

Recubrimientos nanoestructurados para
implantes metálicos ortopédicos

Informe Final para la Fundación Domingo Martínez de las actividades realizadas con su Ayuda a la Investigación 2015 en el Área de Materiales, Tema 1.- Tratamientos superficiales de protección de implantes metálicos ortopédicos.

Investigador Principal:

Dr. José Miguel García-Martín
Inst. de Microelectrónica de Madrid, CSIC



Miembros del Equipo Investigador:

-En el Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla, CSIC:

Dr. Rafael Álvarez
Dr. Alberto Palmero



-En la Facultad de Farmacia de la UCM:

Dra. Isabel Izquierdo-Barba
Dr. Daniel Arcos
Prof. María Vallet-Regí



-En Nano4Energy:

Ambiörn Wennberg
Dr. Iván Fernández



Abril 2016

Índice

	página
I.-Introducción.	3
II.- Objetivo 1: Optimización del recubrimiento nanoestructurado.	4
• Fabricación de los recubrimientos.	4
• Estudio de la hidrofobicidad.	7
• Ensayos in vitro.	11
○ Co-cultivos osteoblastos-Staphylococcus aureus.	12
○ Estudios de adhesión bacteriana con Staphylococcus epidermidis.	15
III.- Objetivo 2: Escalado industrial del proceso de fabricación de los recubrimientos nanoestructurados.	17
• Optimización de los parámetros en el sputtering industrial.	18
○ Mejora de la adhesión.	21
• Recubrimiento de implantes ortopédicos.	26
○ Placa pseudorectangular.	27
○ Placa tubular.	31
IV.- Perspectivas futuras: estudios in vivo.	35
V.- Conclusiones.	37
VI.- Referencias.	37
VII.- Diseminación de resultados.	38
VIII.- Agradecimientos.	39

I.-Introducción.

Nuestro proyecto aborda la fabricación y el estudio de recubrimientos antibacterianos para implantes metálicos. Esos recubrimientos están nanoestructurados y se obtienen mediante pulverización catódica (sputtering en inglés), una técnica de deposición física en fase vapor. Consiste en generar un plasma con iones de argón que son acelerados contra un blanco (titanio en nuestro caso) donde, gracias a su gran energía cinética, arrancan átomos que posteriormente se depositan sobre el sustrato (el implante metálico). Para que el recubrimiento esté nanoestructurado es necesario que el flujo atómico no llegue perpendicular al sustrato (incidencia normal) sino que lo haga con un cierto ángulo (incidencia oblicua: para ello basta inclinar el sustrato): de este modo, los primeros átomos depositados generan un efecto de sombra que provoca la formación de columnas de tamaño nanométrico [Alvarez13]. Es una técnica que es viable a nivel industrial: por un lado, es una técnica de vacío, por lo que no se generan residuos agresivos con el medioambiente, y por otro, es eficiente desde un punto de vista energético, ya que la fabricación se realiza con un número muy reducido de pasos y a temperatura ambiente.

Cuando presentamos la solicitud a la Fundación Domingo Martínez, ya sabíamos que este tipo de recubrimientos nanocolumnares presentaban prestaciones prometedoras: en experimentos *in vitro* con *Staphylococcus aureus* demostramos que las nanocolumnas tenían un comportamiento antibacteriano (disminuye la adhesión bacteriana y se impide la formación del biofilm bacteriano) sin afectar a su biocompatibilidad, pues en experimentos posteriores las células que regeneran los huesos, los osteoblastos, sí proliferaban y conservaban su actividad mitocondrial. La acción antibacteriana es debida a la gran rugosidad y al patrón de topografía en la nanoescala que presentan las superficies del recubrimiento, y no al empleo de elementos bactericidas que podrían provocar toxicidad. Estos resultados están compilados en un artículo en una revista de alto impacto (Acta Biomaterialia, factor de impacto: 5,7) aparecido en 2015 [Izquierdo-Barba 15].

Por tanto, con la Ayuda de la Fundación Domingo Martínez nos hemos planteado dos objetivos principales: la optimización de los recubrimientos nanoestructurados (mejora de sus prestaciones) y el escalado industrial del proceso de fabricación de los mismos. El primero tiene un carácter eminentemente científico, mientras que el segundo posee un carácter más tecnológico.

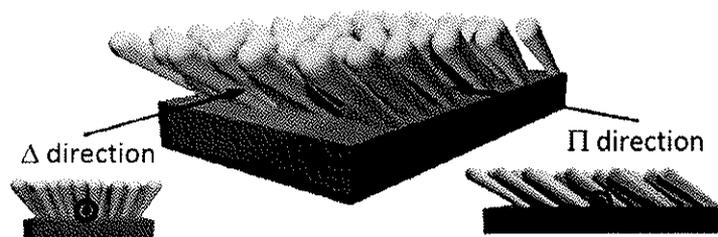


Fig. 1: Definición de direcciones en los recubrimientos nanocolumnares.

II.- Objetivo 1: Optimización del recubrimiento nanoestructurado.

Fabricación de los recubrimientos.

Cuando iniciamos este proyecto, todos los ensayos *in vitro* que habíamos realizado hasta entonces, y que aparecían compilados en la publicación ya mencionada, se habían llevado a cabo con recubrimientos fabricados con características idénticas: ángulo del sustrato=80°, duración de la deposición=155min, potencia=300W, presión=0.15 Pa. Por ello, el primer paso en nuestro trabajo ha sido la fabricación de muestras empleando ahora diversas variaciones de esos parámetros, para mejorar las características del recubrimiento.

Hemos empleado el equipo de sputtering del Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM) para recubrir con Ti dos tipos de materiales: a) implantes metálicos de Ti6Al4V de pequeño tamaño (discos con 1 cm de diámetro y 1 mm de espesor) pulidos a espejo, de forma que su rugosidad promedio (media cuadrática o RMS: root mean square) medida por microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es de 3nm; b) sustratos de silicio (rugosidad RMS: 0.5nm) que se pueden clivar con facilidad para obtener imágenes en cortes transversales. Las muestras con recubrimientos con distintas morfologías se obtuvieron variando los parámetros de fabricación adecuados:

-Ángulo del sustrato: este parámetro regula el ángulo de incidencia sobre el sustrato del haz atómico emitido desde el blanco e influye en los procesos de sombra (responsables de generar estructura columnares inclinadas no coalescentes para incidencia en ángulo rasantes), así como en la distancia entre estructuras. Lo hemos variado entre 0° y 85° con respecto al flujo atómico.

-Duración de la deposición: en primera aproximación, la longitud de las columnas es, para un ángulo fijo y para una misma potencia, directamente proporcional a la duración del proceso de deposición. Hemos empleado tiempos entre 70 y 200 minutos.

-Potencia electromagnética: al variarla se regula el número de átomos que llegan al sustrato por unidad de tiempo, esto es, la tasa de deposición. En concreto, aumentar la potencia electromagnética implica aumentar la densidad de iones y electrones así como el flujo de aquellos hacia el blanco del que se arrancan los átomos, lo que produce un aumento de la tasa de átomos eyectados del blanco. Hemos empleado potencias entre 40 W y 300 W. La longitud de las nanocolumnas depende linealmente de la potencia, pero no hemos observado diferencias significativas ni en el diámetro ni en el ángulo de inclinación de las mismas. Por ello, y para ganar tiempo, la mayor parte de las muestras se han fabricado con ese último valor.

-Presión del gas en la cámara de vacío: tiene gran relevancia a la hora de alterar las poblaciones de especies cargadas del plasma, así como de regular el número de colisiones que sufren los átomos eyectados desde el blanco y por tanto su grado de termalización. A baja presión de argón, los átomos que viajan desde el blanco hacia el sustrato no colisionan en su trayectoria (régimen balístico), llegan por tanto con una dirección de incidencia oblicua y el efecto de sombra favorece la formación de nanocolumnas inclinadas. Sin embargo, si se emplea una presión más alta, aumenta el número de colisiones que experimentan los átomos

durante su trayectoria, con lo que éstos pierden direccionalidad y las columnas que se generan son más verticales y están más juntas, llegando a producirse la coalescencia de las mismas (y por tanto la formación de un recubrimiento rugoso pero sin columnas separadas) para valores demasiado altos. Hemos trabajado con cuatro valores distintos: 0.15, 0.5, 1 y 1.5 Pa.

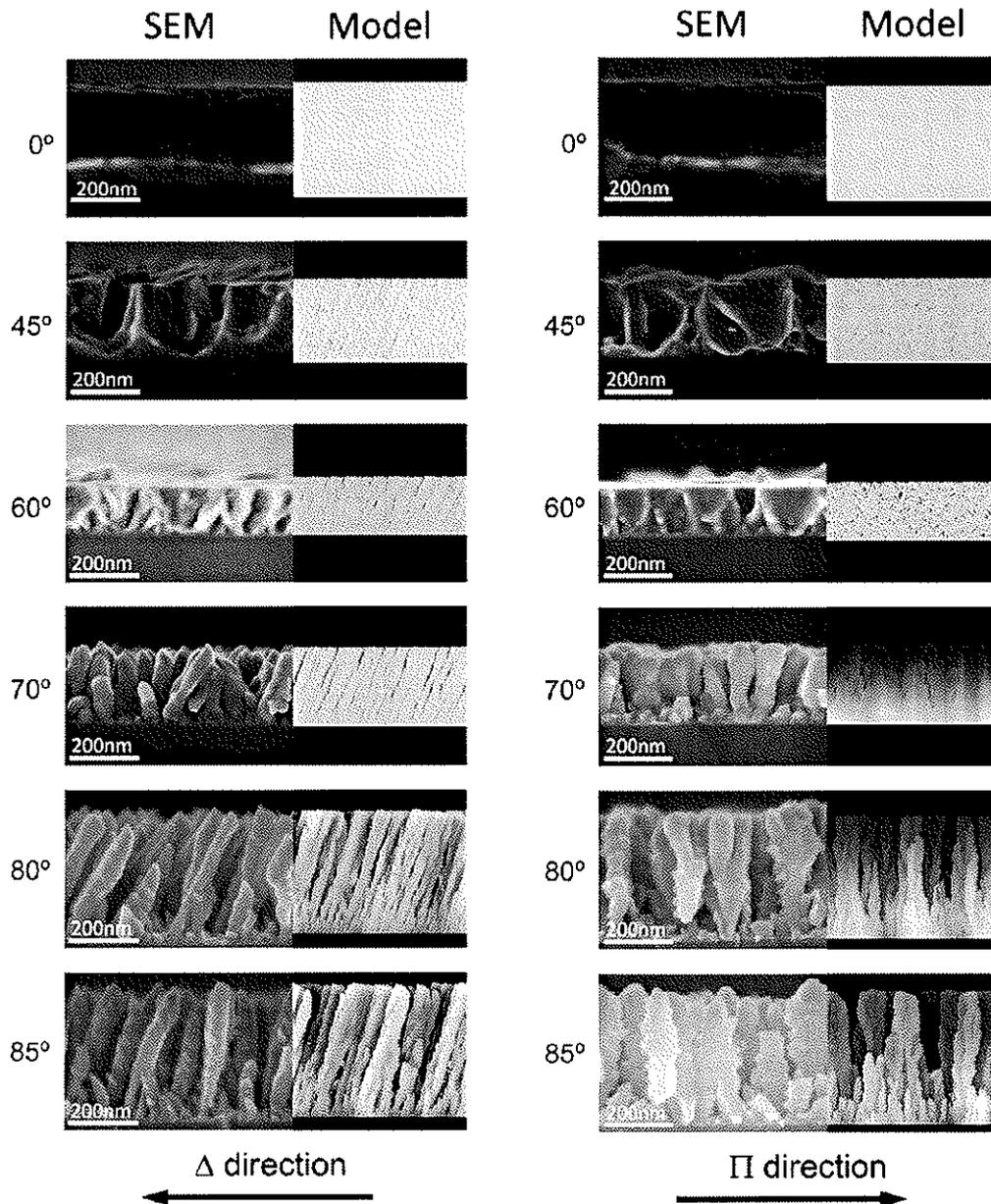


Fig. 2: Imágenes de SEM de cortes transversales de los recubrimientos obtenidos con 0.15 Pa de presión de Ar para distinto ángulo de inclinación del sustrato de silicio durante la deposición.

Para entender la morfología de las muestras fabricadas hay que tener en cuenta que el flujo atómico genera una anisotropía, por lo que es necesario distinguir dos direcciones: la

proyección en el plano del sustrato de la dirección que tiene dicho flujo, que denominamos Δ , y la perpendicular a la misma, que llamamos Π . La Fig. 1 presenta un esquema aclaratorio.

Los resultados más interesantes son los obtenidos en condiciones de baja presión: existe un ángulo crítico de inclinación a partir del cual se produce una transición abrupta desde una película continua a un recubrimiento nanoestructurado formado por columnas separadas y orientadas casi verticalmente. En la Fig. 2, que presenta imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de muestras fabricadas con la presión más baja empleada (0.15 Pa), ese fenómeno es evidente: sólo para ángulo de inclinación igual o superior a 70° se obtienen nanocolumnas.

Esa transición puede además inducirse, para determinados valores fijos de inclinación del sustrato, aumentando ligeramente la presión del gas. Por ejemplo, la Fig. 3 presenta los recubrimientos obtenidos utilizando 0.5 Pa: nótese que a esta presión, con 60° de inclinación ya se obtienen columnas separadas, en clara diferencia a lo que sucedía a 0.15 Pa (recuérdese la Fig. 2).

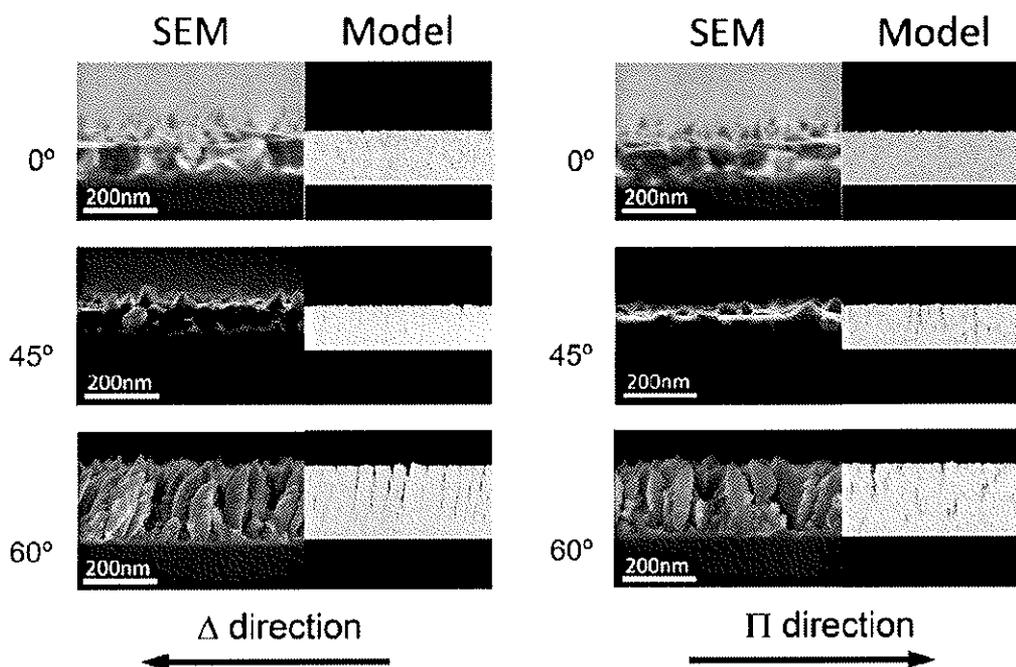


Fig. 3: Imágenes de SEM de cortes transversales de los recubrimientos obtenidos con 0.5 Pa de presión de Ar para distinto ángulo de inclinación del sustrato durante la deposición.

Por último, los recubrimientos obtenidos utilizando 1 y 1.5 Pa de presión ya no presentan columnas separadas para ningún valor del ángulo de inclinación.

Hemos elaborado un modelo de tipo Monte Carlo que explica toda esta fenomenología, en los que juegan un papel importante los denominados procesos hipertérmicos, esto es, los procesos de movilidad atómica debido a la alta energía de los átomos que llegan al sustrato. Estos resultados, así como detalles específicos sobre la física involucrada, los hemos publicado recientemente [Alvarez16].

Una vez fabricadas las muestras, hemos estudiado dos aspectos cruciales para la aplicación final en implantes ortopédicos: la hidrofobicidad del recubrimiento y la respuesta en ensayos in vitro.

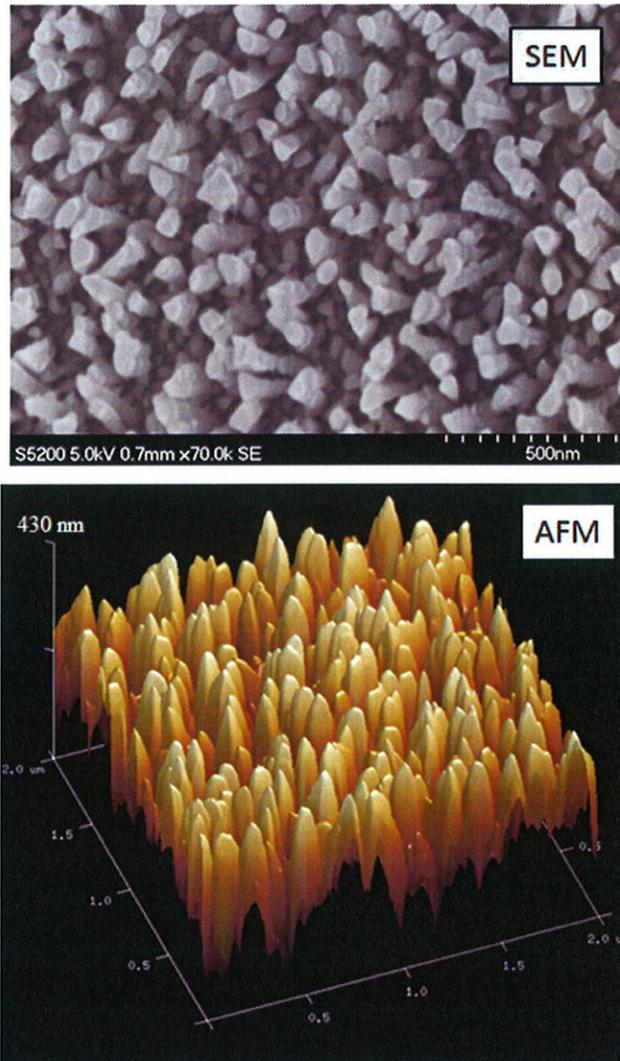


Fig. 4: Imágenes de SEM (superior) y AFM de 2 micras de lado representada en 3D (inferior) de un recubrimiento fabricado sobre silicio durante 200 min con 0.15 Pa de presión, 85° de inclinación y 300 W de potencia.

Estudio de la hidrofobicidad.

Las propiedades antibacterianas del recubrimiento se deben a la formación de una superficie con nanocolumnas o nanopilares, similar a la que se observa en las alas de la cigarra de tipo cicada y en las hojas de la flor de loto. Y al igual que sucede en esas dos estructuras biológicas, el recubrimiento nanoestructurado presenta hidrofobicidad [Ivanova12]. Por ello, la medida del grado de hidrofobicidad es una forma indirecta y rápida de estimar si el recubrimiento va a presentar o no comportamiento antibacteriano, que depende de las dimensiones verticales y laterales de las nanocolumnas. La Fig. 4 presenta unas imágenes obtenidas por SEM y AFM de

uno de los recubrimientos fabricados, donde queda claro que está formado por nanocolumnas.

La medida de la adhesión entre dos materiales es una manifestación de las fuerzas atractivas que están presentes entre sus átomos y que se pueden dividir en dos categorías: primarias (químicas) y secundarias (van der Waals). Esta segunda categoría es la responsable de las interacciones superficiales, sin la necesidad de enlaces químicos [Owens69], y es la que sucede entre el recubrimiento nanocolumnar y un líquido puesto en contacto con él.

De acuerdo con la ecuación de Young, existe una relación entre el ángulo de contacto θ , la tensión superficial del líquido γ_{LV} , la tensión superficial entre líquido y sólido γ_{SL} y la energía libre superficial del sólido γ_{SV} :

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (1)$$

Por tanto para determinar la energía libre superficial a partir del ángulo de contacto, la segunda variable γ_{SL} debe determinarse. La energía libre superficial se ha determinado mediante el método de Owens-Wendt-Rabel-Kaelble [Owens69, Kaelble70], que expresa la energía libre superficial del líquido (γ_{LV}) y del sólido (γ_{SV}) como la suma de sus componentes dispersa y polar:

$$\gamma_{LV} = \gamma_{LV}^d + \gamma_{LV}^p \quad (2)$$

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SV}^d + \gamma_{SV}^p \quad (3)$$

donde γ_{LV}^d y γ_{SV}^d son las componentes dispersas de la energía libre superficial del líquido y del sólido, respectivamente, y γ_{LV}^p y γ_{SV}^p son las componentes polares de la energía libre superficial del líquido y del sólido, respectivamente.

Por otra parte, la energía libre interfacial sólido-líquido (γ_{SL}) puede calcularse como la media geométrica de las contribuciones del líquido y del sólido:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - 2 \left(\sqrt{\gamma_{SV}^d \cdot \gamma_{LV}^d} + \sqrt{\gamma_{SV}^p \cdot \gamma_{LV}^p} \right) \quad (4)$$

Sustituyendo γ_{SL} en la ecuación de Young (ecuación 1) se obtiene que:

$$\gamma_{LV} (1 + \cos \theta) = 2 \sqrt{\gamma_{SV}^p \gamma_{LV}^p} + 2 \sqrt{\gamma_{SV}^d \gamma_{LV}^d} \quad (5)$$

Linearizando la ecuación 5, podemos obtener las componentes polar (γ_{SV}^p) y dispersa (γ_{SV}^d) de la energía libre superficial del sólido como la pendiente y la ordenada en el origen de la ecuación 6, respectivamente, cuya suma da como resultado el valor de la energía libre

superficial. Se pueden emplear líquidos de prueba cuyos valores de la tensión superficial (γ_{LV}) y de sus componentes polar (γ_{LV}^p) y dispersa (γ_{LV}^d) son conocidos (Tabla 1) donde al menos alguno de ellos debe tener componente polar positiva: el agua en la que predomina la componente polar de la tensión superficial, el diyodometano en el que la componente polar es cero y la formamida y el etilenglicol en los que la componente dispersa representa más del 60%.

$$\frac{0,5 \gamma_{LV} (1 + \cos\theta)}{(\gamma_{LV}^d)^{1/2}} = \sqrt{\gamma_{SV}^p} \left(\frac{\gamma_{LV}^p}{\gamma_{LV}^d} \right)^{1/2} + \sqrt{\gamma_{SV}^d} \quad (6)$$

Tabla 1. Tensión superficial y componentes dispersa y polar de los líquidos de prueba.

Disolvente	γ_{LV} (mJ/m ²)	γ_{LV}^d (mJ/m ²)	γ_{LV}^p (mJ/m ²)
Agua	72,8	21,8	51,0
Formamida	58,0	39,0	19,0
Etilenglicol	48,0	29,0	19,0
Diyodometano	50,8	50,8	0

De acuerdo con este modelo de dos componentes de la energía libre superficial, la tensión de interfase depende de las dos componentes polar y dispersiva de la energía libre del material con la fase adyacente. Por ejemplo, la tensión superficial con respecto al agua como líquido polar es menor cuando el sólido es también polar, con lo que el ángulo de contacto es pequeño. Si por otro lado, la parte polar del sólido es pequeña, entonces el término de la raíz cuadrada toma un valor bajo y las interacciones polares tienen entonces una pequeña contribución reduciendo la tensión superficial; esto se corresponde con un alto valor de ángulo de contacto.

En la Fig. 5 se presenta el valor del ángulo de contacto de recubrimientos de titanio fabricados con una presión de Ar de 0.15 Pa y distinto ángulo de inclinación del sustrato con respecto al flujo atómico, tanto sobre sustratos de Si como sobre discos de TiAlV. Se ha utilizado agua como líquido polar y diyodo-metano como líquido apolar. En la Fig. 6 se presenta el resultado de aplicar el método de Owens-Wendt-Rabel-Kaelble a partir del ángulo de contacto con esos dos líquidos de distintas polaridades.

Tanto de la Fig. 5 como de la Fig. 6 es posible deducir que, de los recubrimientos fabricados con esa presión de gas de 0.15 Pa, aquellos fabricados con ángulo de inclinación de al menos 70° presentan un comportamiento hidrófobo similar, pues ni el ángulo de contacto ni la energía libre superficial cambian apreciablemente en el rango de ángulos de inclinación entre 70 y 90°. Y tampoco cambian si el sustrato es silicio o si es un disco de TiAlV. Si recordamos la Fig. 2, ese ángulo de inclinación de 70° es también el que marca la transición entre recubrimientos rugosos y recubrimientos nanocolumnares. Podemos pues afirmar que lo importante para tener hidrofobicidad, y por tanto esperar un comportamiento antibacteriano, es tener nanocolumnas bien definidas.

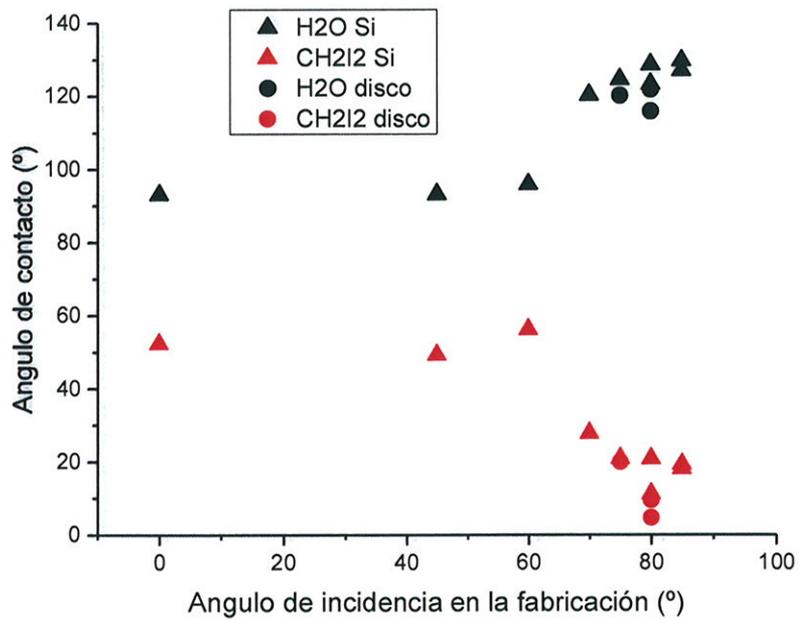


Figura 5. Ángulo de contacto para agua y para diyodo-metano de muestras de titanio crecidas a 0.15Pa con distintos ángulos de incidencia del material depositado sobre Si (triángulos) y sobre discos de TiAlV (círculos).

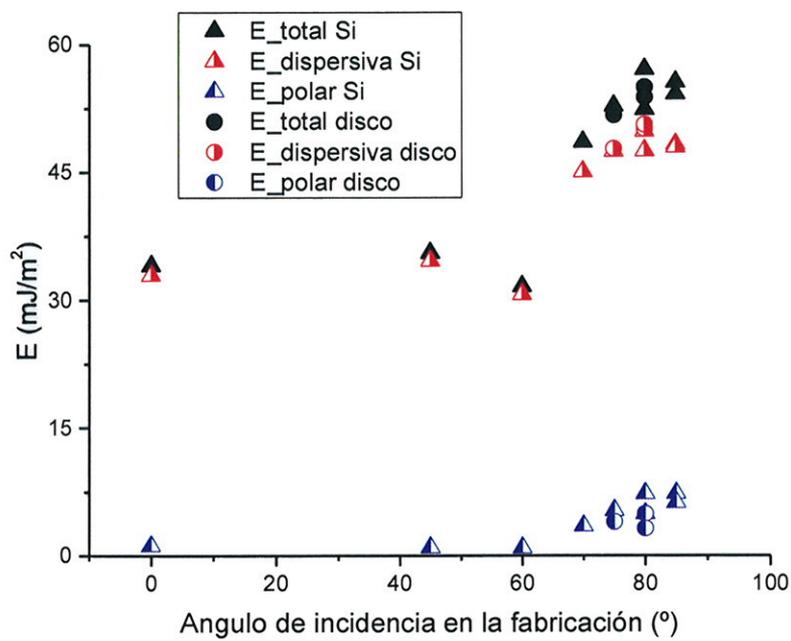


Fig. 6: Energía libre superficial de muestras de titanio crecidas a 0.15Pa con distintos ángulos de incidencia del material depositado sobre Si (triángulos) y sobre discos de TiAlV (círculos). Se presentan también las componentes dispersiva y polar de la energía libre superficial de cada muestra.

De cara a la aplicación final, interesa abaratar los costes en la fabricación de los recubrimientos sin que haya una merma en sus propiedades. Por consiguiente, interesa que las nanocolumnas sean cortas (menor duración del proceso de deposición) y que el ángulo de inclinación no sea muy exigente, es decir, no estar cerca ni del valor límite de 70° (pues cualquier desviación hacia ángulos menores provocaría una merma en el comportamiento hidrófobo) ni de inclinaciones excesivas (ángulos superiores a 80° implican un flujo atómico muy rasante a la superficie del sustrato y por tanto poca deposición de material, lo que obligaría a aumentar la duración del proceso). Por ello, consideramos que de todos los recubrimientos estudiados, el óptimo es el fabricado con 75° de inclinación y unos 300nm de longitud, que corresponden en el equipo del IMM con las condiciones utilizadas (0.15 Pa, 300W) a 70min de deposición. Comparando esos parámetros con los que usábamos en un principio (80° y 155min), podemos ver que el nuevo tiempo de deposición ha disminuido a menos de la mitad, por lo que se ha conseguido un ahorro energético superior al 50%.

Ensayos *in vitro*.

Pensando en la aplicación final, todos los ensayos *in vitro* se han realizado empleando los implantes metálicos de Ti6Al4V con forma de disco con 1 cm de diámetro, comparando implantes desnudos (sin recubrir) con implantes recubiertos con nanocolumnas de titanio. La Fig. 7 presenta una fotografía de ambos tipos.

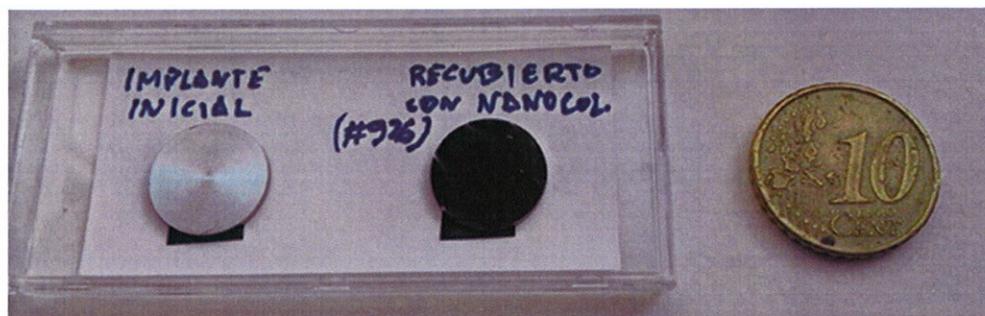


Fig. 7: Fotografía mostrando dos discos de Ti6Al4V de 1cm de diámetro, uno sin recubrir y otro recubierto con nanocolumnas de Ti.

La morfología del recubrimiento sobre los discos de Ti6Al4V la hemos analizado tanto con SEM (Fig. 8) como con AFM (Fig. 9), comprobándose que está formado por nanocolumnas de Ti. Conviene señalar que por AFM se mide una altura de columna menor que la esperada (300nm), pero eso es debido al instrumento: la punta del AFM tiene forma de pirámide invertida, y por tanto no puede penetrar hasta el fondo del espacio entre columnas (es decir: no puede llegar hasta el sustrato).

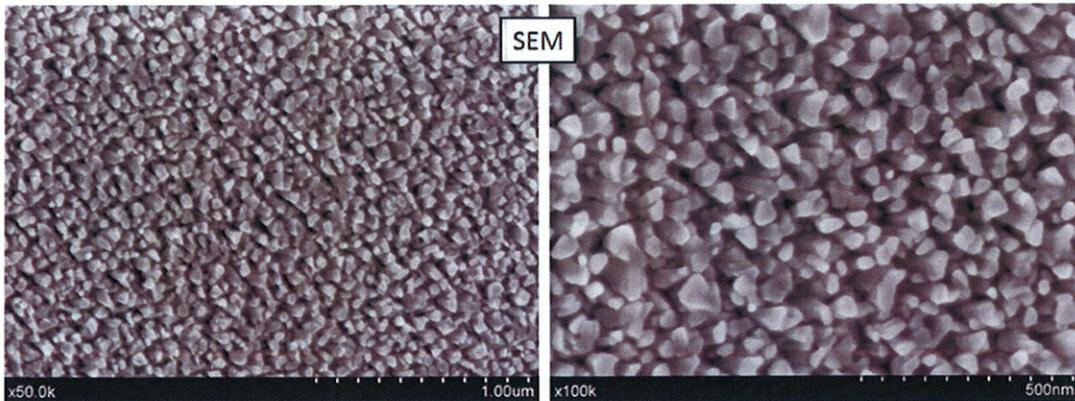


Fig. 8: Imágenes SEM obtenidas en la superficie de un disco recubierto con nanocolumnas de Ti.

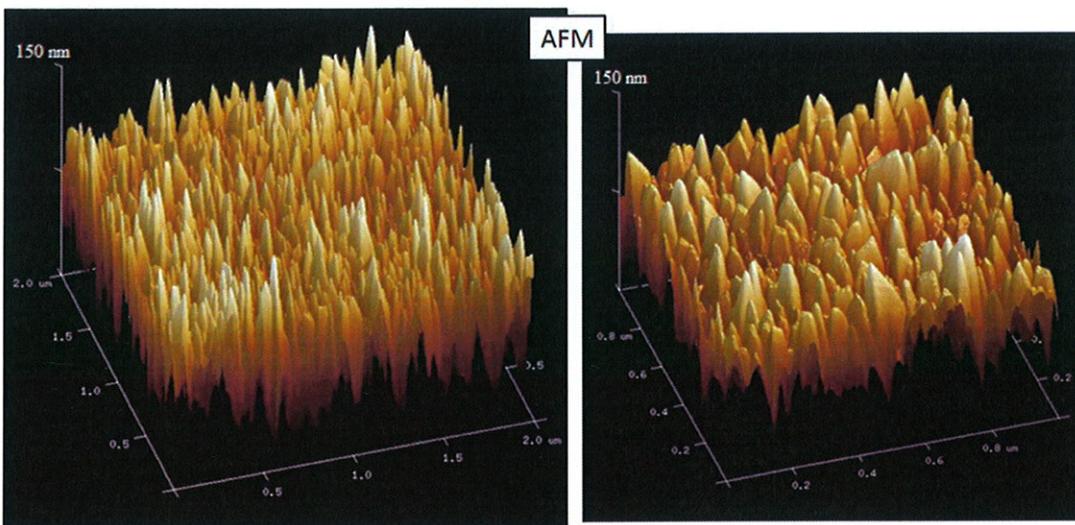


Fig. 9: Imágenes de AFM de 2 y 1 micras de lado obtenidas en la superficie de un disco recubierto con nanocolumnas de Ti.

Hemos realizado dos tipos de ensayos *in vitro*: 1) Estudios de co-cultivos osteoblastos-*Staphylococcus aureus*, y 2) Estudios de adhesión bacteriana con *Staphylococcus epidermidis*.

Co-cultivos osteoblastos-*Staphylococcus aureus*.

El destino final de un implante ha planteado una hipótesis como una "carrera por la superficie" entre la adhesión bacteriana y los osteoblastos [Anselme10]. A fin de probar esta hipótesis, se han desarrollado sistemas de co-cultivo formados por pre-osteoblastos MC3T3 y bacterias *staphylococcus aureus* (bacteria más común de las infecciones) entre los dos tipos de superficie, implante inicial (desnudo) e implante recubierto con nanocolumnas de titanio.

-Cultivos de pre-osteoblastos MC3T3:

Los preosteoblastos se descongelaron y se cultivaron en botellas de cultivo a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% con α -DMEM complementando con 1% de antibióticos y 10% suero fetal bovino (FCS). El medio se cambió al día siguiente y después cada tres días hasta que la confluencia

llegó al 90%. Los preosteoblastos fueron entonces recolectados con 0,05% de tripsina con EDTA. Los osteoblastos se cuantificaron utilizando azul de tripan y un hemocytometer.

-Cultivos de bacterias *staphylococcus aureus*:

Los cultivos de *S. aureus* se realizaron en caldo de cultivo tryptic soy broth (TSB) durante 18 h a 37°C y en agitación orbital. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el sedimento de bacterias se lavó suavemente con 1 mL de PBS (3 x). Finalmente el sedimento se resuspendió en PBS, en una serie de diluciones hasta obtener una concentración específica de bacterias. La concentración de bacterias se determinó por turbidimetría.

-Co-cultivo preosteoblastos-bacterias:

Las diferentes muestras, una vez esterilizadas con calor seco a 200°C durante toda la noche, se colocaron en placas de 24 pocillos. El medio de cultivo utilizados en estos ensayo está exento de antibióticos y formado por un 98% de α -DMEM, 2% de TSB y 10% FCS. Las células preosteoblásticas se resuspendieron en el medio de cocultivo en una concentración de 10^5 células/mL. Las bacterias fueron resuspendidas en dicho medio a una concentración de 10^8 bacterias/mL. Las diferentes suspensiones fueron sembradas simultáneamente sobre las diferentes muestras hasta un volumen total de 2 mL. Se utilizaron como control las diferentes piezas con solo preosteoblastos (10^5 células/pieza) y con solo bacterias (10^8 bacterias/pieza). Los cocultivos se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% durante 6 horas. Para el estudio por microscopia de confocal, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS con 1% (w / v) de sacarosa a 37°C durante 40 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se permeabilizaron con una solución de 0,5% de Triton X-100 (10,3 g de sacarosa, 0,292 g de NaCl, 0,06 g de MgCl₂, 0,476 g de 4-(2 hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico ácido (HEPES), 0,5 mL de Triton X-100 en 100 ml de agua, pH 7,2) a 4°C para 5 min. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con una solución de 1% (w / v) de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS a 37°C durante 20 minutos. A continuación, las muestras se incubaron durante 10 min con Atto 565 conjugado con faloidina (dilución 1:40) que tiñe los filamentos de α -F-actin del citoplasma de las células osteoblastocas, lavándose las muestras posteriormente con PBS. Finalmente, el material genético se tiñó con 3 μ L de (4',6-diamino-2-fenilindol) DAPI. Después de esta tinción se lavó con PBS, y se examinaron en un láser Biorad MC1025 confocal microscopio de barrido. La fluorescencia de Atto 565 se excitó al 563 nm y emite a 592/30 nm. La fluorescencia del DAPI se excitó a 405 nm y se midió a 420- 480 nm.

-Resultados:

La Fig. CF1 muestra la superficie de ambos tipos de discos sembradas solo en presencia de osteoblastos con una concentración de 10^5 células/pieza. Puede observarse una excelente extensión osteoblástica en ambas superficies, apareciendo mayor cantidad en el caso de la superficie recubierta con nanocolumnas. El espesor de las células es significativamente mayor en el caso de la superficie recubierta, pues presenta un valor de 25 micras que contrasta con las 14 micras obtenidas respecto al disco desnudo. Se están realizando estudios cuantitativos de la cantidad de preosteoblastos adheridos a ambas superficies a diferentes tiempos con el

fin de determinar si existen diferencias significativas en la adhesión osteoblástica entre ambas superficies.

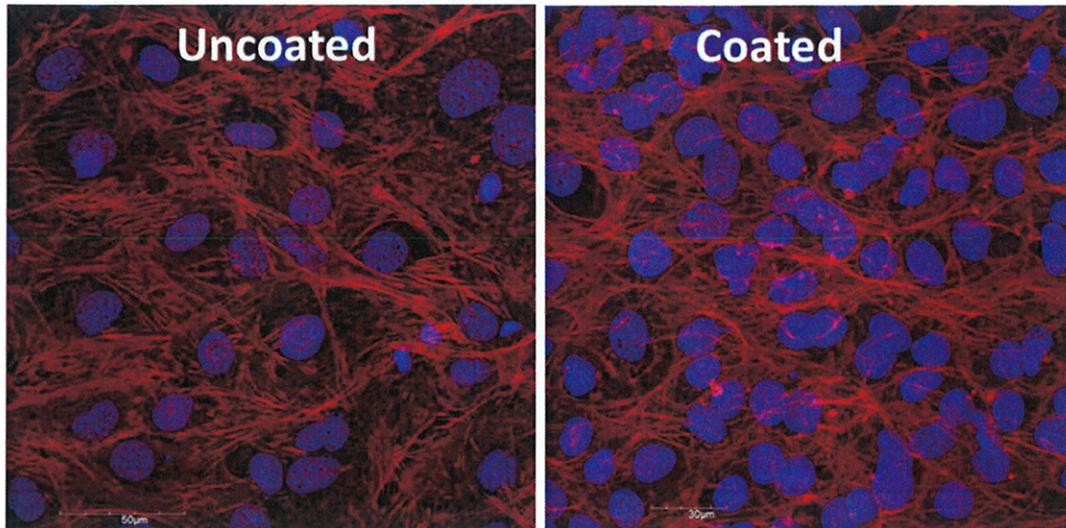


Fig. 10: Imágenes de microscopía confocal (x20) de un disco de Ti6Al4V desnudo y de otro recubierto con nanocolumnas de Ti cultivado con 10^5 pre-osteoblastos MC3T3 por pieza durante 6 horas.

La Fig. 11 presenta la superficie de ambas muestras sembradas solo en presencia de bacterias con una concentración de 10^8 bacterias/pieza. Existen diferencias muy significativas entre ambas superficies, con un efecto de potente inhibición bacteriana en la superficie recubierta. Los estudios semicuantitativos tomando 8 zonas al azar de estas piezas nos indican una reducción del 95% ($p < 0.05$) de adhesión bacteriana en la superficie recubierta con nanocolumnas.

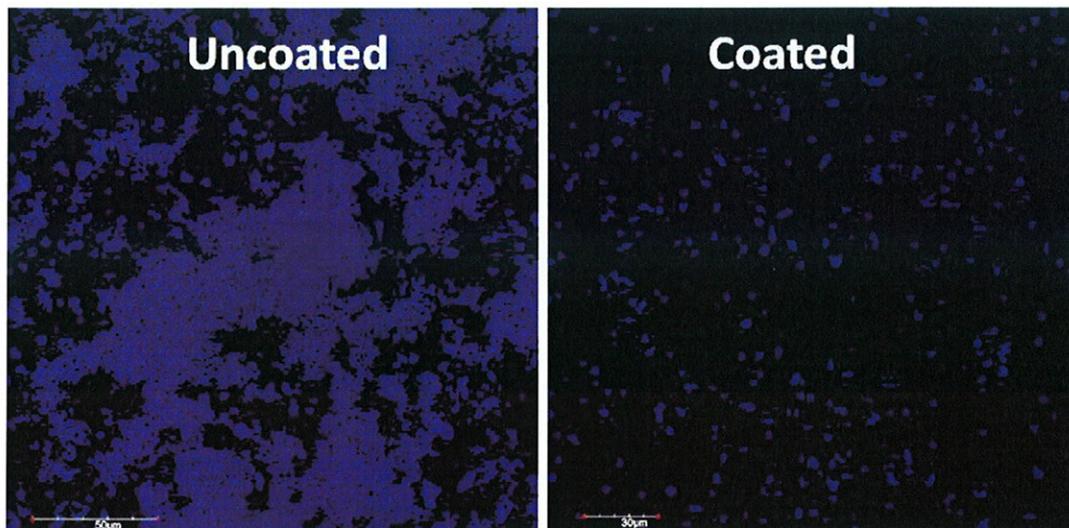


Fig. 11: Imágenes de microscopía confocal (x20) de un disco de Ti6Al4V desnudo y de otro recubierto con nanocolumnas de Ti cultivado con 10^8 S. aureus por pieza durante 6 horas.

En la Fig. 12 se observa la superficie de ambas muestras sembradas simultáneamente en presencia de células preosteoblásticas (10^5 células/pieza) y bacterias (10^8 bacterias/pieza). Se observa menor extensión celular en la superficie del implante inicial con respecto a la del implante recubierto, con la aparición de lagunas.

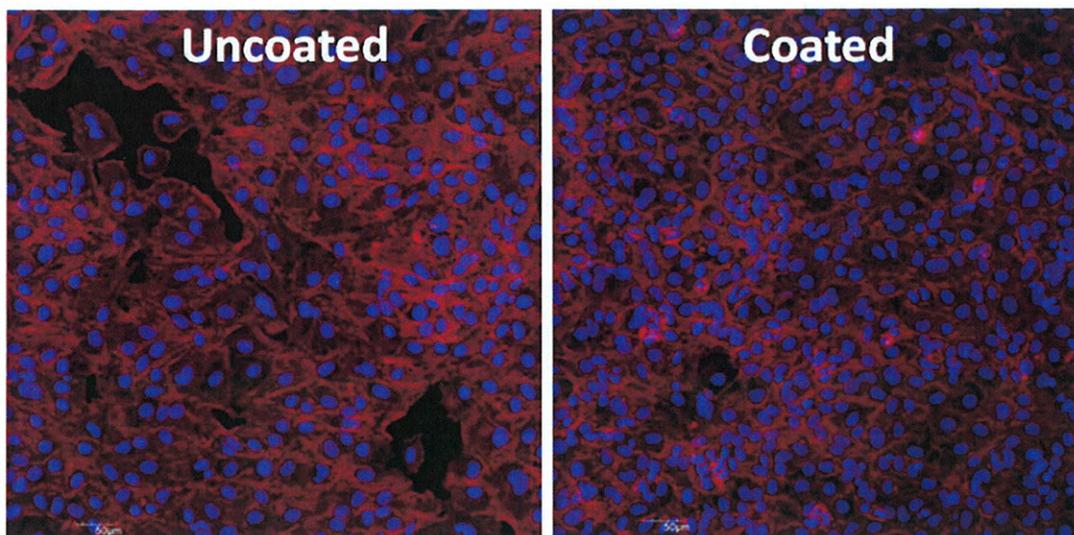


Fig. 12: Imágenes de microscopia confocal (x20) de un disco de Ti6Al4V desnudo y de otro recubierto con nanocolumnas de Ti cultivado con 10^8 *S. aureus* y 10^5 de MC3T3 por pieza durante 6 horas.

En definitiva, los resultados obtenidos nos muestran que la extensión preosteoblástica es más efectiva en el caso de la superficie recubierta que en el implante desnudo, con un menor estrés celular y con menor presencia de bacterias en la superficie. Se están realizando estudios complementarios para determinar especies oxidativas ROS en los co-cultivos. Asimismo se están llevando a cabo estudios de co-cultivos con un menor número de células preosteoblásticas y manteniendo constante la concentración de bacterias a 10^8 bacterias/pieza.

Estudios de adhesión bacteriana con *Staphylococcus epidermidis*.

Estos estudios no estaban contemplados en la propuesta inicial, pero hemos considerado interesante realizarlos, dado que hasta el momento sólo habíamos comprobado la efectividad de nuestros recubrimientos frente al *S. aureus*, que si bien es el principal agente patógeno causante de la infección en implantes, no es el único: de hecho, el *S. epidermidis* es responsable de un 30% de las infecciones [Campoccia06].

Antes de los ensayos de adhesión de bacterias, los discos con y sin recubrimiento se esterilizaron por calor seco a 200°C durante 12 h. Se realizaron estudios de adhesión sobre sus superficies utilizando la cepa de laboratorio ATCC 35984. Para los ensayos de adhesión, las bacterias se inocularon en caldo de cultivo tryptic soy broth (TSB) y se incubaron durante la noche a 37°C con 5% de CO_2 . Después del cultivo, las bacterias se centrifugaron durante 10 min a 3500 g a 22°C . a continuación, se retiró el sobrenadante y el sedimento se lavó tres

veces con PBS estéril. Las bacterias, a continuación, se suspendieron y se diluyeron en PBS hasta obtener una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias por ml medidas por turbidimetría. Diferentes superficies se inocularon con las suspensión bacteriana con un tiempo de inoculación de 90 min para permitir la adhesión en un modelo estático. A continuación se lavaron tres veces con PBS para eliminar cualquier bacteria no adherida. Por último, se tñeron durante 15 minutos con un kit de viabilidad bacteriana Live /Dead (Backlight™). La tinción se realizó con una mezcla de colorantes: SYTO 9 (bacterias vivas / verde) y yoduro de propidio (bacterias muertas / rojo). Para fluorescencia del SYTO 9, se excitó a 480/500 nm, con una fluorescencia emitida medida a 500 nm, y para la fluorescencia de yoduro de propidio se excitó a 490/635 nm, con una fluorescencia emitida medidos a 618 nm. Se tomaron ocho fotografías (40x) de cada con un microscopio de luz ultravioleta. La superficie cubierta con bacterias adheridas se calculó utilizando el software Image J. Los experimentos se realizado por triplicado. Se ha realizado un análisis estadístico con software usando EPI-INFO 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA).

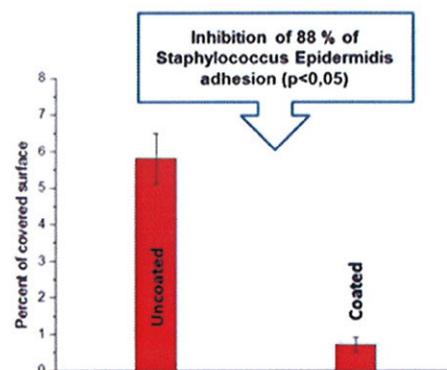


Fig. 13: Pruebas de adhesión bacteriana llevadas a cabo por inoculación de *S. epidermidis* ATCC 35984 en las superficies de un disco de Ti6Al4V desnudo y de otro recubierto. Se encuentran diferencias muy significativas, $p < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis.

Los resultados muestran que, en los implantes recubiertos con nanocolumnas de Ti, hay una disminución de la adhesión bacteriana para la *S. epidermidis* de casi un 88 % (ver Fig. 13). La Fig. 14 muestra una imagen representativa de ambas superficies tras 90 min de incubación con *S. epidermidis* por microscopia de fluorescencia, donde es posible apreciar a simple vista la gran diferencia existente: en el disco recubierto con nanocolumnas hay presentes muchas menos bacterias que sobre el implante inicial.

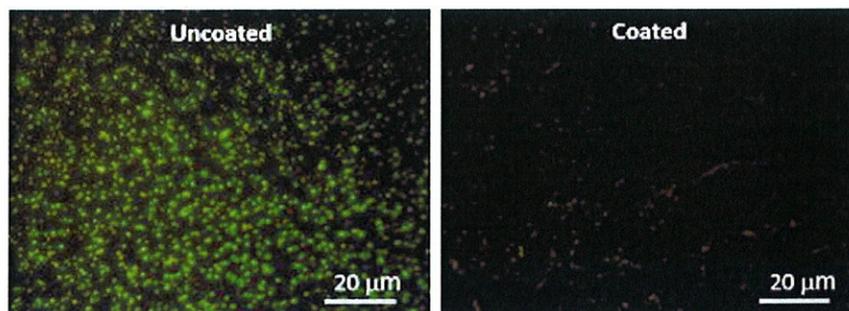


Fig. 14: Microscopias de fluorescencia correspondiente al ensayo de adhesión bacteriana con *S. epidermidis* durante 90 min de ensayo.

III.- Objetivo 2: Escalado industrial del proceso de fabricación de los recubrimientos nanoestructurados.

Este objetivo tiene un carácter más tecnológico, pues consiste en trasladar las condiciones de fabricación del recubrimiento, obtenidas a nivel de laboratorio, a un equipo empleado para producción industrial, en concreto perteneciente a la empresa Nano4Energy. Es un problema complejo, no sólo debido a la distintas geometrías de los blancos y las cámaras de deposición, sino también a la forma y dimensiones del implante a recubrir, ya que la superficie en este último caso es mucho mayor que la que se ha utilizado en las primeras etapas de la investigación, por lo que características tales como uniformidad y homogeneidad de las capas cobran especial relevancia.

En el equipo de laboratorio del IMM, el blanco de Ti es circular (diámetro: 5 cm), los sustratos tienen un área del orden de 1 cm² y están situados a 22 cm del blanco. Por su parte, en el equipo de deposición industrial de Nano4Energy, el blanco es rectangular y de dimensiones mucho mayores (20x7.5 cm²), la distancia al sustrato puede regularse empleando diversos adaptadores y la superficie a recubrir depende de las dimensiones del implante (podemos asumir que será del orden de 15cm²). Siguiendo los consejos de los asesores que tenemos como ganadores del premio de innovación biomédica IDEA2 Madrid, otorgado por el Consorcio M+Vision entre la Comunidad de Madrid y el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), hemos decidido centrar nuestros esfuerzos en las placas de fijación utilizadas en fracturas traumáticas abiertas, ya que el ratio de infección es muy alto (del 15% para pacientes con buena salud y superior al 20% si pertenece a grupos de riesgo) y tienen forma pseudorectangulares o tubulares con áreas de 5 a 20 cm².



Fig. 15: Equipo industrial de sputtering de Nano4Energy empleado para recubrir implantes ortopédicos.

Optimización de los parámetros en el sputtering industrial.

Hemos visto anteriormente que la presión del gas en la cámara de vacío tiene gran importancia a la hora de obtener recubrimientos nanocolumnares, y que para ello es necesario emplear una baja presión. En el equipo del IMM la presión más baja en la que el plasma es estable es de 0.15 Pa, mientras que en el de Nano4Energy es de 0.4 Pa. Por ello, en éste último equipo se necesita colocar el sustrato más cerca del blanco que en aquel, para que los átomos de Ti que incidan de forma oblicua (ángulo respecto a la normal $> 70^\circ$) sobre la superficie a recubrir hayan perdido poca energía y dirección. Hemos fijado entonces una distancia blanco-sustrato de 10 cm.

La Fig. 15 es una fotografía del equipo de Nano4Energy empleado y la Fig. 16 tiene esquemas de su geometría y del blanco de titanio.

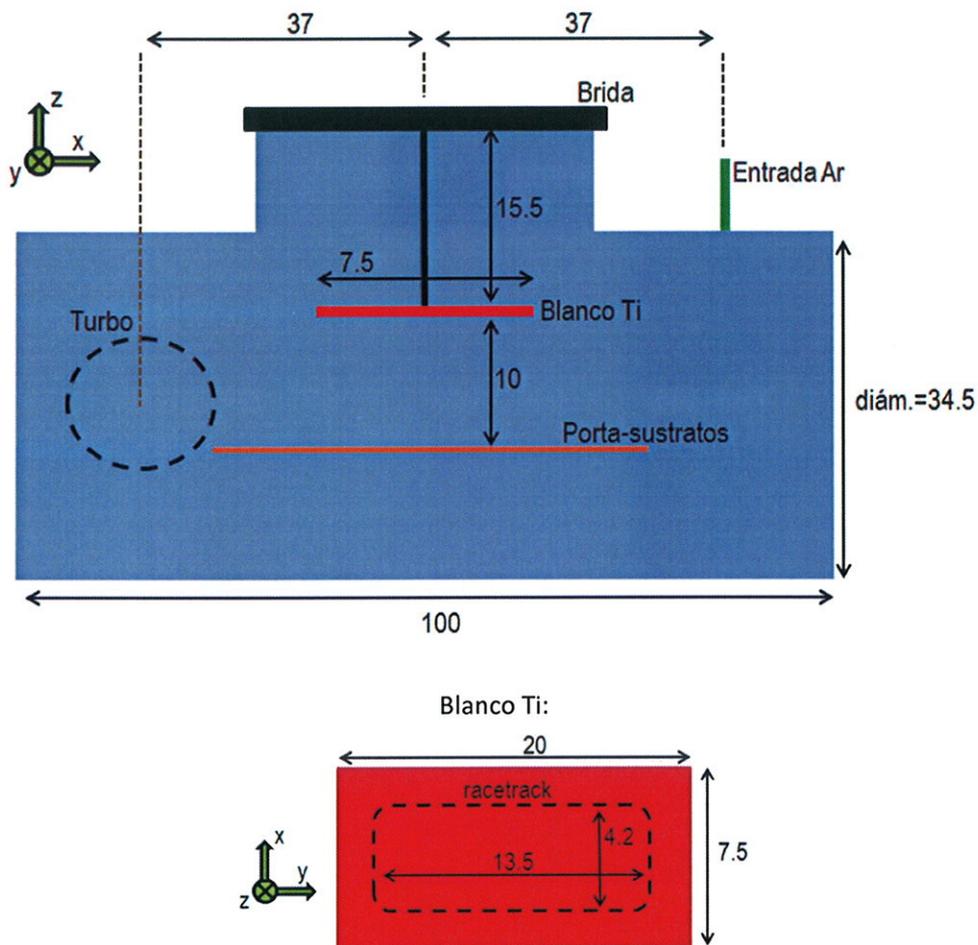


Fig. 16: Esquemas de la geometría y del blanco de titanio del equipo de sputtering de Nano4Energy. Todas las dimensiones son en cm.

Mediante el uso de simulaciones numéricas, hemos llevado a cabo un estudio detallado de las condiciones de deposición del recubrimiento para diversas posiciones relativas blanco-sustrato (implante). Esto nos ha permitido encontrar una configuración que consigue evitar el uso de máscaras y de sistemas motorizados de desplazamiento del sustrato, a la vez que posibilita la deposición simultánea en ambas caras, es decir, que se recubran con nanocolumnas las dos caras de la placa. Esta configuración aprovecha el hecho de que el pulverizado de átomos desde el blanco no se da de forma homogénea sobre toda la superficie del mismo, sino que los átomos salen preferentemente de la zona donde se concentra la incidencia de los iones del plasma, también conocido como “anillo de luz” o “racetrack”. Para blancos circulares, este anillo es una circunferencia concéntrica al blanco. De manera similar, para blancos rectangulares, más utilizados a nivel industrial, este anillo es una línea rectangular inscrita en el blanco (véase esquema en la Fig. 16). La configuración óptima encontrada aparece en la Fig. 17, donde el implante se coloca en una posición centrada frente al blanco, pero orientado de forma que las superficies de ambos sean perpendiculares entre sí. El lado corto de la placa se coloca según el eje z, mientras que el lado largo está alineado según el eje y. De esta forma, para las dimensiones del blanco existente, para una separación entre blanco y porta-sustrato de 10 cm y para un implante con forma de placa rectangular cuyo lado más corto fuese de 4 cm, el ángulo mínimo de llegada de los átomos a la superficie del implante sería de 71° aproximadamente, ya dentro del rango de formación de nanocolumnas verticales encontrado en los estudios en laboratorio. Si el lado corto de la placa fuese menor, el ángulo mínimo de incidencia de los átomos sería mayor, con lo que la formación de nanocolumnas durante el proceso de deposición quedaría siempre asegurada.

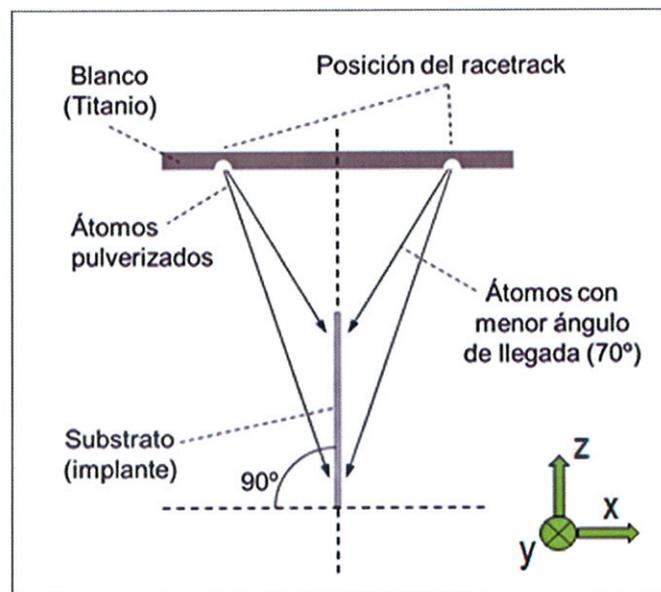


Fig. 17: Vista transversal de la configuración óptima para el escalado industrial de la deposición de Ti nanoestructurado en implantes (nueva geometría propuesta).

En la Fig. 18 hemos representado las funciones de distribución angular de los átomos de Ti al llegar a la superficie a recubrir, tanto en las condiciones de laboratorio como en la propuesta en la Fig. 17. En la Fig. 18(a) aparece la función de distribución de probabilidad de incidencia

angular (ángulo azimutal) en función de la energía cinética de los átomos de Ti calculada para las condiciones del reactor de laboratorio. En este caso, la incidencia se hace máxima para un ángulo de aproximadamente 80° , de acuerdo con el ángulo de inclinación del sustrato donde crece la película, y con una dispersión angular de alrededor 10° , para los átomos que llegan con energías inferiores a ~ 5 eV. Dicha dispersión disminuye alrededor del máximo a 80° a medida que aumentamos la energía. Estos átomos con alta energía resultan fundamentales para inducir procesos sobre la superficie del material, así como la aparición de estructuras columnares verticales. En la Fig. 18 (b) mostramos el mismo cálculo de función de distribución de probabilidad para la geometría propuesta para recubrir implantes: podemos apreciar la similitud con la Fig. 18(a), donde los átomos de Ti llegan con una incidencia más probable de 80° , una dispersión angular ligeramente mayor de 10° para los átomos con energías por debajo de 5 eV, pero con dispersión y distribución muy similar para aquellos con altas energías. La semejanza entre las Figuras 18(a) y 18(b) sugiere que el crecimiento de películas en la nueva configuración produciría el crecimiento de estructuras columnares muy similares a las obtenidas en el reactor de laboratorio. Esto se muestra en la Fig. 19, donde presentamos una vista lateral de una simulación del crecimiento del recubrimiento nanoestructurado de Ti que se obtendría en una de las caras de la placa empleando la nueva geometría ya detallada en la Fig. 17, donde se distingue claramente la estructura columnar que confiere las propiedades de interés al implante.

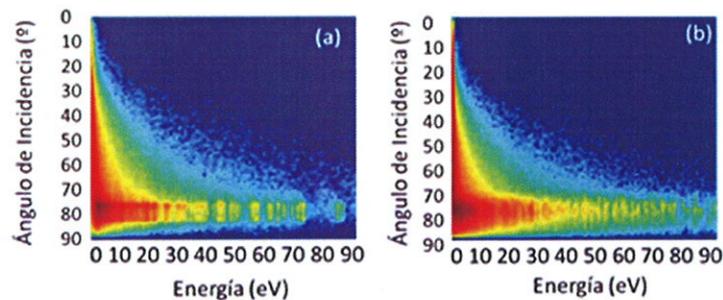


Fig. 18: Función de distribución de llegada de átomos de Ti sobre el sustrato en función del ángulo de incidencia y energía cinética. a) Calculada para la geometría del equipo del IMM. b) Calculada para la geometría propuesta para el crecimiento sobre implantes en el equipo de Nano4Energy (véase Fig. 17).

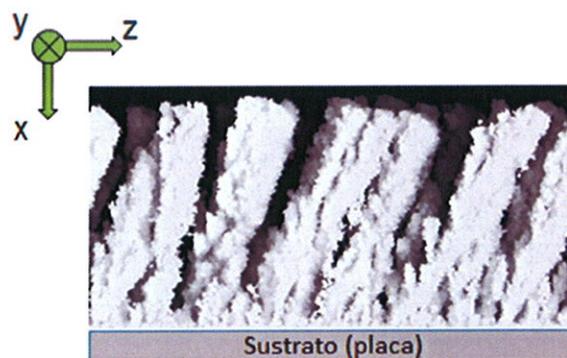


Fig. 19: Simulación del recubrimiento de Ti que se obtendría, en cada cara de una placa de fijación (implante), en la geometría propuesta en la Fig. 17.

Para corroborar realmente que podemos obtener un crecimiento columnar con sputtering industrial, y ajustar todos los parámetros experimentales, hemos utilizado sustratos de silicio cortados con forma rectangular (dimensiones aproximadas: $11 \times 1 \text{ cm}^2$), que pueden clivarse con facilidad para obtener cortes transversales. Estos sustratos poseen una cara plana y otra rugosa, cuyas rugosidades RMS medidas por AFM son 0.5nm y 6nm respectivamente. Cada sustrato se recubrió simultáneamente por las dos caras empleando el procedimiento arriba descrito. Se fijó la presión al valor más bajo en la que el plasma era estable, $P=0.4 \text{ Pa}$, y se variaron la potencia (entre 300 y 970 W) y la duración del proceso (entre 23 y 70min). Las condiciones óptimas que hemos encontrado, es decir, aquellas que permiten obtener un recubrimiento con una morfología similar a la de los considerados óptimos fabricados en el IMM, fueron potencia=325W y tiempo=25min. La Fig. 20 presenta imágenes SEM de cortes transversales a lo largo de la dirección definida por el flujo atómico (Δ) de la cara plana de un sustrato recubierto en esas condiciones, mientras que la Fig. 21 hace lo propio por la cara rugosa. Las Figs. 22 y 23 muestran vistas cenitales de la cara plana y la cara rugosa, respectivamente, y la Fig. 24 presenta imágenes de AFM de las mismas. Resulta claro que por ambas caras del sustrato se obtiene un recubrimiento homogéneo con columnas de Ti de unos 300nm de longitud y 50nm de diámetro, si bien la dispersión de valores es un poco mayor por la cara rugosa, pues los procesos de sombreado atómico se ven un poco afectados por otras sombras debidas a la propia rugosidad del sustrato. Recordemos además que por AFM siempre se mide una altura menor para las columnas, pues la punta del AFM tiene forma de pirámide invertida y por tanto no puede penetrar hasta el fondo del espacio entre columnas. Este efecto es más acusado por la cara rugosa, debido a la mayor dispersión de las características morfológicas del recubrimiento obtenido en esa cara.

Mejora de la adhesión.

Hicimos también experimentos de indentación y rayado con una punta similar, para optimizar la adhesión de los recubrimientos. Comprobamos que la adhesión era mejor en los fabricados con potencia baja, es decir, con menor tasa de deposición, pues de este modo, cuando un átomo llega al sustrato, tiene tiempo suficiente para difundirse y colocarse en un mínimo de energía (es decir, en una posición de equilibrio estable) antes de que llegue un nuevo átomo, con lo que se forma una interfaz implante-recubrimiento más estable. No obstante, el factor que más afectaba a la adhesión era la utilización previa de un proceso de limpieza superficial mediante plasma. Consiste en generar un plasma en la cámara de deposición aplicando un voltaje negativo pulsado en el sustrato: eso provoca que los iones de argón del plasma incidan sobre la superficie del sustrato y lo limpien *in situ*, es decir, eliminen posibles capas de óxido superficial y cualquier otra impureza antes de que se inicie la fabricación del recubrimiento, mejorando de este modo la adhesión del mismo. Los parámetros óptimos encontrados fueron $V=-500\text{V}$ a 150 kHz con una presión de Ar de 1.2 Pa durante 30min, y luego un ulterior enfriamiento de 30min antes de iniciar la deposición del recubrimiento.

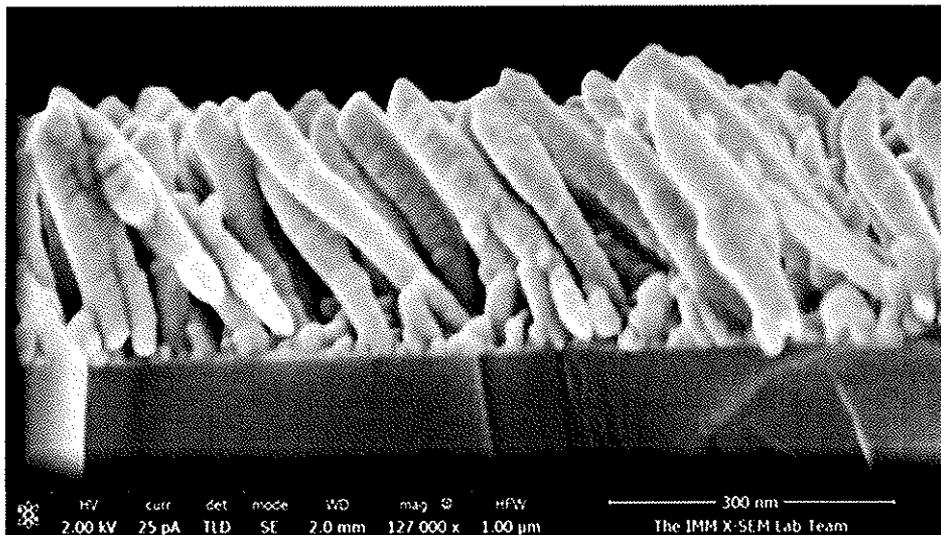
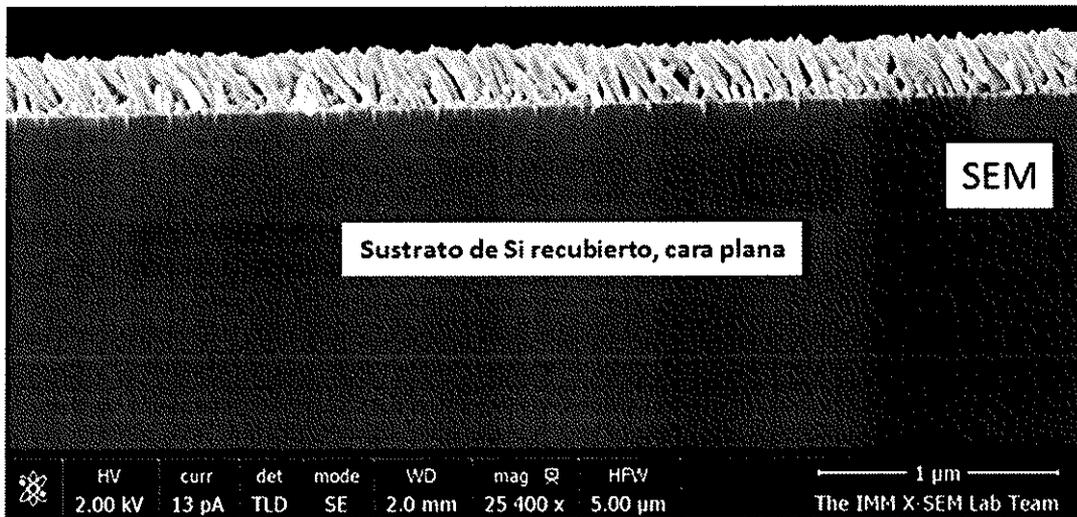


Fig. 20: imágenes SEM de cortes transversales a lo largo de la dirección Δ del recubrimiento de Ti formado sobre la cara plana de un sustrato de Si.

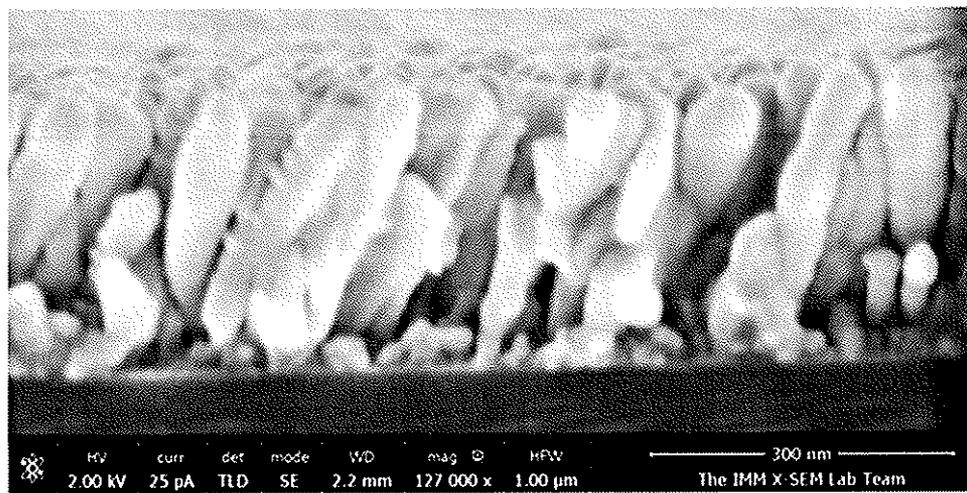
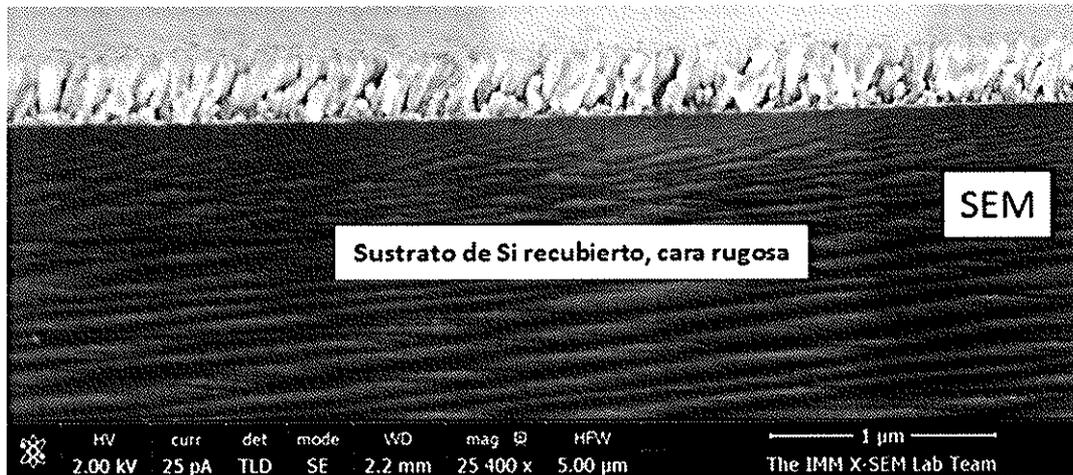


Fig. 21: imágenes SEM de cortes transversales a lo largo de la dirección Δ del recubrimiento de Ti formado sobre la cara rugosa de un sustrato de Si.

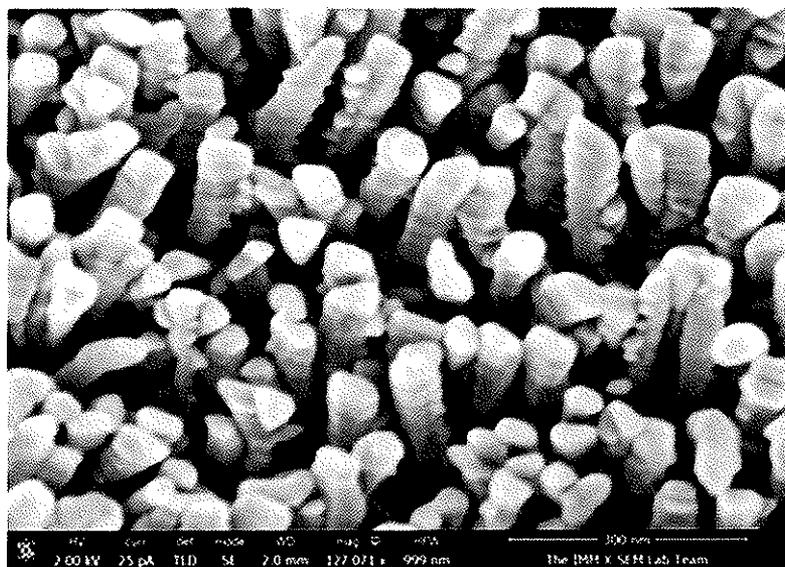
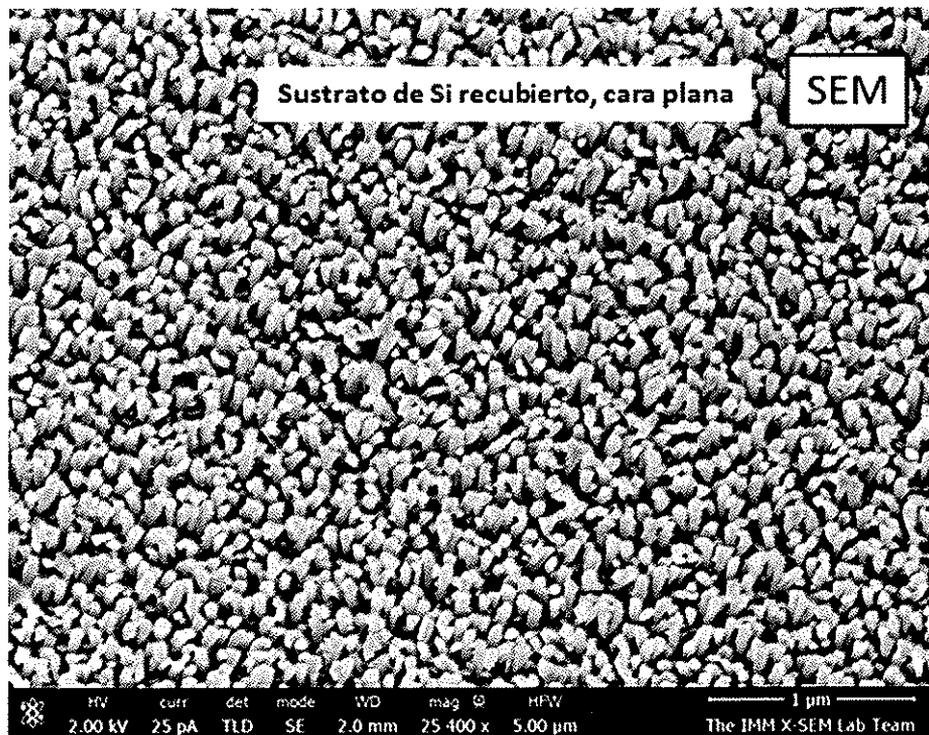


Fig. 22: imágenes SEM cenitales del recubrimiento de Ti formado sobre la cara plana de un sustrato de Si.

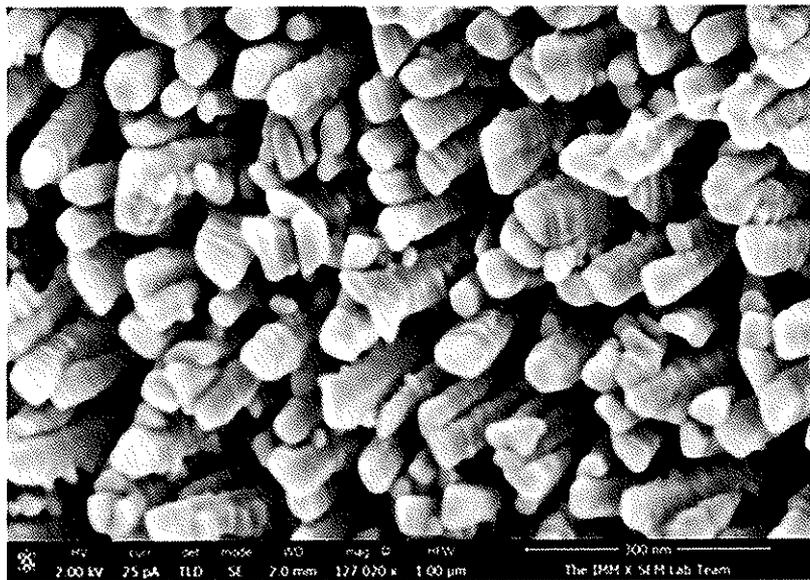
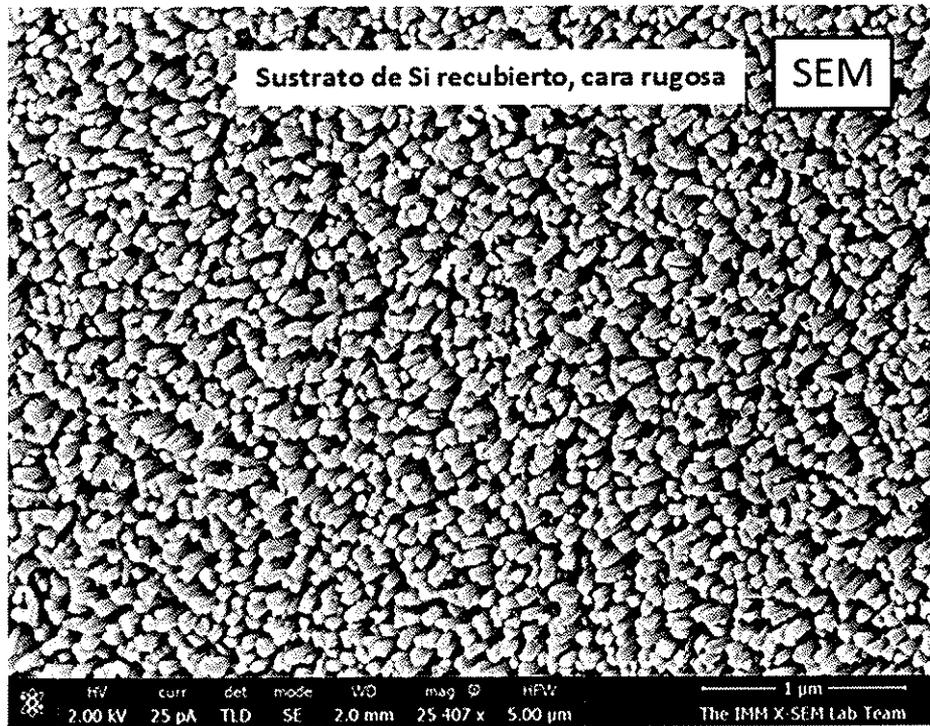
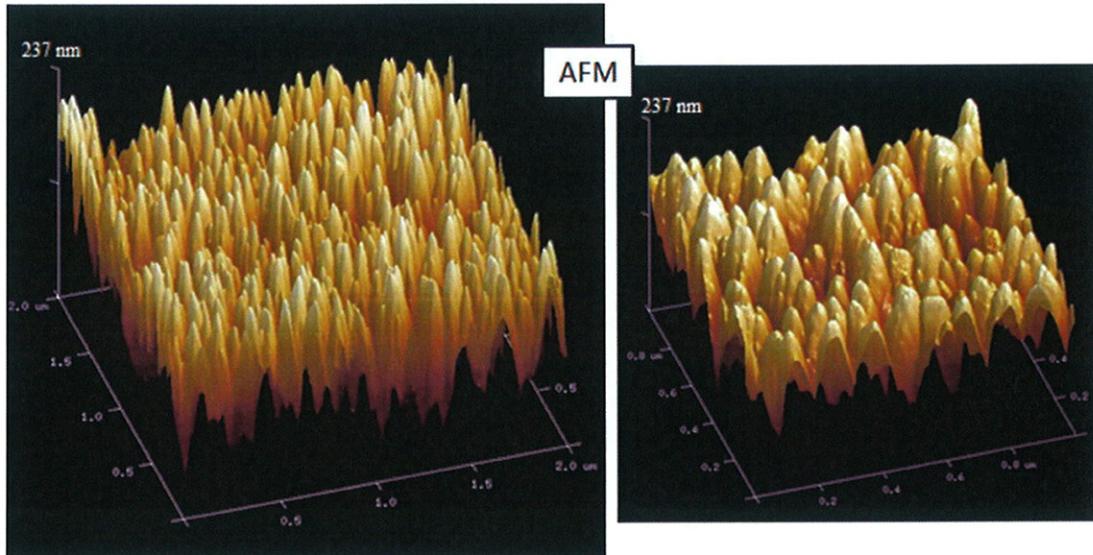


Fig. 23: imágenes SEM cenitales del recubrimiento de Ti formado sobre la cara rugosa de un sustrato de Si.

Sustrato de Si recubierto, cara plana



Sustrato de Si recubierto, cara rugosa

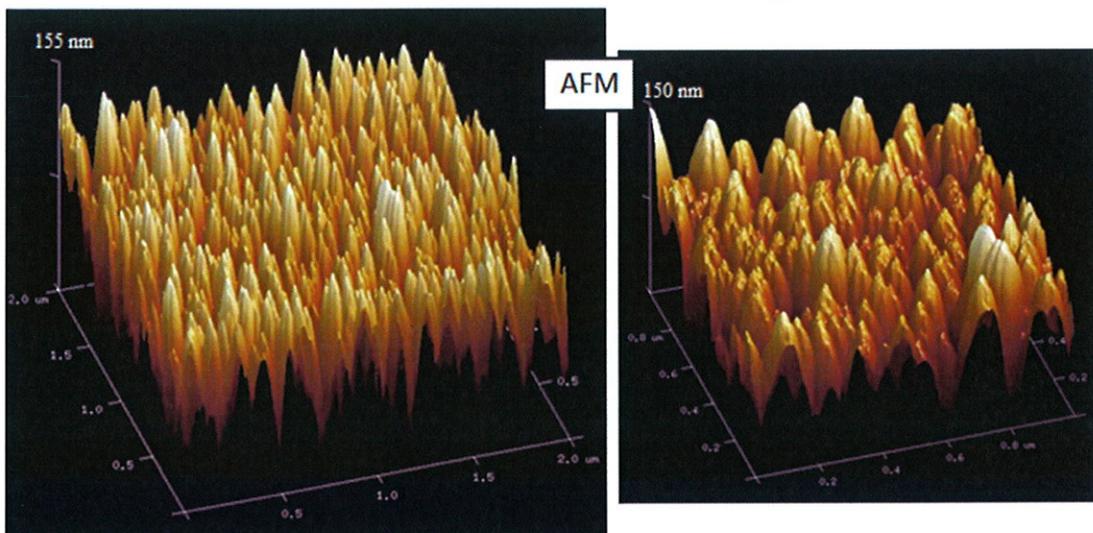


Fig. 24: imágenes AFM de 2 y 1 micras de lado, a izquierda y derecha respectivamente, de los recubrimientos de Ti formados sobre las caras plana y rugosa de un sustrato de Si.

Recubrimiento de implantes ortopédicos.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales para obtener recubrimientos nanocolumnares en el sputtering industrial de Nano4Energy, pasamos a recubrir implantes reales. Hemos recubierto dos placas metálicas de fijación ortopédica que nos han sido proporcionadas por el Doctor Ricardo Larrainzar, Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid. Una de ellas era una placa pseudorectangular extraída a un paciente y convenientemente esterilizada, mientras que la otra era una placa tubular nueva de la compañía Depuy Synthes. En ambos casos empleamos

$P=0.4$ Pa, Potencia=325 W y $t=25$ min, con el paso previo de limpieza superficial con plasma usando voltaje DC pulsado a 150KHz con $V=-500$ V sobre el implante durante 30 min con $P=1.2$ Pa y enfriamiento durante otros 30min. La Fig. 25 presenta dos fotografías durante el proceso de recubrimiento de la primera de las placas mencionadas.

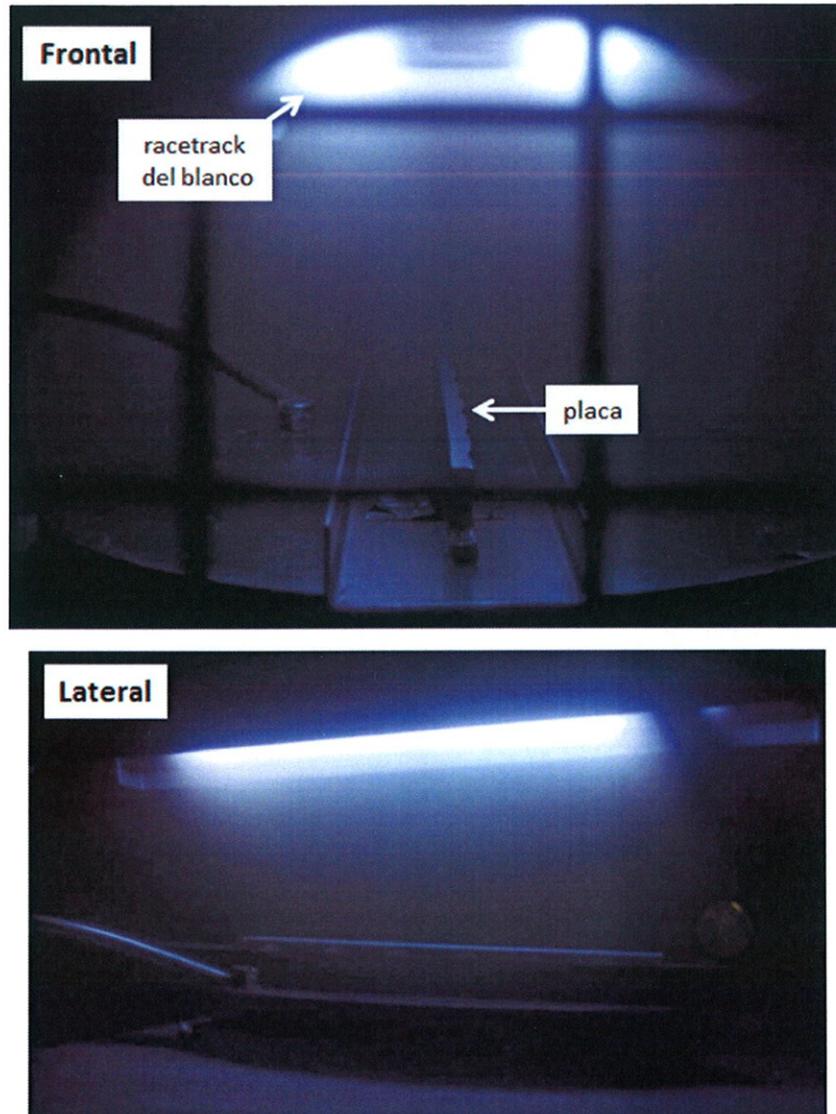


Fig. 25: Fotografías durante el proceso de sputtering de una placa de fijación. Compárese la vista frontal con el esquema de la Fig. 17

Placa pseudorectangular.

Es de composición desconocida y de dimensiones 12 cm de largo y 1.3 cm de ancho, siendo el espesor de 4mm. La Fig. 26 muestra unas fotografías de este implante antes y después de ser recubierto con nuestra tecnología.

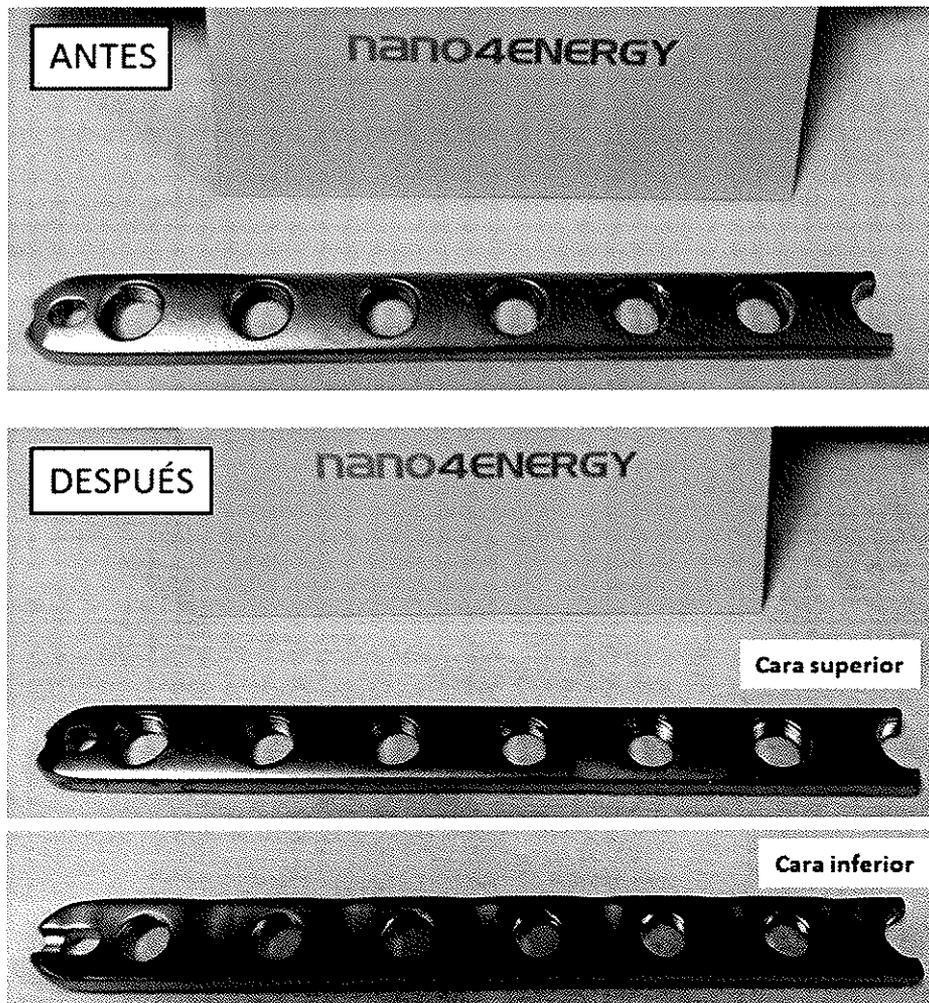


Fig. 26: Fotografías de la placa de fijación pseudorectangular que tiene 12 cm de largo y 1.3 cm de ancho, en su estado inicial antes de ser recubierta y en su estado final después del proceso de sputtering.

El brillo inicial de la placa, que es más bien mate y no espejado, ya indica que la rugosidad de este sustrato es notable. Por ello, hemos realizado un estudio de su morfología antes de ser recubierta con nuestra tecnología. Las dimensiones de esta placa no permiten su estudio por SEM, pues no cabe por la compuerta de entrada a la cámara de observación, por lo que sólo hemos podido analizarla mediante AFM. La Fig. 27 muestra imágenes representativas de AFM obtenidas en áreas de 64 y 1 micras cuadradas, a izquierda y derecha de la figura respectivamente. En la escala menor la placa tiene una rugosidad RMS de 7nm. Sin embargo, en la imagen obtenida en la misma zona pero en un campo mayor, de 8 micras de lado, puede observarse que las áreas más o menos planas están separadas por grietas profundas, que llegan a alcanzar una micra de profundidad. Esto implica que, durante el proceso de deposición, y dependiendo de la orientación relativa de las grietas con el flujo atómico, habrá algunas de ellas donde las propias paredes de la grieta impedirán la formación de nanocolumnas en su interior, pues generarán una sombra que será insalvable para los átomos que lleguen con incidencia oblicua. Por tanto, podemos predecir que los recubrimientos serán inhomogéneos: habrá una gran parte de la superficie del implante (las zonas planas o suaves

de la superficie inicial) que sí tendrá nanocolumnas bien formadas, mientras que un pequeño porcentaje de la misma (grietas profundas) quedará con un recubrimiento rugoso pero sin columnas separadas o incluso sin recubrir.

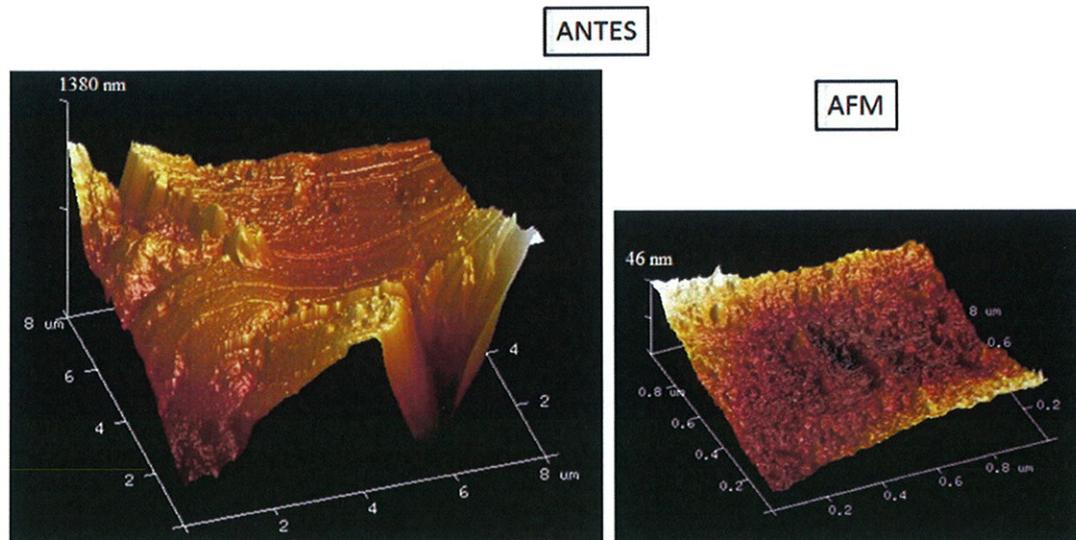


Fig. 27: Imágenes de AFM representadas en 3D de una placa de fijación pseudorectangular. En la imagen de la izda., la escala vertical representa 1380 nm y los lados de la base son de 8 micras. En la de la dcha., la escala vertical representa 46 nm y los lados de la base son de 1 micra.

Tras el proceso de sputtering, como se observa en la parte inferior de la Fig. 26 la tonalidad de la superficie de la placa se oscurece notablemente, lo que ya indica que se ha logrado fabricar un recubrimiento nanoestructurado por sus dos caras.

Las Figs. 28 y 29 contienen imágenes representativas de AFM en 2D y 3D de los recubrimientos obtenidos sobre la cara superior e inferior del implante, respectivamente. Puede observarse que en ambos casos están formados en su mayor parte por nanocolumnas, si bien su altura no es homogénea sino que depende de cómo era la morfología inicial de la placa en cada área concreta: las columnas crecidas sobre áreas planas sí presentan una misma altura, pero aquellas crecidas sobre las paredes de hendiduras tienen menor altura a medida que la superficie inicial estaba más profunda. Por ejemplo, en la Fig. 29 presentamos una zona con una grieta muy profunda (1 micra), y puede verse en detalle cómo la altura de las columnas es máxima en la cima y disminuye progresivamente al adentrarnos en la grieta, hasta que en el fondo de la misma no hay columnas formadas.

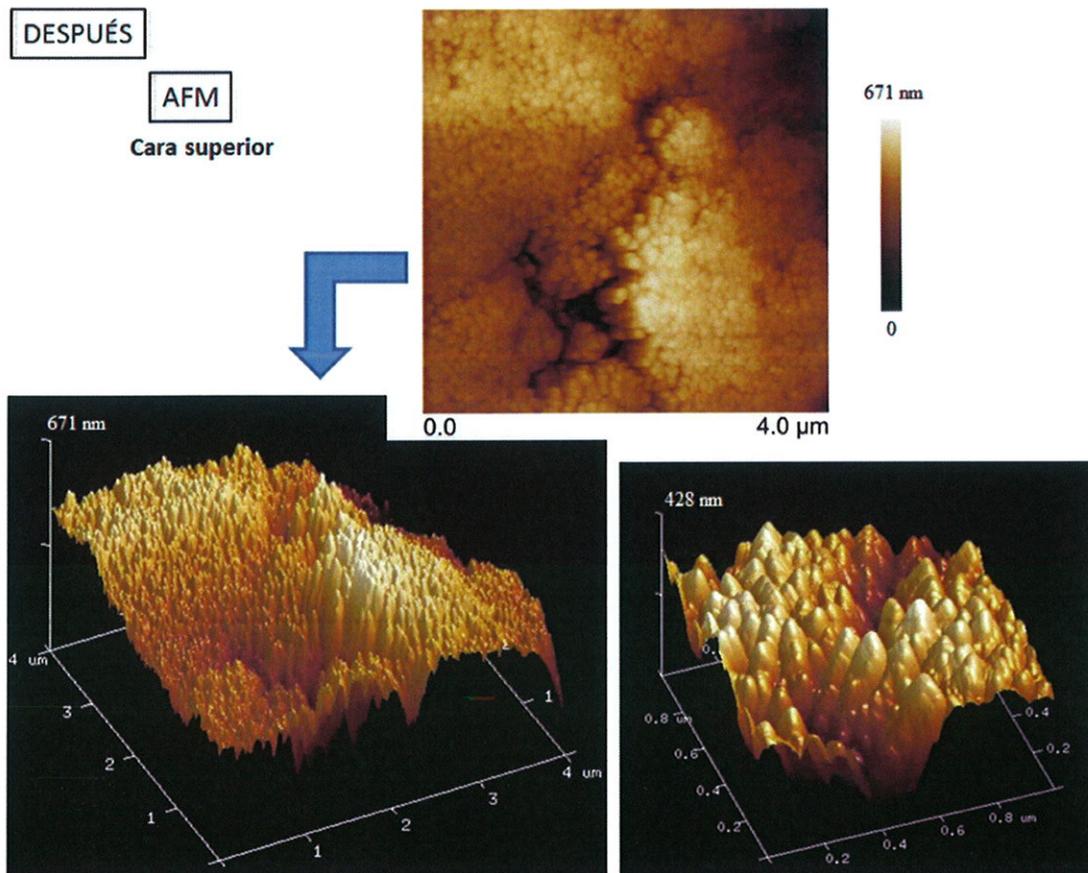


Fig. 28: Imágenes de AFM de un área representativa de la cara superior de la placa recubierta. Arriba se representa en 2D una imagen de 4 micras de lado. Abajo, a la izquierda está la representación tridimensional de esa misma imagen, mientras que a la derecha hay una imagen de 1 micra de lado.

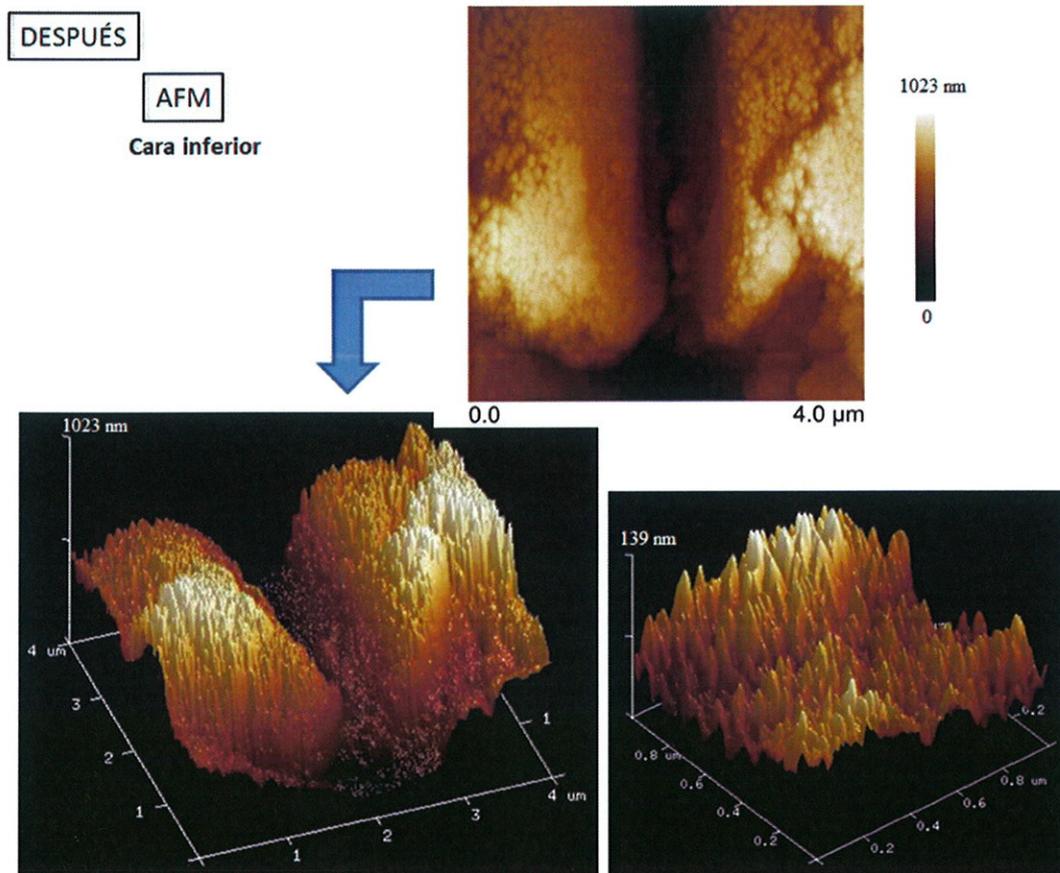


Fig. 29: Imágenes de AFM de un área de la cara inferior de la placa recubierta donde existe una grieta profunda. Arriba se representa en 2D una imagen de 4 micras de lado. Abajo, a la izquierda está la representación tridimensional de esa misma imagen, mientras que a la derecha hay una imagen de 1 micra de lado.

Placa tubular.

Esta placa tiene dimensiones menores (5.2 cm de largo y 0.9 cm de ancho, siendo 1 mm el grosor), por lo que sí ha podido analizarse por SEM. En cuanto a su análisis por AFM, sólo ha podido realizarse por la cara convexa, ya que por la cara cóncava el porta-puntas del microscopio chocaba con la propia placa al aproximarse a la superficie.

La Fig. 30 enseña unas fotografías de este implante antes y después de ser recubierto con nuestra tecnología. Puede verse que la placa presentaba inicialmente un brillo espejado, indicativo de la pequeña rugosidad de este implante. En efecto, tanto por SEM como por AFM no vimos ni hendiduras ni protuberancias significativas en la superficie de partida, y la rugosidad RMS medida con esta última técnica fue de 4nm. Conviene señalar que durante el proceso de sputtering se utilizó una máscara que protegía un cuarto aproximadamente de la placa, para que esa zona quedase sin recubrir: esto se ha hecho para realizar próximamente experimentos *in vitro* sobre esta misma placa y poder comparar así el comportamiento de la placa inicial (zona sin recubrir) con el de la placa recubierta.



Fig. 30: Fotografías de la placa de fijación tubular que tiene 5.2 cm de largo y 0.9 cm de ancho, en su estado inicial antes de ser recubierta y en su estado final después del proceso de sputtering.

Las Figs. 31 y 32 contienen imágenes de AFM y de SEM, respectivamente, de la cara convexa de la placa una vez recubierta. Puede apreciarse la gran homogeneidad del recubrimiento obtenido, que está formado por nanocolumnas con alturas semejantes y espaciadas regularmente entre sí.

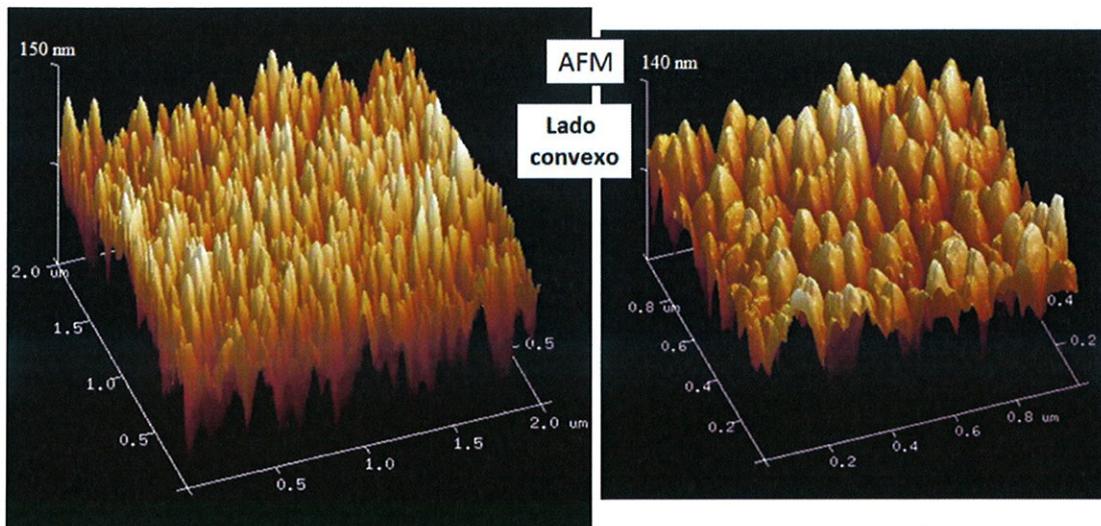


Fig. 31: Imágenes AFM del recubrimiento obtenido sobre la cara convexa de la placa tubular.

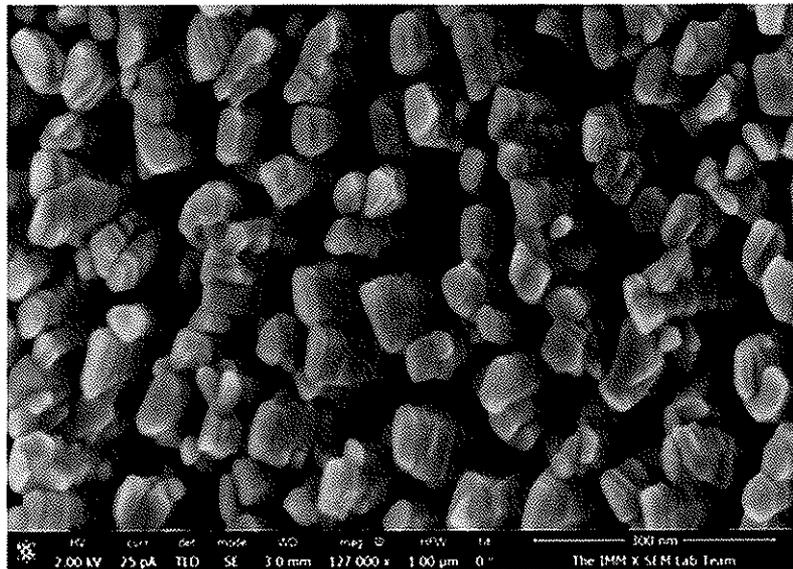
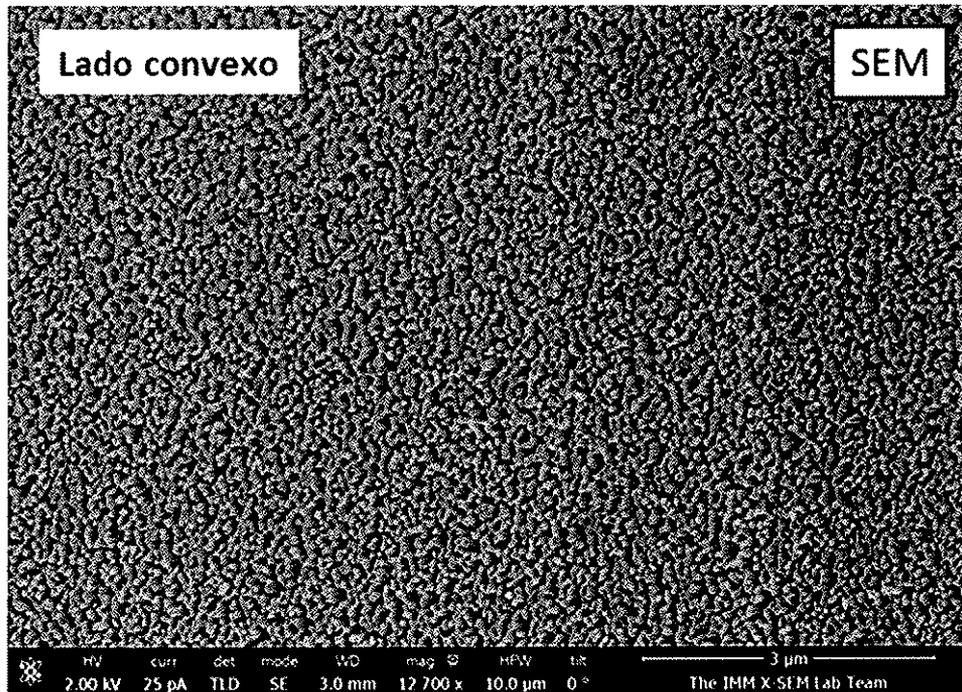


Fig. 32: Imágenes SEM del recubrimiento obtenido sobre la cara convexa de la placa tubular.

La Fig. 33 presenta imágenes SEM del recubrimiento obtenido sobre la cara cóncava de la placa. Al igual que ocurría sobre la cara convexa, el recubrimiento es homogéneo y está formado por nanocolumnas, si bien ahora son más pequeñas, tanto en diámetro como en longitud. Esto lo achacamos a que parte de los átomos provenientes del blanco no han llegado a la superficie de esta cara, pues la propia forma cóncava de la placa lo ha impedido. Si recordamos la simulación de la Fig. 19 y la corroboración experimental con las imágenes de la Fig. 20, a medida que los átomos van llegando las columnas aumentan de diámetro y de altura. Por tanto, si a la superficie de la cara cóncava han llegado menos átomos que a la de la cara convexa, las columnas formadas sobre aquella son menores que las obtenidas sobre ésta.

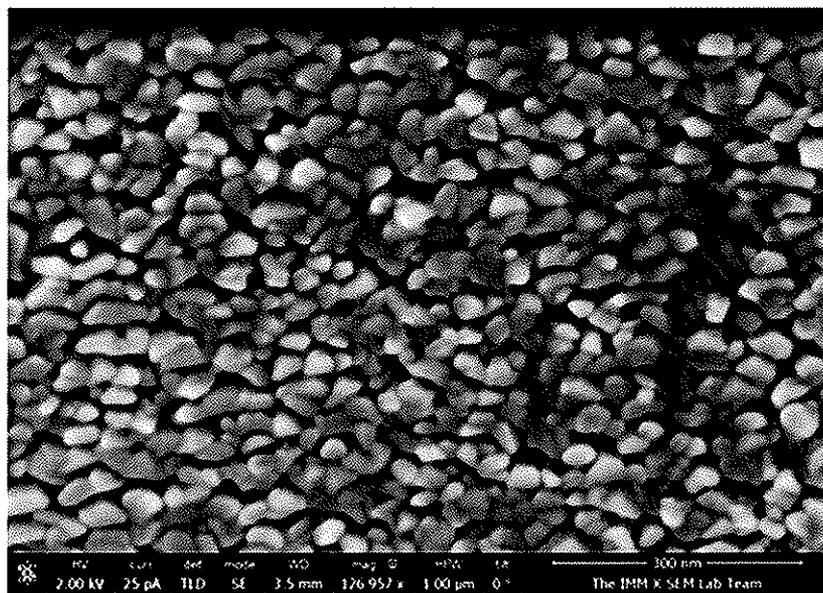
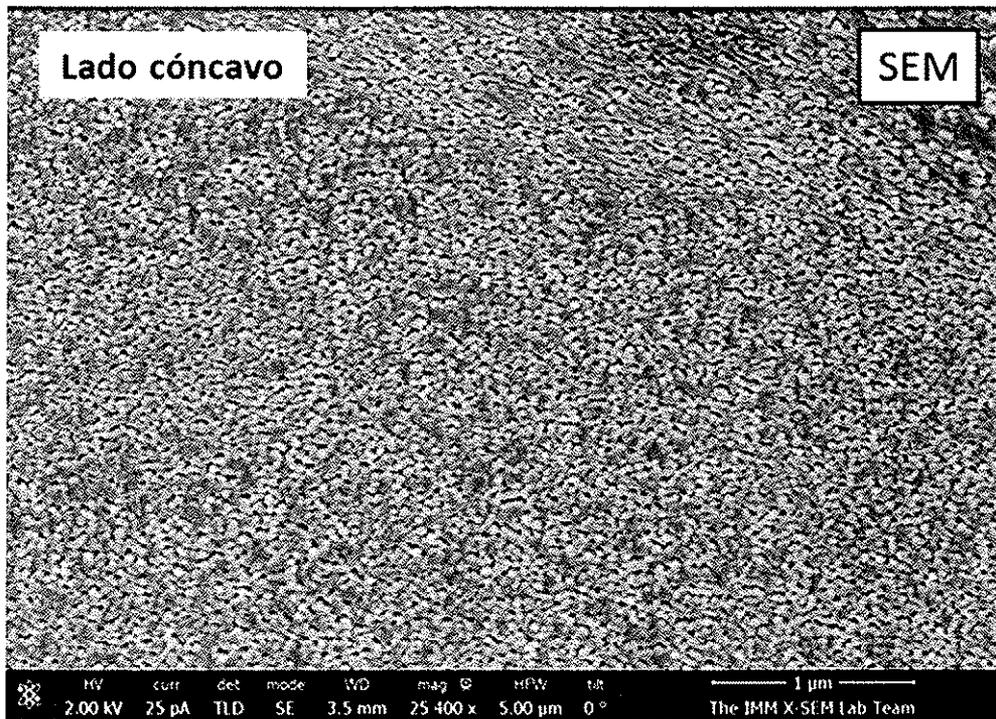


Fig. 33: Imágenes SEM del recubrimiento obtenido sobre la cara cóncava de la placa tubular.

IV.- Perspectivas futuras: estudios in vivo.

Próximamente vamos a evaluar la eficacia de los recubrimientos en un modelo de infección ósea llevado a cabo en fémur de conejo. El éxito en la consecución de este objetivo permitirá iniciar el proceso para su posterior evaluación clínica.

Ya tenemos definido el modelo y los estudios a realizar. Se utilizarán 23 conejos de raza albina de Nueva Zelanda, adultos machos de 2750-3250 gramos de peso. Se emplearán los 2 fémures de cada conejo para optimizar el estudio. En todos los casos se realizará el estudio preoperatorio para descartar infecciones: exploración veterinaria, temperatura corporal, hemograma y hemocultivo. Se destinarán 14 animales para estudiar el modelo de infección protésica con *S. aureus* distribuidos en 2 grupos (7 animales por cada grupo) de acuerdo con el tipo de implante: implante de control Ti6Al4V sin recubrir (Grupo 1), implante de Ti6Al4V con recubrimiento de nanocolumnas (Grupo 2). Paralelamente se utilizarán 9 animales control distribuidos en 3 grupos (3 animales por cada grupo control): operación sin implante ni contaminación bacteriana (Control 1), implante de Ti6Al4V sin adherencia bacteriana (Control 2), implante de Ti6Al4V con recubrimiento de nanocolumnas (Control 3).

Las características de los implantes que van a ser utilizados son las siguientes: Discos de 4 mm de diámetro y 0.7 mm de altura fabricados en Ti6Al4V (Grupo 1, Control 2); Discos fabricados en Ti6Al4V con recubrimiento de nanocolumnas (Grupo 2, Control 3). Los implantes ya los hemos recubierto simultáneamente por sus dos caras con nuestra tecnología (véase Fig. 34) y su morfología ya la hemos analizado tanto por SEM como por AFM (Figs. 35 y 36, respectivamente): dada la baja rugosidad de los discos iniciales (3nm promedio RMS), los recubrimientos obtenidos son muy homogéneos.



Fig. 34: Fotografía mostrando dos discos de Ti6Al4V de 4mm de diámetro, uno sin recubrir y otro recubierto con nanocolumnas de Ti, que se emplearán en los ensayos in vivo.

Las bacterias utilizadas serán obtenidas de una cepa bacteriana aislada de caso humano de infección de implantes caracterizada microbiológicamente: *Staphylococcus aureus*. Los implantes destinados a grupos con adherencia bacteriana (Grupo 1 y Grupo 2) se incubarán en dicho medio de cultivo (caldo triptosa soja) con máxima concentración durante 72 horas, e inmediatamente antes de su implantación en el animal de experimentación se extraerán de dicho medio, se lavarán por inmersión en suero salino durante 5 minutos y se implantarán directamente.

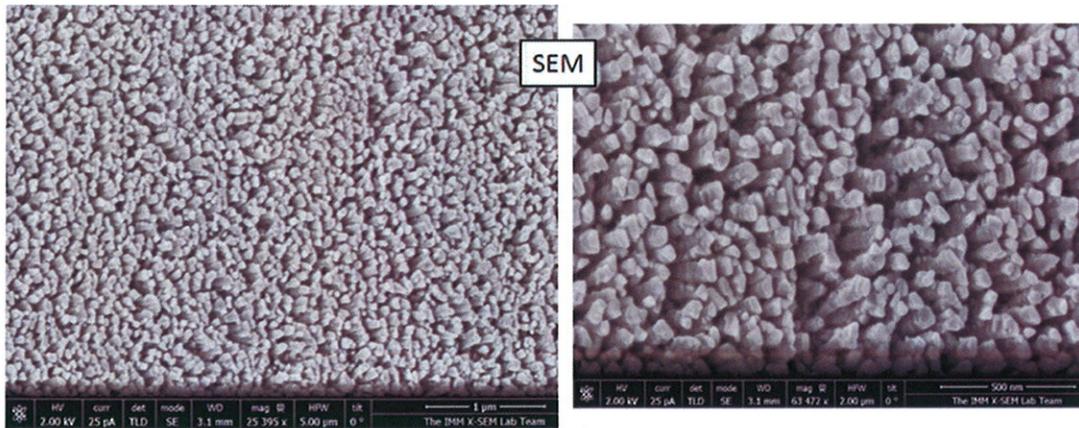


Fig. 35: Imágenes SEM del recubrimiento obtenido sobre un disco de 4mm de diámetro.

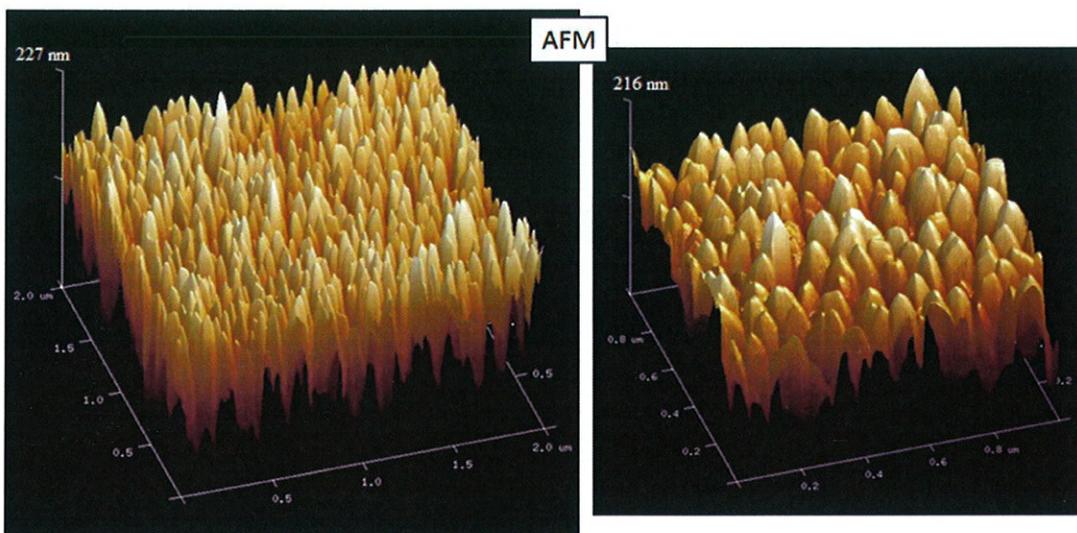


Fig. 35: Imágenes AFM de 2 y 1 micras de lado del recubrimiento obtenido sobre un disco de 4mm de diámetro.

Estudios microbiológicos

Una vez extraído el material, se introducirá en un volumen estandarizado de PBS y se sonificará mediante un sonicador de baja potencia durante 5 minutos para liberar las bacterias adheridas. El fragmento óseo será molido en mortero estéril y sembrado en medios de cultivo sólido y líquido. Se realizarán varias diluciones 1:10 de la solución de PBS-sonicado para su procesamiento microbiológico. Este se realizará como sigue: 100 µl de cada dilución se sembrarán en placas de agar triptosa soja para realizar recuentos de bacterias viables tras 48 horas de incubación.

Estudios histológicos.

Se realizara la fijación, decalcificación y embebido en parafina de fragmento óseo, así como cortes en microtomo y tinción hematoxilina-eosina según técnicas convencionales y se clasificará cada caso como A (mínimos o nulos signos de infección) ó B (signos moderados o graves de infección).

V.- Conclusiones

Las conclusiones más importantes de nuestro trabajo son las siguientes:

- La fabricación de recubrimientos nanoestructurados mediante sputtering requiere baja presión de gas en la cámara (menor que 1Pa), y sólo a partir de un determinado ángulo de inclinación del sustrato con respecto al flujo atómico se obtienen nanocolumnas. Para 0.15 Pa ese ángulo crítico mínimo es 70°.
- Lo importante para tener hidrofobicidad, y por tanto esperar un comportamiento antibacteriano, es tener nanocolumnas bien definidas. En ese caso, el ángulo de contacto es de unos 120°.
- En ensayos *in vitro* competitivos entre células y bacterias (*S. aureus*), la extensión preosteoblástica es más efectiva en el caso de implantes con recubrimiento de nanocolumnas que en implantes desnudos, y además se obtiene en aquellos una menor presencia de bacterias en la superficie.
- En ensayos *in vitro* con *S. epidermidis*, hay una disminución de la adhesión bacteriana de casi un 88 % en los implantes recubiertos con nanocolumnas de Ti.
- Se ha logrado escalar a un sputtering industrial el proceso de fabricación de recubrimientos nanocolumnares sobre implantes.
- La adhesión del recubrimiento mejora si antes de depositar se realiza una limpieza superficial con plasma aplicando pulsos de voltaje negativo sobre el implante.
- Se han recubierto placas de fijación ortopédicas, tanto con forma pseudorectangular como con forma tubular, y se ha analizado la morfología de los recubrimientos obtenidos.
- También se han recubierto pequeños implantes en forma de disco que se emplearán próximamente en un modelo de infección ósea, que se llevará a cabo en fémur de conejo.

VI.- Referencias.

[Alvarez13] Alvarez R, García-Martín JM, Macías-Montero M, González-García L, González JC, Rico V, Perlich J, Cotrino J, González-Elípe AR, Palmero A. Growth regimes of porous gold thin films deposited by magnetron sputtering at oblique incidence: from compact to columnar microstructures. *Nanotechnology* 2013;24:045604.

[Alvarez16] R. Alvarez, J. M. Garcia-Martín, A. Garcia-Valenzuela, M. Macias-Montero, F. J. Ferrer, J. Santiso, V. Rico, J. Cotrino, A. R. Gonzalez-Elípe and A. Palmero. Nanostructured Ti thin films by magnetron sputtering at oblique angles. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 49 (2016) 045303

[Aselme10] K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazon, M. Liley, L. Ploux. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater.* 6 (2010) 3824–3846.

[Campoccia06] Campoccia D, Montanaro L, Ariola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006;27:2331-39.

[Ivanova12] E.P. Ivanova et al., Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of Pseudomonas aeruginosa Cells by Cicada Wings. Small 8, 2489 (2012)

[Izquierdo-Barba15] Izquierdo-Barba I, García-Martín JM, Alvarez R, Palmero A, Esteban J, Pérez-Jorge C, Arcos D, Vallet-Regí M. Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and Staphylococcus aureus proliferation. Acta Biomaterialia 15, 20 (2015); doi:10.1016/j.actbio.2014.12.023

[Kaelble70] Kaelble, D.H. 1970. Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. Journal of Adhesion 2 (2): 66-81.

[Owens69] Owens, D.K.; Wendt, R.C. 1969. Estimation of the surface free energy of polymers. Journal of Applied Polymer Science 13 (8): 1741-1747.

VII.- Diseminación de resultados.

Los resultados obtenidos se han diseminado en publicaciones, ponencias en congresos y en otras conferencias impartidas, en todos los casos agradeciendo expresamente la financiación recibida por parte de la Fundación Domingo Martínez.

Publicaciones:

Los resultados correspondientes al primer apartado de este informe, la fabricación de recubrimientos en laboratorio, se ha publicado en una revista internacional con factor de impacto=2.7:

R. Alvarez, J. M. Garcia-Martin, A. Garcia-Valenzuela, M. Macias-Montero, F. J. Ferrer, J. Santiso, V. Rico, J. Cotrino, A. R. Gonzalez-Elipe and A. Palmero. Nanostructured Ti thin films by magnetron sputtering at oblique angles. J. Phys. D: Appl. Phys. 49 (2016) 045303

El resto de resultados aún no han sido publicados, pero ya tenemos en fase de preparación un manuscrito.

Comunicaciones en congresos:

“Nanostructured biocompatible coatings to prevent implant infections”. Oral. J.M. Garcia-Martin, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, R. Alvarez, A. Palmero, J. Esteban, C. Perez-Jorge, M. Vallet-Regi. NanoPT 2016 - NanoPortugal International Conference. Braga (Portugal).

“NANOIMPLANT: nanostructured biocompatible coatings to prevent orthopedic implant infections”. Oral. J.M. García-Martín, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, R. Alvarez, A. Palmero, J. Esteban, C. Pérez-Jorge, M. Vallet-Regí. NanoSpain conference at ImagineNano 2015. Bilbao (Spain).

Otras conferencias:

J.M. García-Martín: “Materiales nanoestructurados fabricados por métodos físicos y aplicaciones en magnetismo, óptica y biomedicina.” 15/2/16. Seminarios Internacionales de Fronteras de la Ciencia de Materiales, E. T. S. de Ingenieros de Caminos, Universidad Politécnica de Madrid. Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=34_MqZF1XIQ

J.M. García-Martín: “Recubrimientos nanoestructurados fabricados por métodos físicos y aplicaciones en magnetismo, óptica y biomedicina”. 28/8/15. Departamento de Física, Universidad de Santiago de Chile (USACH), Chile.

J.M. García-Martín: “Recubrimientos nanoporosos y nanocolumnares: fabricación por sputtering y aplicaciones en óptica y biomedicina”. 25/8/15. Instituto de Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

J.M. García-Martín: “Recubrimientos nanoestructurados fabricados por métodos físicos: multicapas magnetoplasmónicas, antidots magnéticos y nanopilares para implantes”. 20/8/15. Departamento de Física, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

J.M. García-Martín e I. Izquierdo-Barba: “NANOIMPLANT: nanostructured coatings for orthopedic implants”. 3/6/2015. Health Sciences and Technology (HST) Program, IDEA3 session at the Hermann Anton Haus Room (36–428), Massachusetts Institute of Technology (MIT), USA.

M. Vallet-Regí. “Infección y alternativas para evitarla”. Avances en Medicina CIAM 2016, módulo de Odontología y Cirugía Maxilofacial. Guadalajara, México, 25 de febrero 2016.

I. Izquierdo-Barba: “Nuevos Conceptos en Ingeniería de Tejido Óseo y prevención de la infección ósea”. Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica. Universidad de Castilla-La Mancha. 4 de marzo 2016.

VIII.- Agradecimientos.

El equipo investigador agradece su colaboración en diversos aspectos de este estudio a la Dra. María Ujué González y a Gopika Beena del IMM-CSIC, al Dr. Víctor Rico del ICMS-CSIC, al Dr. Ricardo Larrainzar del Hospital Universitario Infanta Leonor, y a la Dra. Concepción Pérez-Jorge y al Dr. Jaime Esteban de la Fundación Jiménez Díaz.

El equipo investigador desea agradecer efusivamente a la Fundación Domingo Martínez no sólo la financiación recibida, sino también su apuesta por fomentar la Investigación Científica, contribuyendo así a mejorar el bienestar y la calidad de vida de la sociedad.

Recubrimientos nanoestructurados para implantes metálicos ortopédicos

Investigador Principal: Dr. José Miguel García-Martín
(Inst. de Microelectrónica de Madrid, CSIC)

Resumen

Este proyecto ha abordado la fabricación y el estudio de recubrimientos antibacterianos formados por nanocolumnas de titanio, que se han obtenido mediante pulverización catódica (sputtering) a incidencia oblicua. Se han perseguido dos objetivos principales: la optimización de los recubrimientos nanocolumnares (mejora de sus prestaciones) y el escalado industrial del proceso de fabricación de los mismos.

Las conclusiones más importantes de nuestro trabajo han sido las siguientes:

- La fabricación de recubrimientos nanoestructurados mediante sputtering requiere baja presión de gas en la cámara (menor que 1Pa), y sólo a partir de un determinado ángulo de inclinación del sustrato con respecto al flujo atómico se obtienen nanocolumnas. Para 0.15 Pa ese ángulo crítico mínimo es 70°.
- Lo importante para tener hidrofobicidad, y por tanto esperar un comportamiento antibacteriano, es tener nanocolumnas bien definidas. En ese caso, el ángulo de contacto es de unos 120°.
- En ensayos *in vitro* competitivos entre células y bacterias (*S. aureus*), la extensión preosteoblástica es más efectiva en el caso de implantes con recubrimiento de nanocolumnas que en implantes desnudos, y además se obtiene en aquellos una menor presencia de bacterias en la superficie.
- En ensayos *in vitro* con *S. epidermidis*, hay una disminución de la adhesión bacteriana de casi un 88 % en los implantes recubiertos con nanocolumnas de Ti.
- Se ha logrado escalar a un sputtering industrial el proceso de fabricación de recubrimientos nanocolumnares sobre implantes.
- La adhesión del recubrimiento mejora si antes de depositar se realiza una limpieza superficial con plasma aplicando pulsos de voltaje negativo sobre el implante.
- Se han recubierto placas de fijación ortopédicas, tanto con forma pseudorectangular como con forma tubular, y se ha analizado la morfología de los recubrimientos obtenidos.
- También se han recubierto pequeños implantes en forma de disco que se emplearán próximamente en un modelo de infección ósea, que se llevará a cabo en fémur de conejo.