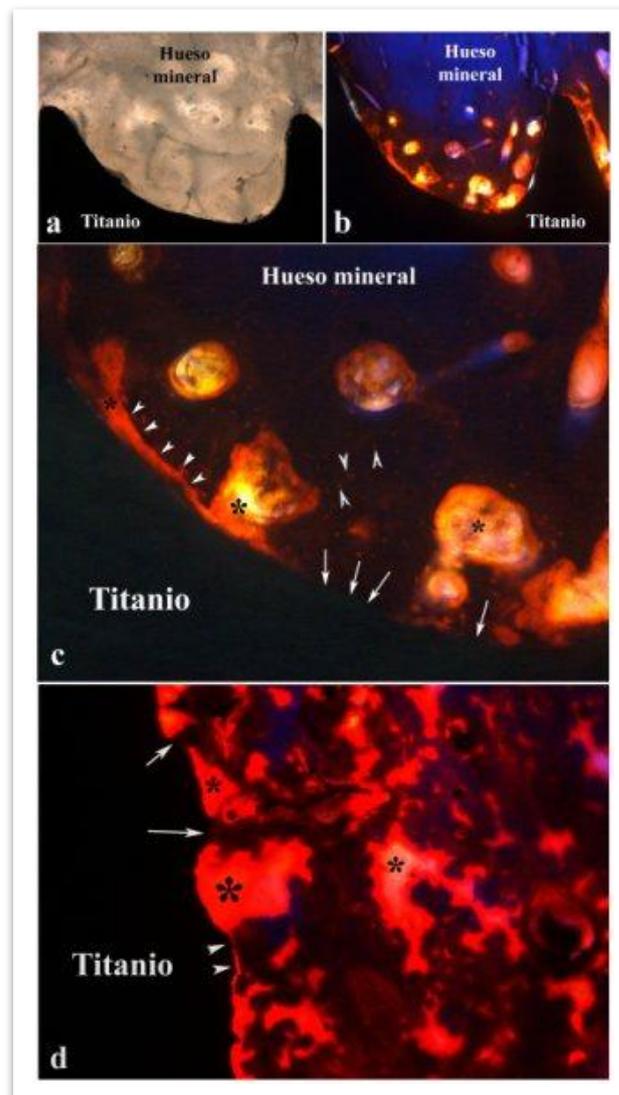


Ilustración 58. Hueso mineral formado en contacto con el implante.

Las figuras *a* y *b* corresponden a la misma sección antes y después de la tinción. Se observa en la zona del interior del implante que el tono azul se transforma en un tono oscuro probablemente a causa del exceso de luz al que se ha expuesto el corte para poder verlo, consecuencia del grosor. No obstante el grosor no parece ser homogéneo porque si lo fuese se debería ver igual que en la zona más alejada del implante. De todas formas lo que interesa es que el hueso que aparece oscuro está teñido de azul y por tanto podemos afirmar que es hueso mineral totalmente formado, las zonas que aparecen claramente en rojo, son zonas de hueso que no se ha mineralizado y por eso no fijan el azul de anilina, que es el colorante que tiñe específicamente los depósitos de hidroxapatita. En las figuras *c* y *d* se observan con bastante claridad y detalle. Se observa (zonas señaladas con flechas) que en la interfase el hueso mineral contacta directamente con la superficie del implante de titanio (osteointegración) aunque en otras zonas aparece la matriz aún sin mineralizar, señalada con puntas de flecha pequeña. Con puntas de flecha ligeramente mayores se han señalado tres lagunas óseas conteniendo osteocitos. Los asteriscos indican zonas de hueso inmaduro aún sin mineralizar. La foto *d* corresponde a otra zona del hueso que está en contacto no con el tornillo, sino con un fragmento de titanio cuadrangular que aparece a ambos lados de dicho tornillo.

11.6. Discusión.

Para realizar ensayos a largo plazo con tejidos, huesos y músculos subcutáneos, según la norma europea EN 30993-6:1994, son adecuados animales como ratas, cobayas, conejos, perros, ovejas, cabras, cerdos y otros cuya esperanza de vida sea relativamente larga. También, se ha demostrado que los resultados obtenidos utilizando el modelo mandibular y el de huesos largos son semejantes [1], pero esta validez sólo lo es para implantes sin carga. Si es necesaria la carga de los implantes, hemos de utilizar especies en las que podamos cargarlos posteriormente, tales como, el cerdo y el perro.

El cerdo, es una de las especies preferidas al tener los órganos y tiempos de osteointegración semejantes a los humanos [2], mientras el perro tiene tiempos de osteointegración diferentes [3], teniendo a su favor las facilidades de manejo [4]. Este es uno de los principales motivos por los que se ha escogido el minipig como animal de experimentación en nuestro estudio, centrado principalmente en analizar el comportamiento “*in vivo*” de dos tratamientos superficiales sobre una placa de aleación de titanio Ti6Al7Nb en su entorno, desde el punto de vista de su osteointegración y de su toxicidad.

El concepto de osteointegración propuesto por Branemark hace ya más de 30 años ha sido el punto de partida de la utilización de los implantes osteointegrados. Los planteamientos iniciales propuestos por este autor, han ido sufriendo transformaciones debido a la aparición de nuevos diseños de implantes, al tratamiento de las superficies y a un mejor conocimiento sobre la biología ósea.

El primer factor indicador del éxito de la implantación es la consecución de la estabilidad funcional de los implantes, es decir, que el implante quede fijo en su lugar de colocación y no se deba reemplazar.

Las causas de un posible fracaso son variadas y no siempre son consecuencia de la respuesta del huésped en función del tipo de implante colocado. No obstante, en situaciones en las que la colocación inicial y las condiciones de carga específicas del implante comprometen al éxito, la calidad del implante, sobre todo en lo que hace referencia a su superficie, puede representar un factor crítico.

En función de la velocidad y de la calidad del tejido óseo neoformado alrededor del implante, los casos complicados se pueden resolver favorablemente o pueden, definitivamente, fracasar.

Es un hecho la importancia de la **estabilidad mecánica del implante, que se evalúa analizando la calidad de la osteointegración mediante el análisis de la cantidad de hueso neoformado en contacto directo con el implante, hábil para fijar mecánicamente el implante, y el tipo de tejido óseo que se forma.**

De los factores clave para conseguir una osteointegración óptima destacan las características del material, el diseño macroscópico del implante y el tipo de superficie. Varios estudios enfatizan que el modo de osteointegración de los implantes y la estabilidad dependen en gran medida de la ultraestructura del implante diseñado [5] [6] [7] [8]. Para algunos autores la geometría del implante parece ser el factor determinante en la adecuada distribución de fuerzas del implante al hueso [9] [10]. Además, es un hecho demostrado que a mayor longitud del implante, mayores posibilidades de que llegue a buen término la osteointegración [11].

No obstante, indagar en los procesos celulares que ocurren en la interfaz implante-hueso ha contribuido mucho al entendimiento de la osteointegración. La comprensión de la compleja interacción hueso-implante a diferentes niveles ofrece la oportunidad de evaluar y fabricar implantes con respuestas biológicas específicas [12] [13] [14].

En este estudio, el implante fue diseñado de tal forma que este fuera lo menos invasivo posible, minimizando la funcionalidad de la articulación del animal, asegurando un óptimo contacto hueso-implante así como la transmisión de cargas (inducción del crecimiento del hueso) y una implantación sencilla.

Según la norma mencionada anteriormente, las muestras de ensayo y los materiales de control han de ser implantados en las mismas condiciones, sobre las mismas especies animales de igual edad, sexo y raza, y en los lugares anatómicos correspondientes. El número y tamaño de los implantes introducidos en un animal depende del tamaño de la especie y de la localización anatómica. Para Parr y colegas [4], se deberían utilizar animales mestizos para evitar fenómenos asociados a la raza. Sin embargo, nosotros preferimos el uso del cerdo de raza minipig, intentando de este modo una mayor homogeneidad entre los individuos para evitar al máximo posible variaciones debidas a estos factores.

La técnica quirúrgica empleada fue la rutinaria para la implantación de los implantes en la tibia del cerdo; con respecto al tiempo de implantación, éste va a depender del potencial de reparación del hueso [15]. En cerdos no se han encontrado diferencias en el porcentaje de contacto óseo entre cargarlos a las 6 y a las 18 semanas [16]. Sin embargo, habrá diferencias dependiendo de la calidad del hueso, teniendo que esperar algo más en implantes superiores que en inferiores [17]. La carga prematura puede prevenir el contacto directo del hueso con el implante, pudiendo provocar cambios en la cresta ósea [18] [19]. Si el implante fuera móvil se podría incrementar la movilidad pudiendo provocar incluso su fracaso [20]. En nuestro caso, durante la fase experimental se produjeron tres fracturas (dos se recuperaron y una se perdió), probablemente debido a una mala implantación.

Tras el periodo de estudio, se procedió a la eutanasia de los animales, siguiendo los protocolos establecidos para evitar sufrimientos innecesarios a los animales. Según la norma EN 30993-

1206:1994, para estudios a largo plazo las muestras han de estar implantadas al menos durante 12, 26, 52, 78 ó 104 semanas. Nunca se pueden mantener menos de 12 semanas, ya que hay que tener la certeza de que se ha alcanzado un estado estacionario con respecto a la respuesta biológica. En este estudio, el periodo de implantación ha sido de 6 meses (>24 semanas). Durante el periodo de cicatrización se ha garantizado el contacto entre el hueso y el implante de cada cerdo intervenido, no observándose signos de inflamación.

Como se ha comentado, el aluminio se ha presentado como un elemento perjudicial para el cuerpo humano cuando los niveles alcanzan el umbral a partir del cual, dicho elemento no se elimina del cuerpo. Estudios publicados señalan al aluminio como la toxina responsable de muchas enfermedades⁴.

La evaluación de la toxicidad de la placa metálica implantada (aleación Ti6Al7Nb), se ha realizado mediante la determinación de la concentración de aluminio por absorción atómica en los distintos órganos de los animales de experimentación.

Durante mucho tiempo el aluminio fue considerado como un elemento inocuo, pero la bibliografía revelaba ya muchos datos de sus efectos tóxicos.

Spoffort en 1921 describe los síntomas patológicos que experimentó un obrero de la industria metalúrgica tras la exposición prolongada a un polvo industrial con altas concentraciones en aluminio [21]. Koppeloff en 1942 relata el efecto epiléptico del hidróxido de aluminio en los animales de experimentación cuando se administra por vía subdural [22]. Klatzo en 1965 describe que los compuestos del aluminio producen una degeneración neurofibrilar en el cerebro de los conejos, dando lugar a una alteración muy similar a la observada en los pacientes con enfermedad de Alzheimer [23].

Está ampliamente demostrado que el aluminio se convierte en un elemento perjudicial para el cuerpo humano cuando los niveles alcanzan el umbral a partir del cual, dicho elemento no se elimina del cuerpo. Estudios publicados señalan al aluminio como la toxina responsable de muchas enfermedades⁵.

Aunque estos estudios no han sido debatidos por muchos centros de investigación médica se da por sentado que el aluminio no obtiene la categoría de material biocompatible. El aluminio como elemento no es un nutriente, pero se encuentra en cantidades variables en el agua, tierra, aire, alimentos, vegetales, semillas e incluso en algunas medicinas. El principal problema es que el cuerpo lo absorbe, acumula y elimina siendo las cantidades que puede ingerir una persona a lo largo de toda una vida muy altas, y si no se eliminan pueden llegar a causar ciertos problemas.

En efecto, está estipulado que la ingesta diaria de Al oscila entre 3 y 10 mg/día; algunos estudios realizados en países como Hungría, Alemania, Suecia o Italia, hablan de un límite semanal que demuestra que los adultos podrían llegar a ingerir entre 0.2 y 1.5 miligramos por cada kilo de masa corporal, y los niños entre 0.7 y 2.3 miligramos [24].

⁴ Véase el capítulo I de esta Tesis, apartado denominado "El aluminio en los sistemas biológicos"

⁵ Véase el capítulo I de esta Tesis, apartado denominado "El aluminio en los sistemas biológicos"

El consumo de té puede ser una vía de exposición al aluminio ya que las hojas del té tienen altos contenidos del metal. La infusión presenta entre 10 y 100 veces más contenido del elemento que las hojas de la planta, pero la presencia de taninos y otras sustancias orgánicas hace que se disminuya notablemente la forma de aluminio capaz de ser absorbida por el intestino del hombre [25] [26].

En lo que respecta a la raza porcina, la nutrición mineral es una parte importante de su alimentación, considerándose el aluminio un mineral esencial menor, cuya necesidad no ha sido demostrada; los niveles máximos tolerables en la dieta son de 200 ppm MS, puesto que su toxicidad inhibe a absorción de glucosa y la deposición del fósforo en los huesos, con signos clínicos nerviosos [27].

Algunos autores consideran que la ingesta de aluminio vía agua de consumo sólo es una pequeña parte del metal incorporado por la alimentación, por lo que se debería tener en cuenta la ingesta de aluminio por la vía de los alimentos [28] [29]. Otros autores, como Martyn et al [30] y Forster et al [28], consideran que, aún siendo la alimentación fuente de ingesta importante del metal, es en el agua donde presenta una forma más biodisponible para ser absorbida por el intestino, y que la mayor parte del aluminio ingerido procedente de otras fuentes no se absorbe.

A pesar de que, en comparación con otras, esta fuente de exposición representa una pequeña proporción de la ingesta diaria de aluminio, mediante el consumo de agua se aporta aproximadamente 0.1 mg/L. De la misma manera, en función del tipo de aire que se respire, la concentración de Al absorbida es distinta. Considerando el aire de una ciudad, estos valores estarían en torno a 0.4 - 8.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. No obstante, la exposición por inhalación no es la vía más importante a la que la población general está expuesta, aunque podría serlo en algunas ocupaciones altamente expuestas.

El riesgo de toxicidad por Al no está limitado a pacientes con tratamientos crónicos (diálisis, nutrición parenteral,...). El motivo principal se halla en el extenso uso del elemento en medicina, en la industria farmacéutica (antiácidos con aporte de 104 a 208 mg de Al por cápsula, aspirinas con regulador de pH con aporte de 10 a 20 mg de Al por tableta, suplementos de calcio, productos antidiarreicos y antihemorroidales), en la elaboración de vacunas (difteria, tétanos, hepatitis, rabia y ántrax), disoluciones nutritivas, etc.

El consumo de productos farmacéuticos, antiácidos y analgésicos con aluminio, puede suponer un aumento en la incorporación de metal en 2 ó 3 órdenes de magnitud de la ingesta por alimentación. La dosis semanal recomendada por la FAO para una persona adulta de 60 kilogramos de peso es de 420 mg [28]. Por otro lado, los pacientes sometidos a diálisis pueden estar expuestos a unos niveles moderadamente aumentados del metal. Esta organización internacional recomienda que los niveles máximos de Al en el fluido de dialización sea inferior a 15 $\mu\text{g Al/l}$ [31].

La exposición a Al también puede ser el resultado del uso de productos de higiene personal. Los compuestos de aluminio son utilizados en la industria cosmética, principalmente en la fabricación de desodorantes y antitranspirantes, aunque los estudios llevados a cabo indican que la absorción dérmica del metal sería mínima [31]. El lactato de Al es utilizado en cremas dentales para dientes sensibles. El clorhidrato de Al, ampliamente usado en la composición de antitranspirantes, actúa suprimiendo el sudor por formación de un precipitado de hidróxido o desnaturalizando queratina en la capa córnea que rodea los ductos de las glándulas.

Los datos de distintos estudios en diferentes países afirman que la ingesta diaria del metal varía grandemente dependiendo de la dieta, el uso de medicaciones con sales de Al, la fuente de agua de consumo y la exposición a distintos ambientes, como el laboral. Así pues, la exposición diaria de un adulto de 60 kg puede oscilar entre 2.5 y 13 mg Al/día por exposición aérea, por la ingesta de alimentos y de agua. En general la estimación hecha por la OMS supone, en los países en los que se ha estudiado, una exposición menor a 15 mg/día (0.03-11.5 mg/día) [28], llegando a varias veces más en personas que toman medicamentos con aluminio o altamente expuestas a través de los alimentos o el ambiente. La absorción diaria puede suponer un 3% del aluminio total ingerido del agua y menor si la fuente de exposición son los alimentos.

Por estos motivos, *la proporción de aluminio que puede afectar al ser humano por la difusión de este elemento al llevar un implante es pequeña, y no se puede considerar como algo perjudicial frente al consumo diario por ingesta alimenticia u otros factores.*

El análisis de la respuesta ósea al material implantado se llevó a cabo mediante la evaluación de la interfaz hueso-implante por microscopía electrónica de barrido y estudios histopatológicos por microscopía óptica.

Actualmente hay diferentes metodologías para abordar la evolución del proceso de consolidación ósea: radiografías, densitometrías y, de manera indirecta, la determinación de iones en sangre, pero no informan sobre el porcentaje de cada uno de los componentes minerales y cómo van cambiando a través del tiempo. Sin embargo, el abordaje de este fenómeno mediante microscopía electrónica de barrido y microanálisis con EDX presenta ventajas destacadas: se realiza *in situ*, es una técnica cuantitativa (a diferencia de otras que son cualitativas) y es específica para cada zona del hueso.

Los métodos clásicos comúnmente utilizados para el estudio microscópico de los tejidos tenían el inconveniente de tener que deshidratar los tejidos antes de su observación y análisis. Esto permitía un buen análisis de la parte orgánica de los tejidos pero relegaba a un segundo plano la parte inorgánica. El método Exakt-Kultzer (Nordestedt, Alemania) permite la visualización directa de los tejidos sin tener que descalcificar el material. Gracias al sistema de sierra se consigue el corte preciso de los materiales incluidos en plásticos rígidos y con el pulido se puede rebajar la muestra hasta el punto necesario, de modo que puede ser visualizada tanto por Microscopía Óptica, previa tinción de las muestras, como por Microscopía Electrónica, ya sea convencional o con electrones retrodispersados (*Backscattering*).

En este estudio, la localización de los tejidos y su morfología han sido comprobadas por retrodispersión. Los resultados, por tanto, se refieren a mediciones llevadas a cabo tras la identificación del tejido adyacente al implante sometido a análisis. La localización de la fase mineral en el hueso es de vital importancia para asegurar sus funciones como reservorio iónico y su papel en la mineralización.

El microanálisis químico realizado mediante esta técnica nos permitió obtener el porcentaje en peso de la composición química elemental semi-cuantitativamente de las muestras con la finalidad de observar materiales inorgánicos presentes en el material orgánico y evaluar la toxicidad de algunos elementos, como el aluminio, en la interfaz hueso-implante.

Para identificar la fase mineral de hidroxiapatita del hueso se necesita obtener la relación calcio/fósforo en la muestra y compararlo con el de hidroxiapatita, cuyo valor es — .

La media de los resultados obtenidos de la *ratio* Ca/P para los tejidos calcificados en el entorno de los implantes que se han analizado para cada animal es de 2.17, ligeramente superior al valor correspondiente a la *ratio* Ca/P que la literatura atribuye a la hidroxiapatita [32].

La *ratio* Ca/P en los tejidos óseos ha sido ampliamente estudiada en la literatura. Las experiencias de Neuman y Bareham [33] demostraron por un método indirecto que existía un fosfato cálcico secundario inestable, la bruxita, aparte de la hidroxiapatita que podía contribuir a disminuir la *ratio* Ca/P en los tejidos óseos.

En 1979, la bruxita pudo ser visualizada por Cristalografía por Rayos X en ciertos tejidos (tejidos poco mineralizados, hueso recientemente sintetizado con poco depósito mineral), aunque su significación no quedaba clara [34]; no se pudo identificar su localización exacta, ni las fases iniciales de la mineralización y su posible coexistencia con la hidroxiapatita en las mismas o localizaciones diferentes en el tejido calcificado.

En 1991 Iijima y colegas [35] propusieron la posible existencia de un precursor de fosfato octocálcico (de *ratio* Ca/P menor) observado por Microscopio Electrónico de Transmisión, que coexiste con la hidroxiapatita y que puede formar hidroxiapatita en presencia de flúor; sin embargo sus estudios fueron realizados *in vitro*.

Glimcher [36] en 1991 aseguraba que la fase mineral del hueso aparece depositada en forma de apatita pobremente cristalinizada (no hidroxiapatita) conteniendo carbonato al 5% y fosfato entre 5 y 10%. Con el tiempo la *ratio* Ca/P se acercaba a los valores aproximados de la hidroxiapatita (1.67), cuyo contenido en carbonato aumentaba al tiempo que disminuye el fosfato.

En 1992 Roberts y colegas [37] realizaron un estudio por resonancia nuclear magnética (RNM) y difracción de rayos X de fracciones de huesos embrionarios, encontrando en un principio una apatita pobremente cristalinizada, la cual pudiese ser la causa de disminución de la *ratio* Ca/P.

Estudios realizados por Ducheyne y colegas [38] aseguran que el valor estequiométrico de la hidroxiapatita es de 1.67. Sin embargo, más recientemente Zaichick y Tzaphlidou [39] han atribuido a la hidroxiapatita un valor estequiométrico de 2.16, similar al que se ha obtenido en nuestro estudio, lo que implica crecimiento óseo.

En lo que respecta a la interfaz hueso-implante de las muestras, se realizó un análisis exhaustivo en distintas zonas de contacto recogiendo puntos de la parte ósea, de la interfase hueso-metal y del metal con el objetivo de averiguar si existe contaminación del metal en la estructura ósea-orgánica. En base a la interpretación de los resultados que se recogen de la cantidad de microelementos de cada muestra procedentes del barrido, se puede afirmar que no se aprecia contaminación. La presencia de aluminio en la interfaz es insignificante y sólo se aprecia un contenido de aluminio significativo en las zonas donde hay metal, como es de prever.

Hay que destacar que el contenido de carbono presente en la interfase es bastante alto, pero esto es debido principalmente al proceso de corte de las muestras, por lo que no es significativo.

La evaluación de la existencia de tejido óseo alrededor los implantes de titanio Ti6Al7Nb se llevó a cabo mediante estudios histopatológicos por microscopía óptica, cuya interpretación implica gran conocimiento de los mecanismos de formación de hueso como respuesta a la implantación.

Efectivamente, la inserción de un implante ocasiona un traumatismo térmico y mecánico al tejido receptor. Si este traumatismo es moderado, el tejido óseo va a responder de forma escalonada, mediante fenómenos de inflamación, reparación y remodelación [40].

La neo-aposición ósea que se origina alrededor del implante, ocurre a partir de los márgenes de hueso fracturado durante la colocación del mismo, los cuales contienen núcleos aislados de osificación que se desarrollan en la interfase hueso-implante [41] [42]. Una primera fase corresponde a la formación del coágulo sanguíneo entre el implante y el hueso, con migración leucocitaria y actividad fagocítica. Posterior a las 48-72 horas de la colocación del implante, culmina la actividad fagocitaria y se inicia la formación de un pre-callo. Sucesivamente el pre-callo se enriquece de tejido conectivo compacto y de células mesenquimáticas, que se diferenciarán en fibroblastos y osteoblastos, convirtiéndose posteriormente en un callo [43].

Los osteoblastos, dispuestos sobre la superficie del implante, producen fibras osteogénicas calcificables, generando una matriz ósea (callo óseo) entre el implante y el hueso inicial, el cual madurará transformándose en tejido óseo neoformado [43]. En las primeras cuatro semanas del postoperatorio, la respuesta es masiva, iniciando posteriormente la remodelación. La neoformación ósea prosigue, mientras que simultáneamente los procesos iniciales de remodelamiento conducen a una gradual adaptación del hueso neoformado. En la octava semana postquirúrgica, la actividad de remodelado y adaptación morfo-estructural del tejido óseo neoformado alcanza su máxima expresión [44].

En nuestro estudio, los análisis histológicos de la interfaz hueso-implante de las muestras han tenido una buena osteointegración, existiendo un íntimo contacto entre la superficie del implante (aleación Ti6Al7Nb) y el hueso, y observándose estructuras con osteonas, osteocitos y canales de Havers propias de los tejidos óseos. Se aprecia que la respuesta ósea local ante la presencia de los implantes de titanio Ti6Al7Nb fue adecuada y rápida, comenzando desde las primeras etapas, la diferenciación de tejido fibroso a tejido óseo. No se aprecia diferencia significativa entre los distintos tratamientos aplicados a las placas.

11.7. Conclusiones.

El contenido de este último apartado de la Tesis Doctoral lo constituye la recopilación de aportaciones y conclusiones que han surgido como fruto de la labor desarrollada.

En este contexto se expone a continuación, en forma concreta y sinóptica, lo que a juicio de la doctoranda constituyen las aportaciones y las conclusiones finales de la Tesis Doctoral.

Aportaciones Generales

- ✓ Elección del modelo apropiado de animal de experimentación, el minipig, ampliamente avalado por la bibliografía existente.
- ✓ Gestión de los trabajos de acondicionamiento del Bioterio y del quirófano experimental de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, en base normativa específica, Directiva del Consejo 86/609/CEE respecto al bienestar animal.
- ✓ Gestión de la compra y traslado de los animales de experimentación desde el Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba hasta el Bioterio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.
- ✓ Garantizar que el transporte de los animales se hizo en habitáculo cerrado y homologado.
- ✓ Garantizar que los animales sólo se emplearían para los fines específicos con lo que fueron adquiridos, la experimentación, y no para reproducirse.
- ✓ Garantizar la eutanasia reglada de los animales en un periodo máximo de 6-9 meses, posterior al estudio.
- ✓ Cumplir con la normativa respecto al bienestar animal, supervisando el estado óptimo de los animales en el periodo pre y postquirúrgico (control radiográfico según protocolo establecido).
- ✓ Garantizar una respuesta biológica estandarizada, fiable y reproducible vía elección de animales homogéneos somáticamente (igualdad de sexo, peso y edad).
- ✓ Estudio biomecánico de la anatomía del minipig, concretamente de la tibia como modelo de hueso escogido para realizar el estudio.
- ✓ Diseño de un protocolo de implantación, seguimiento y rescate de los implantes, con el objeto de asegurar en el tiempo la buena fijación de los implantes y minimizar los tiempos de intervención de los animales.
- ✓ Diseño del implante para asegurar una transferencia de carga al dispositivo implantado e inducir el crecimiento de hueso.
- ✓ Modelado tridimensional del implante y simulación mecánica.
- ✓ Fabricación de los implantes en el laboratorio de Fabricación del Departamento de Ingeniería Mecánica del Instituto Tecnológico de Canarias.
- ✓ Aplicación de dos tratamientos superficiales distintos a los implantes. Los implantes marcados con número impar se sometieron al tratamiento superficial A (ataque ácido más tratamiento térmico) y los marcados con número par se sometieron al tratamiento B (tratamiento químico por inmersión, consistente en un tratamiento SBF más un tratamiento biovitrocerámico). Además, todos los implantes deberán arenarse con corindón, PK-150 para obtener una superficie rugosa.
- ✓ Esterilización en autoclave y empaquetado en blíster de los implantes en la Unidad Experimental del Hospital Universitario Doctor Negrín.
- ✓ Diseño de la técnica quirúrgica y puesta a punto de la metodología de trabajo mediante ensayo en cerdo muerto.
- ✓ Garantizar la correcta anestesia de los animales y su monitorización completa previa y durante la intervención, estableciendo un protocolo anestésico apropiado para cada animal en aras de asegurar la máxima supervivencia de los individuos del experimento
- ✓ Garantizar la administración de analgesia a los animales en el postoperatorio.

- ✓ Garantizar la eutanasia de los animales según el protocolo de rescate de las muestras de tejido blando (cerebro, grasa, riñón, bazo e hígado) y de las muestras de tejido óseo con implantes.
- ✓ Utilización de técnicas de espectrometría de absorción atómica para efectuar el análisis toxicológico.
- ✓ Utilización de técnicas microscópicas de análisis superficial (microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, difracción por rayos X) para realizar los estudios histológicos y evaluar la osteointegración y el crecimiento óseo.
- ✓ Establecer un plan de cortes en el modelo virtual y un protocolo de cortes en las muestras para su posterior estudio histológico.

Conclusiones

- ✓ Los ensayos *in vitro*, después de aplicar un tratamiento superficial SBF con partículas biovitrocerámicas a los implantes objeto de esta Tesis sugieren que existe una *buena osteoinducción y biocompatibilidad* en las muestras, destacando el *tiempo de inmersión como parámetro importante en la calidad de la deposición*. Destacamos, en lo que respecta a la biocompatibilidad y la citotoxicidad que:
 - La expresión de la fosfatasa alcalina confirma que las células osteoblásticas pertenecen al fenotipo osteoblástico, existiendo reacción histoquímica positiva.
 - Los análisis citomorfológicos, realizados tanto con el microscopio de fluorescencia y en de contraste-fase, muestran algunas diferencias relacionadas con el tiempo después del inicio del cultivo:

Los aspectos citomorfológicos después de 24 horas son los mejores para las muestras inmersas durante 15 días, donde fueron observadas citomorfologías normales en la interfaz y a distancia de la muestra.

En lo que respecta a los aspectos citomorfológicos, después de 48 horas, los mejores resultados se confirman para las muestras inmersas durante 15 días.
- ✓ Los análisis de las capas depositadas de hidroxiapatita en los implantes, en los ensayos *in vitro*, revelan lo siguiente:
 - Las micrografías muestran capas depositadas de hidroxiapatita que ilustran un crecimiento de hidroxiapatita bastante regular con algunos poros pequeños. Aumentando el tiempo de inmersión la deposición de hidroxiapatita tiende a formar una morfología parecida a colonias de coral.
 - Después de los ensayos de corrosión simulados en condiciones funcionales extremas, se demostró que todos los parámetros electroquímicos son mejores en implantes con recubrimiento de hidroxiapatita que en aquellos sin recubrimiento.
 - Las capas de hidroxiapatita depositada después de 15 días muestran resultados prometedores en cuanto a su uso en implantes en experimentos preclínicos.
- ✓ Las histologías realizadas mediante microscopía óptica procedentes de las muestras de los animales de experimentación reflejan una buena osteointegración y osteoinducción de todos los implantes para los dos tipos de tratamiento superficial al que fueron sometidos.

- ✓ Los análisis mediante microscopio electrónico de barrido y analizador EDX de la interfase hueso-implante de las muestras nos indican que no hay presencia de elementos potencialmente tóxicos (aluminio) pertenecientes al implante.
- ✓ El estudio de la interfaz hueso-implante de las muestras de los animales de experimentación reflejan que si se han encontrado elementos pertenecientes a la parte mineral del tejido óseo (calcio, fósforo). La media de los resultados obtenidos de la ratio Ca/P que se han analizado para cada animal es de 2.17, por lo que podemos afirmar que hay crecimiento óseo.
- ✓ Los estudios mediante la técnica de espectropía de absorción atómica indican que *la proporción de aluminio que puede afectar al ser humano por la difusión de este elemento al llevar un implante es insignificante*, y no se puede considerar como algo perjudicial frente al consumo diario por ingesta alimenticia u otros factores.
- ✓ Esta última conclusión choca con los argumentos encontrados en la bibliografía existente que apuestan por un cambio en el material implantable, es decir, el cambio de la aleación Ti6Al4V ampliamente utilizada con resultados satisfactorios por la aleación Ti6Al7Nb objeto de este estudio, mucho más cara y difícil de obtener.

CAPÍTULO

12

Bibliografía

1. *A comparison of femoral and mandibular animal models for the evaluation of HA-coated implants.* **COOK, S. D., et al.** 1992 b, *JOral-Implantol*, pp. 359-365.
2. *Evaluation of titanium dental implant osseointegration in posterior edentulous areas of micro swine.* **HALE, T. M., et al.** 1991, *J. Oral. Implantol.* , pp. 118-124.
3. *Mechanical properties of boneimplant interface: an in vitro comparison of the parameters at placement and at 3 months.* **BROSH, T., PERSOVSKI, Z. and BINDERMAN, I.** 1995, *Int J Oral Maxillofac Implants* , pp. 729-735.
4. *Comparative implant research in dogs: A prosthodontic model.* **PARR, G. R., et al.** 68, 1992, *J Prosthet Dent.*
5. *Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.* **Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson HA, Lindstrom J.:** 1981, *Acta Orthop Scand*, pp. 155-170.
6. *The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone.* **Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundström I, McQueen D, Skalak R.** 1983, *Annals of Biomedical Engineering* , pp. 1-27.
7. *Osseointegrated oral implants. A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants.* **Albrektsson T, Dahl E, Enbom L, Engevall S, Engquist B, Eriksson AR.:** 1988, *J Periodontol*, pp. 287-296.

8. *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.* **Albrektsson T, Johansson C.** 2001, Eur Spine J , pp. 96-101.
9. *Alternative materials for three endosseous implants.* . **RIEGER, M. R, et al.** 1989 a, J Prosthet Dent , pp. 717-722.
10. *A comparison of stress and strain distribution characteristics of two different rigid implant designs for distal extension fixed prostheses.* **AKPINAR, I., et al.** 1996, Quintessence, pp. 11-17.
11. *Clinical results and guidelines on Steri-Oss endosseous implants.* **SAADOUN, A. P. and LEGALL, M. L.** 1992, Int-J-Periodontics-Restorative-Dent, pp. 486-499.
12. *It's a great new material, but will the body accept it? .* **Kossovsky, N.** 1989, Res Dev , pp. 48-54.
13. *Society for Biomaterials 1992 Presidential Address: New ideas in biomaterials science – A path to engineered biomaterials.* **BD, Ratner.** 1993, Biomed Mater Res, pp. 837-850.
14. *The compressed autogenous spongiosis graft.* **Burri C, Wolter D.:** 1997, Traumatology, pp. 169-175.
15. *Osseointegration and its experimental background.* . **BRÄNEMARK, P.** 1983, J Prosthet Dent , pp. 399-410.
16. *Evaluation of titanium dental implant osseointegration in posterior edentulous areas of micro swine.* **HALE, T. M., et al.** 1991, J. Oral. Implantol. , pp. 118-124.
17. *Implant prosthodontics contribute to restorative dentistry.* **CHRISTENSEN, G. J.** 1990, JADA , pp. 340-350.
18. *The threedimensional bone interface of an osseointegrated implant: a method for study.* **AKAGAWA, Y., et al.** 1992, J Prosthet Dent , pp. 813-816.
19. *The effects of early occlusal loading on one-stage titanium alloy implants in beagle dogs: a pilot study .* **SAGARA, M., et al.** 1993, JProsthet-Dent, pp. 281-288.
20. *Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys.* **ISIDOR, F.** 1996, Clin Oral Impl Res , pp. 143-152.
21. *Case of Aluminium poisoning.* **J., Spoffort.** 1921, Lancet, p. 1301.
22. *Recurrent convulsive seizures in animals produced by immunologic and chemical means .* **Koppeloff LM, Barrern SW, Koppelof N.** 1942, Am J Psychiatry, pp. 881-902.
23. *Experimental production of neurofibrillary degeneration I. Light microscopic observations.* **Klatzo I, Wisniewski H, Streicher E.** 1965, J Neuropathol Exp Neurol , p. 187.
24. **Chavarrías, Marta.** <http://www.elarmonista.com/ws/salud/39-salud/85-aluminio>. [Online]

25. *Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England.* **Forster DP, Newens AJ, Kay DW, Edwardson JA.** 1995, *J Epidemiol Community Health* , pp. 253-258.
26. *Components of drinking water and risk of cognitive impairment in the elderly.* **Jacqmin H, Commenges D, Letenneur L, Barberger-Gateau P, Dartigues JF.** 1994, *Am J Epidemiol* , pp. 48-57.
27. *Directorio de los minerales en alimentación porcina.* **Yagüe, Dr. Antonio Palomo.** *Av. Tecnol. porc.*, pp. 20-34.
28. *Safety evaluation of dietary aluminum.* **Soni MG, White SM, Flamm WG, Burdock GA.** 2001, *Regul Toxicol Pharmacol* , pp. 66-79.
29. *A preliminary study of dietary aluminium intake and risk of Alzheimer's disease.* **Rogers MA, Simon DG.** 1999, *Age Ageing* , pp. 205-209.
30. *Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease.* **Martyn CN, Coggon DN, Inskip H, Lacey RF, Young WF.** 1997, *Epidemiology*, pp. 281-286.
31. *WHO. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 194: Aluminium 1997.*
32. *The effect of phase differences on time-dependet variation of the zeta potential of hydroxyapatite.* **Ducheyne P, Groschner M, Volg G, Plenck H, Eschberger J, Fratzi-Zelman N, Koller K, Klaushofer K.** 1992, *Journal of Biomedical Materials Research*, pp. 147-168.
33. *Evidence for the Presence of Secondary Calcium Phosphate in Bone and its Stabilization by Acid Production.* **Neuman WF, Bareham BJ.** 1975, *Calcif. Tiss. Res.*, pp. 161-172.
34. *Identification of Brushite in Bone Mineral.* **L., Roufosse.** 1979, *Journal of Ultrastructure Research*, pp. 235-255.
35. *Hight Resolution Electrón Mycroscopyof Apatite Crystals UIT Octocalcium Phosphate Inclusion.* **Iijima M, Tohda H, Suzuki H, Yanagisawa T, Moriwaki Y.** 1991, *Japanese Journal of Oral Biology*, pp. 495-499.
36. **MJ, Glimcher.** *Disorders of Bone and Mineral Metabolism.* U.S.A. : Ed. Fredric L. Coe and Murray J. Favus, 1992.
37. *Characterization of very young mineral phases of bone by slid state 31 phosphorus magic angle sample spinning nuclear magnetic resonace and X Raydiffraction.* **Roberts JE, Bonar LC, Griffin RG, Glimcher MJ.** 1992, *Calcif Tissue Int* 1992, pp. 42-48.
38. *The effect of phase differences on time-dependet variation of the zeta potential of hydroxyapatite .* **Ducheyne P, Groschner M, Volg G, Plenck H, Eschberger J, Fratzi-Zelman N, Koller K, Klaushofer K.** 1992, *Journal of Biomedical Materials Research*, pp. 147-168.

39. *Determination of calcium, phosphorus, and the calcium/phosphorus ratio in cortical bone from the human femoral neck by neutron activation analysis.* **Zaichik V, Tzaphlidou M.** 2002, *Applied Radiation and Isotopes*, pp. 781-786.

40. *Dynamic aspects of the implant-bone interface.* **Osborn JF, Newesely H.** Munich : *Dental Implants: materials and systems.* , 1980, pp. 111-123.

41. *Bone structure, metabolism and physiology: its impacts on dental implantology.* **Marx RE, Gorg AK.** 1998, *Implant Dent* , pp. 267-276.

42. **L., Sennerby.** *On the bone tissue response to titanium implants* . University of Goteborg. Goteborg : s.n., 1991.

43. *Osseointegration and occlusal rehabilitation.* **Hobo S, Ichida E, García LT.** Chicago : s.n., 1991, pp. 33-56.

44. **M., Spector.** *Current concepts of bone ingrowth and remodelling.* New York: Raven Press : In Fitzgerald R Jr, 1988. pp. 69-85.