



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACION EN  
METALÚRGIA Y MATERIALES

---

“EFECTO DE LA FRACCIÓN VITREA SOBRE VIABILIDAD Y  
PROLIFERACION CELULAR DE LA ALEACION ZrCoAlAg.”

TESIS QUE PARA OBTENER AL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS  
MATERIALES

PRESENTA:

M.C. AISH VALDEMAR ESCAMILLA FLORES

ASESOR:

Ph. D. JORGE ALEJANDRO VERDUZCO MARTÍNEZ

CO-ASESOR:

Ph. D. IGNACIO ALEJANDRO FIGUEROA VARGAS

Morelia, Michoacán, México; Agosto del 2021.

## **DEDICATORIA**

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir mi formación.  
De manera muy especial a mi esposa Gabriela González Garcia y mi hijo Ion Dante Escamilla González.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **INSTITUCIONALES**

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al programa de Doctorado del Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales.

Un especial agradecimiento al CONACYT por el apoyo financiero para desarrollar el proyecto.

Agradezco al Dr. Ignacio Alejandro Figueroa Vargas y al Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México. Por el apoyo brindado tanto como de material, uso de instalaciones y asesoría para la obtención de las cintas vítreas.

Agradecimiento a las Facultades de Biología, Mecánica, Físico-matemáticas, Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por permitir el uso de sus laboratorios para el desarrollo del presente proyecto.

Agradezco al Dr. René García Contreras de la Unidad León UNAM, Guanajuato. Por el suministro de células hDPSC.

Agradecimiento al apoyo de Infraestructura CONACYT INFR-2015- 0255010.

### **PERSONALES**

Agradezco desde lo profundo de mi corazón a Dios por permitirme la oportunidad de llegar a este momento y bendecirme con las personas que ha puesto en mi camino.

Un enorme agradecimiento a mi asesor el Dr. Jorge Alejandro Verduzco Martínez por aceptarme como parte del proyecto de investigación así como por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre el material estudiado en esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a mi Co-asesor el Dr. Ignacio Alejandro Figueroa Vargas por su apoyo y capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, tanto para el desarrollo de esta tesis como también para mi formación.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita por aceptarme como alumno, por su disponibilidad e invaluable guía para el desarrollo del proyecto.

Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante en mi formación académica. Siempre los recordaré con mucho respeto y admiración.

Por supuesto el agradecimiento más profundo y sentido es para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta tesis; especialmente a mi

esposa Gabriela González Garcia, a mi padre Valdemar Escamilla Zavala y a mi hermana Ghaury Mizraim Escamilla Flores, por todo muchas gracias.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I INTRODUCCION.....	16
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	18
1.3 HIPÓTESIS.....	18
1.4 METAS CIENTÍFICAS.....	19
CAPÍTULO II REVISION BIBLIOGRAFICA.....	20
2.1 VIDRIOS METÁLICOS.....	20
2.2 FORMACIÓN DE UN VIDRIO METÁLICO.....	21
2.3 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE VIDRIOS (GFA).....	21
2.4 TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE VIDRIOS METÁLICOS.....	22
2.4.1 <i>Enfriamiento en horno (templado al aire)</i> .....	23
2.4.2 <i>Templado con líquido (Splat Cooling)</i> .....	23
2.4.3 <i>Enfriamiento por láser (Laser Glazing)</i> .....	23
2.4.4 <i>Evaporación (condensación de vapor)</i> .....	23
2.4.5 <i>Templado giratorio (Melt spinning)</i> .....	24
2.5 PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS VIDRIOS METÁLICOS.....	27
2.6 RESISTENCIA A LA FATIGA.....	27
2.7 RESISTENCIA A LA FRACTURA.....	27
2.8 RESISTENCIA A LA CORROSIÓN.....	28

2.9 VIDRIOS METÁLICOS BASADOS EN ZR .....	28
2.10 REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.....	31
CAPÍTULO III METODOLOGÍA.....	44
3.1 PREPARACIÓN DE LINGOTES.....	44
3.2 COLADO DE CINTAS .....	47
3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	48
3.3.1 Difracción de rayos X (DRX) .....	49
3.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	49
3.3.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	49
3.4 CARACTERIZACIÓN TÉRMICA.....	49
3.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	49
3.5 PRUEBA DE NANOINDENTACIÓN.....	50
3.6 ANÁLISIS DE BIOACTIVIDAD .....	51
3.6.1 Ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) .....	51
3.7 PRUEBA DE LIBERACIÓN DE IONES .....	53
3.8 ENSAYO DE ADHERENCIA CELULAR .....	55
3.9 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR Y PROLIFERACIÓN IN VITRO.....	57
CAPÍTULO IV RESULTADOS .....	61
4.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	61
4.1.1 Difracción de rayos X (DRX) .....	61
4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	70
4.1.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	81
4.2 CARACTERIZACIÓN TÉRMICA.....	85
4.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	85
4.3 NANOINDENTACIÓN.....	89
4.4 ANÁLISIS DE BIOACTIVIDAD .....	89
4.4.1 Ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) .....	89
4.5 LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS.....	91
4.6 ENSAYO DE ADHERENCIA CELULAR .....	96
4.7 ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR IN VITRO.....	100

CAPITULO V DISCUSIÓN .....	104
5.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	104
5.1.1 Difracción de rayos X (DRX) .....	104
5.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	105
5.1.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	108
5.2 CARACTERIZACIÓN TÉRMICA.....	108
5.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	108
5.4 NANOINDENTACIÓN.....	110
5.5 ANÁLISIS DE BIOACTIVIDAD .....	110
5.5.1 Ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) .....	110
5.6 LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS.....	111
5.7 ENSAYO DE ADHERENCIA CELULAR .....	112
5.8 ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR IN VITRO.....	113
CAPITULO VI CONCLUSIONES.....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	116

### INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1</b> Parámetros de colada de las cintas .....	48
<b>Tabla 3.2.</b> Orden de reactivos para SBF .....	53
<b>Tabla 3.3</b> Valores de longitud de onda de elementos de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ . .....	55
<b>Tabla 4.1</b> Condiciones de las tres cintas base Zr obtenidas por CBMS. ....	61
<b>Tabla 4.2.</b> Análisis químico por EDS, elementos que presentaron variación en % at. ....	73
<b>Tabla 4.3</b> Propiedades térmicas de las tres cintas obtenidas por CBMS. ....	88
<b>Tabla 4.4</b> Concentración promedio de iones metálicos liberados de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.....	91

<b>Tabla 4.5</b> Concentración de iones metálicos liberados de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días. ....	92
<b>Tabla 4.6</b> Concentración de iones metálicos liberados de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días. ....	93
<b>Tabla 4.7</b> Concentración de iones metálicos liberados de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días. ....	94
<b>Tabla 4.8</b> Medias y desviaciones estándar de las muestras utilizadas para la prueba de adherencia celular. ....	96
<b>Tabla 4.9</b> Cuantificación promedio de la densidad celular adherente con células hDPSC. ....	99
<b>Tabla 4.10</b> Medias y desviaciones estándar de las muestras utilizadas para la prueba de citotoxicidad. ....	100
<b>Tabla 4.11</b> Medias y desviaciones estándar de las muestras utilizadas para la prueba de citotoxicidad. ....	102

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Desarrollo histórico en sistemas BMG y espesores obtenidos [6].....	17
<b>Figura 2.2</b> Esquema del equipo para la fusión de Chill-Block (CBMS): 1) crisol cilíndrico de vidrio de sílice, 2) presión de inyección de gas ( $N_2$ , Ar o He), 3) aleación metálica fundida, 4) paleta de fusión en contacto con el substrato de enfriamiento, 5) disco de Cu de enfriamiento rápido, 6) cinta vítrea, 7) alerón antiadherente, 8) calentador inductivo del HF [21]. ....	25
<b>Figura 2.3</b> Esquema de un equipo para el hilado por fusión de acuerdo con el método PFC: 1) crisol de vidrio de sílice cilíndrico con un orificio rectangular, 2) presión de inyección ( $N_2$ , Ar o He), 3) fundición metálica, 4) paleta de fusión en contacto con la superficie del disco de enfriamiento rotatorio (Cu), 5) disco de enfriamiento, 6) cinta vítrea, 7) alerón antiadherente, 8) calentador inductivo de HF [21]. ....	26
<b>Figura 3.1</b> Horno de arco eléctrico EDMUND BÜHLER (Arc-Melter AM), utilizado para la fusión y homogenización del sistema de aleación. ....	45

<b>Figura 3.2</b> Lingotes de aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ obtenidos por fusión de arco con atmósfera de Ar.....	46
<b>Figura 3.3</b> Comparación del peso de los elementos de la aleación a) antes de la fusión, con b) lingote obtenido por fusión de arco con atmósfera de Ar.....	46
<b>Figura 3.4</b> Horno proceso de colada en bloque enfriante giratorio EDMUND BÜHLER (chill block melt spinning CBMS), utilizado para el colado de las cintas. ....	48
<b>Figura 3.5</b> Nanoindentador Berkovich (Nanovea Indenter, CUCEI-UdG, Jalisco,Mex).....	51
<b>Figura 3.6</b> Espectrómetro de emisión atómica por plasma (Agilent Technologies 4100 MP-AES. Laboratorio de fisicoquímica y fluidos complejos, Facultad de ciencias físico-matemáticas, UMSNH). ....	54
<b>Figura 3.7.</b> Esquema con número inicial de células utilizadas y su disposición en la caja de 24 pozos para prueba de adherencia celular. ....	56
<b>Figura 3.8.</b> Lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scientific. Centro multidisciplinario de estudios en biotecnología, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UMSNH). ....	58
<b>Figura 3.9.</b> Esquema con número inicial de células T utilizadas y su disposición en la caja de 24 pozos.....	59
<b>Figura 3.10</b> Esquema con número inicial de células T utilizadas y su disposición en la caja de 24 pocillos. ....	60
<b>Figura 4.1.</b> Patrón de difracción de rayos X correspondiente al Zr puro utilizado en la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ . ....	62
<b>Figura 4.2.</b> Patrón de difracción de rayos X correspondiente a Co puro utilizado en la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .....	62
<b>Figura 4.3.</b> Patrón de difracción de rayos X correspondiente a Al puro utilizado en la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .....	63
<b>Figura 4.4.</b> Patrón de difracción de rayos X correspondiente a Ag puro utilizado en la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .....	63
<b>Figura 4.5</b> Patrón XRD de las tres cintas base Zr obtenidas por CBMS.....	64

<b>Figura 4.6</b> Patrón de difracción de la cinta con 78.8 % de fase vítrea. ....	65
<b>Figura 4.7</b> Patrón de difracción de la cinta con 79.8 % de fase vítrea .....	65
<b>Figura 4.8</b> Patrón de difracción de la cinta con 82.6 % de fase vítrea. ....	66
<b>Figura 4.9</b> Patrones de difracción de rayos x de la cinta con 78.8 % de fase vítrea de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ para diferentes días de inmersión en SBF. ....	67
<b>Figura 4.10</b> Patrón de difracción de rayos X de la cinta con 82.6 % de fase vítrea, a) Comparación de cinta colada con los diferentes tiempos de inmersión en SBF; b) aumento sobre el patrón de difracción de la muestra con 21 días de inmersión en SBF. ....	68
<b>Figura 4.11</b> Patrón de difracción de rayos x de la Cinta con 78.8 % de fase vítrea, sumergida en SBF a 37 <sup>o</sup> C durante 3 días. ....	69
<b>Figura 4.12</b> Patrón de difracción de rayos x de la Cinta con 79.8 % de fase vítrea, sumergida en SBF a 37 <sup>o</sup> C durante 3 días. ....	69
<b>Figura 4.13</b> Patrón de difracción de rayos x de la Cinta con 82.6 % de fase vítrea, sumergida en SBF a 37 <sup>o</sup> C durante 3 días. ....	70
<b>Figura 4.14</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de las 3 cintas evaluadas de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ tomadas a 500 aumentos, correspondientes a a) cinta con 78.8 % de fase vítrea, b) cinta con 79.8 % de fase vítrea y c) cinta con 82.6 % de fase vítrea. ....	70
<b>Figura 4.15</b> Mapeo químico y análisis químico por EDS de la cinta con 78.8 % de fase vítrea..	71
<b>Figura 4.16</b> Mapeo químico y análisis químico por EDS de la cinta con 79.8 % de fase vítrea..	72
<b>Figura 4.17</b> Mapeo químico y análisis químico por EDS de la cinta con 82.6 % de fase vítrea..	73
<b>Figura 4.18</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 28 días a 10000 y 20000 aumentos, incisos a) y b) respectivamente.	74
<b>Figura 4.19</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 7 días a a) 500, b) 1000 y c) 20000 aumentos respectivamente, con análisis químico mediante EDS en la parte inferior. ....	75

<b>Figura 4.20.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 3 días tomadas a a) 1,000 aumentos, b) 2,500 aumentos y c) 10,000 aumentos. ....	76
<b>Figura 4.21.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 21 días tomadas a a) 2,500 aumentos, b) 10,000 aumentos y c) 20,000 aumentos con su análisis químico por EDS. ....	77
<b>Figura 4.22.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 7 días tomadas a a) 500 aumentos, b) 3,300 aumentos, c) 500 aumentos, d) 2,500 aumentos y e) 5,000 aumentos. ....	78
<b>Figura 4.23.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 7 días tomadas a a) 5,000 aumentos, b) 3,000 aumentos con su análisis químico por EDS. ....	78
<b>Figura 4.24.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 21 días tomadas a a) 10,000 aumentos con su análisis químico por EDS y b) 20,000 aumentos con su análisis químico por EDS. ....	79
<b>Figura 4.25.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF por 14 días tomadas a a) 2,500 aumentos, b) 20,000 aumentos y c) 20,000 aumentos con su análisis químico por EDS. ....	80
<b>Figura 4.26.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF por 21 días tomadas a a) 3,500 aumentos, b) 10,000 aumentos y c) 10,000 aumentos con su análisis químico por EDS. ....	81
<b>Figura 4.27</b> Imagen HRTEM de una cinta con un 78.8 % de fase vítrea de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ con inserción en la esquina superior derecha de su transformada rápida de Fourier. ....	82
<b>Figura 4.28</b> Imagen de HRTEM de una cinta con un 79.8 % de fase vítrea de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ con inserción en la esquina superior derecha de su transformada rápida de Fourier indicando la distancia interplanar correspondiente a los planos (314) de $Al_2O_3$ . ....	83

<b>Figura 4.29</b> Imagen de HRTEM de una cinta con un 82.6 % de fase vítrea de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ con inserción en la esquina superior derecha de su transformada rápida de Fourier indicando la distancia interplanar correspondiente a los planos (012) de $Al_2O_3$ .....	84
<b>Figura 4.30</b> a) Imagen HRTEM de una cinta con un 82.6 % de fase vítrea de aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , b) Transformada rápida de Fourier que indica la distancia interplanar correspondiente a los planos (111) de $ZrO_2$ y c) Transformada rápida de Fourier de una zona vítrea. ....	85
<b>Figura 4.31.</b> Curva DSC donde se muestran las temperaturas de transición vítrea $T_g$ , cristalización $T_c$ y de líquidus $T_l$ , de la cinta con 78.8 % de fase vítrea. ....	86
<b>Figura 4.32.</b> Curva DSC de la cinta con 79.8 % de fase vítrea donde se muestra transformación de fase de la porción cristalina así como las temperaturas de transición vítrea $T_g$ , cristalización $T_c$ y de líquidus $T_l$ .....	87
<b>Figura 4.33.</b> Curva DSC de la cinta con 82.6 % de fase vítrea donde se muestra transformación de fase de la porción cristalina así como las temperaturas de transición vítrea $T_g$ , cristalización $T_c$ y de líquidus $T_l$ .....	88
<b>Figura 4.34</b> Curva de desplazamiento de nanoindentación de la aleación $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ para una carga de 100 mN / min.....	89
<b>Figura 4.35</b> Imagen MEB de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF durante a) 21 días a 2,500 X y b) 28 días 10,000 X. ....	90
<b>Figura 4.36</b> Gráfica de liberación de iones correspondiente a la cinta con 78.8 % de fase vítrea, después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.....	92
<b>Figura 4.37</b> Gráfica de liberación de iones correspondiente a la cinta con 79.8 % de fase vítrea, después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.....	93
<b>Figura 4.38</b> Gráfica de liberación de iones correspondiente a la cinta con 82.6 % de fase vítrea, después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.....	94
<b>Figura 4.39</b> Gráfica de liberación de iones de Zr comparativa para las 3 cintas durante la prueba de inmersión en SBF. ....	96

**Figura 4.40** Micrografías de adhesión celular en el material. Micrografías representativas de células hDPSC que se tiñeron con violeta cristal después de 24 horas de incubación como se indica. *A y a*, Control, células en la placa de cultivo sin material. *B y b*, Ti6Al4V, células incubadas con Ti6Al4V comercial. *C y c*, 78.8 %, células incubadas con cinta 78.8 % de fase vítrea. *D y d*, 79.8 %, células incubadas con cinta 79.8 % de fase vítrea. *E y e*, 82.6 %, células incubadas con cinta 82.6 % de fase vítrea. Microfotografías de tres experimentos independientes. Se tomaron cinco fotografías de cada experimento..... 98

**Figura 4.42** Grafica de ensayo preliminar CCK-8 de proliferación celular durante 96 horas.... 101

**Figura 4.43** Ensayo de proliferación celular CCK-8. Los datos muestran la densidad óptica (D.O.) que fue proporcional a las células viables después de la incubación durante 24, 48, 72 y 96 h. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estandar (n = 3). \* Significativamente diferente del control (prueba *pos hoc* de Bonferroni; P <0,05). Todos los grupos experimentales fueron estadísticamente significativos del control, excepto el grupo del 79.8% a las 96 h. .... 103

## RESUMEN

Utilizando el proceso de colada en bloque enfriante giratorio (CBMS), se obtuvieron tres tipos de cintas vítreas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , con fracciones de fases cristalinas cercanas a 20 % para las tres condiciones. Los patrones de difracción de rayos X (XRD, Bruker D8) de las cintas muestran que están principalmente en estado vítreo. Mediante la caracterización por MET (Phillips Tecnai F20), se identificó la presencia de óxidos de Zr y Al. La homogeneidad de la superficie de las cintas fue examinada en un microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL JSM-7600F). El análisis térmico se realizó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC, TA Instruments SDT Q600). Se realizó una prueba de nanoindentación utilizando un nanoindentador Berkovich (BE0102 Nanovea Indenter). Se evaluó la bioactividad de las cintas mediante una prueba de inmersión en fluido corporal simulado (SBF). Las fases después de la inmersión se caracterizaron por XRD, identificando la presencia de Ca y P. La concentración de iones metálicos liberados se midió utilizando un espectrómetro de emisión atómica por plasma (Agilent Technologies 4100 MP-AES); todos los elementos encontrados no exceden niveles críticos para células humanas. Se realizó una prueba de adherencia celular utilizando células madre mesenquimales de pulpa dental humana. Además, se evaluó viabilidad y proliferación celular con un ensayo CCK-8 utilizando linfocitos humanos (Jurkat, clone E61 ATCC TIB152). Por medio de la prueba de inmersión en SBF, se encontró que la naturaleza bioinerte de la superficie de las cintas prevalece a pesar de contener una fracción de fase cristalina. El objetivo de este trabajo de investigación es determinar si la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  es biocompatible para llegar a proponerla en aplicaciones biomédicas.

**Palabras clave:** Vidrios metálicos, cintas vítreas metálicas, zirconio, bioactividad, biocompatibilidad.

## ABSTRACT

Using a chill block melt spinner (CBMS), three  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  glassy alloy ribbons were obtained, with crystalline phase fractions for the three conditions close to 20 %. The X-ray diffraction (XRD, Bruker D8) patterns of the ribbons show that they are mainly in vitreous state. From the characterization by TEM (Phillips Tecnai F20), the presence of Zr and Al oxides was identified. The chemical homogeneity of the ribbon surfaces was examined by scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-7600F). Thermal analysis was performed using differential scanning calorimetry (DSC, TA Instruments SDT Q600). The nanoindentation test was using a Berkovich nanoindenter (BE0102 Nanovea Indenter). The alloy ribbons bioactivity was performed by simulated body fluid (SBF) immersion tests. The phases after the immersion were characterized by XRD, identifying the presence of Ca and P. The released metal ions concentration was measured by plasma atomic emission spectrometer (Agilent Technologies 4100 MP-AES); all elements found do not exceed critical levels for human cells. A cell adhesion test was performed using mesenchymal stem cells from human dental pulp. Furthermore, cell viability and proliferation were evaluated with a CCK-8 assay using human lymphocytes (Jurkat, clone E61 ATCC TIB152). From the SBF immersion test, it was found that the bioinert nature of the surface of the ribbons prevails despite having a fraction of crystalline phases. This research aims to determine if the  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  alloy is biocompatible to propose it for biomedical applications.

## CAPÍTULO I INTRODUCCION

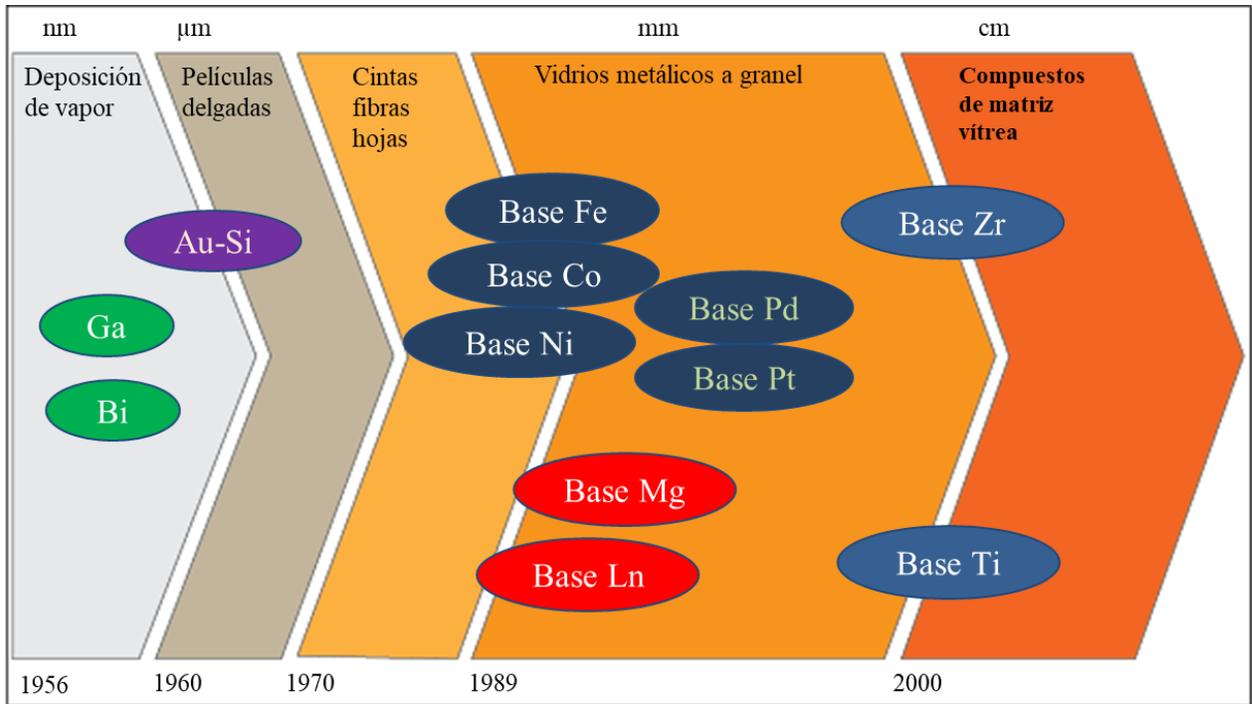
Los biomateriales utilizados actualmente para implantes portadores de carga, como prótesis de cadera y rodilla, consisten principalmente en aleaciones basadas en titanio, cromo-cobalto y acero inoxidable 316 L. Generalmente se desempeñan en un entorno hostil combinado de desgaste y corrosión dentro del cuerpo humano. Su degradación a largo plazo origina la liberación de iones metálicos y partículas en los tejidos circundantes, ocasionando el aflojamiento de las prótesis, osteoartritis, artritis reumatoide.

Para prolongar la durabilidad de los implantes, se han desarrollado constantemente nuevos materiales, como los vidrios metálicos (MG) que en contraste con la contraparte cristalina, manifiestan una microestructura sustancialmente uniforme, falta de defectos como dislocaciones y límites del grano, que ofrecen propiedades favorables como resistencia mecánica superior, alta elasticidad y excelente resistencia al desgaste y la corrosión [1-4].

Con propiedades de alta resistencia, alta dureza, módulo de Young relativamente bajo, elevado límite elástico y buena resistencia a la corrosión, los vidrios metálicos en volumen son un candidato prometedor para aplicaciones biomédicas. Zhang y col. [5] observaron que es posible obtener una alta resistencia a la fractura con una buena dureza para aleaciones que consisten únicamente en elementos metálicos, como Zr, Ti-, Ni-. Los sistemas basados en Cu-Ti y Cu-, y las aleaciones basadas en Zr y Cu son más útiles para materiales de ingeniería debido a que poseen una alta capacidad de formación de vidrio (por sus siglas en ingles GFA) y buenas propiedades mecánicas.

Recientemente, las aleaciones de fase amorfa o vidrio metálico en volumen (BMG, por sus siglas en inglés) llegaron a atraer la atención debido a sus propiedades mecánicas superiores y excelente comportamiento de resistencias al desgaste y corrosión. Los BMG no tienen estructura cristalina como los metales solidificados convencionales. Se introdujeron por primera vez en 1950 por una tasa de enfriamiento muy alta ( $10^4$ - $10^7$  °C/s) del estado de vapor o líquido. En ese momento las aplicaciones fueron pocas debido a los tamaños limitados obtenidos. En ciertos estudios se logró obtener fase amorfa a menor velocidad de enfriamiento mediante el uso de ciertos niveles de elementos de aleación dependiendo del tamaño de los átomos utilizados, permitiendo producir tamaños mucho mayores (hasta pocos centímetros). Posteriormente, se demostró la obtención de aleaciones amorfas mediante el uso de diferentes técnicas como la implantación iónica,

electrodeposición o aleación mecánica. En la Figura 1.1 se muestra el desarrollo en los sistemas BMG y las mejoras en los espesores obtenidos [6].



**Figura 1.1** Desarrollo histórico en sistemas BMG y espesores obtenidos [6].

## 1.1 OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Sintetizar y estudiar las propiedades mecánicas y bioactividad, en una aleación vítrea base Zr para generar un precedente de este material y promover estudios posteriores de biocompatibilidad y proponerla como biomaterial.

### *Objetivos particulares*

- a) Sintetizar cintas vítreas base Zr.
- b) Realizar caracterización estructural por difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido.
- c) Identificar propiedades térmicas por calorimetría diferencial de barrido.
- d) Determinar la concentración de iones metálicos liberados (iones Zr, Co, Al y Ag).
- e) Investigar la biocompatibilidad de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  mediante la evaluación de su citotoxicidad in vitro utilizando linfocitos T.
- f) Analizar la biocompatibilidad de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  mediante la evaluación de la adherencia celular in vitro utilizando hDPSC.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Considerando que los espesores obtenidos de las cintas de la aleación ZrCoAlAg permiten su aplicación directamente sobre la superficie en contacto con el entorno fisiológico, representa un bajo costo y flexibilidad en comparación con otras tecnologías. Además, presenta excelentes propiedades como resistencia al desgaste y la corrosión; así como, biocompatibilidad y proliferación celular.

## 1.3 HIPÓTESIS

Con la combinación de elementos metálicos de  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  teniendo diferentes tamaños atómicos es posible obtenerlos en fase vítrea desde el estado líquido mediante velocidades de enfriamientos medianamente rápidos. Además la conjunción de tener una estructura no cristalina de la aleación conteniendo elementos biocompatibles en mayor cantidad de Zr hacen que esta

aleación sea resistente a la corrosión y con propiedades mecánicas adecuadas para cumplir con los requerimientos para ser propuesta como biomaterial.

#### **1.4 METAS CIENTÍFICAS**

- Evaluar la bioactividad de la aleación mediante la capacidad de formar apatita en su superficie en un fluido corporal simulado (SBF).
- Obtención de cintas vítreas base Zr que limite la liberación de iones de sus componentes dentro de un fluido corporal simulado (SBF).
- Comprobar si la aleación permite cierto grado de adherencia celular sobre su superficie y evaluar si el resultado es comparable con el de una aleación comercial de uso biomédico.
- Comprender cómo la fracción cristalina de las cintas metálicas influye respecto a su biocompatibilidad en relación a la liberación de iones de los elementos en la aleación; además, observar cómo el no equilibrio estructural afecta la viabilidad y proliferación celular.

## CAPÍTULO II REVISION BIBLIOGRAFICA

Actualmente, el desarrollo de materiales con propiedades únicas se ha convertido en una gran alternativa para la fabricación de dispositivos con usos específicos. Dentro de estos materiales se encuentran los "vidrios metálicos", los cuales presentan propiedades fisicoquímicas mejoradas respecto de su contraparte cristalina. Este desarrollo implica un conocimiento profundo sobre los conceptos fundamentales que rigen a este tipo de materiales [7].

### 2.1 Vidrios metálicos

Los materiales metálicos se consideran tradicionalmente de naturaleza cristalina, poseen simetría de traslación, es decir, sus átomos constituyentes están dispuestos de una manera regular y periódica en tres dimensiones [8], sin embargo, una clase de aleaciones metálicas que, a diferencia de los metales, no tiene una estructura cristalina de largo alcance, éstas se conocen como aleaciones vítreas, las cuales no tienen fronteras de grano y los átomos están empaquetados de manera densa y al azar [9]. Son obtenidos a partir de metal fundido por un enfriamiento ultrarrápido (S.R.), entre los  $10^5$  y  $10^6$  °C/s. El metal líquido se proyecta sobre un disco giratorio por gas, lo que proporciona propiedades eléctricas y magnéticas extraordinarias al material obtenido [10].

La estructura vítrea se obtuvo por primera vez a finales de la década de 1960 cuando Pol Duwez, en el California Institute of Technology (CalTech) en Pasadena, California, había sintetizado una aleación de Au-25 at.% Si, en el estado vítreo solidificando rápidamente el líquido en aproximándose a un millón de grados por segundo. Dado que su estructura se parece a la de los vidrios, estas aleaciones también se llaman vidrios metálicos, los cuales están disponibles en forma de alambre, cinta, tiras y polvos [8, 9]. Los vidrios metálicos en volumen (BMGs) en sistemas metal-metal tales como aleaciones basadas en La, Mg y Zr se prepararon por primera vez a principios de los noventa mediante la estabilización de líquido superenfriado. Desde entonces, se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de BMG tanto para la investigación científica fundamental como para las aplicaciones industriales [11].

## 2.2 Formación de un vidrio metálico

La formación de un vidrio parece una característica de las fundiciones metálicas, se manifiesta como la interacción tanto de los factores termodinámicos como cinéticos de la solidificación, que está controlada por las propiedades intrínsecas de la aleación, así como por las condiciones de la tecnología de enfriamiento por fusión [12].

Lograr amorfizar una aleación metálica no siempre resulta fácil; para ello es necesaria la combinación de dos factores:

- 1) Una velocidad de enfriamiento suficientemente rápida para “congelar” la estructura desordenada que posee el material fundido.
- 2) Elementos inhibidores de la cristalización en la composición química de la aleación [13].

Akihisa Inoue, de Tohoku University's Institute for Materials Research, y William L. Johnson, de CalTech, han descubierto, desde la década de los ochenta, gran cantidad de vidrios metálicos multicomponentes basados en La-, Mg-, Zr-, Pd-, Fe-, Cu- y Ti, con gran enfriamiento y tasas de enfriamiento crítico bajo de 1 a 100 °C/s, similares a las de óxido. Estas propiedades permiten un aumento de tiempo (de milisegundos a minutos) antes de la cristalización, lo que permite un mayor espesor de fundición crítica ( $> 1$  cm) mediante moldeo convencional [14].

## 2.3 Capacidad de formación de vidrios (GFA)

La capacidad de formación de vidrios (GFA por sus siglas en inglés *Glass Forming Ability*), puede interpretarse como la facilidad de vitrificación, es decir, que una aleación en estado líquido al momento de ser enfriada forme una estructura atómica vítrea sin una apreciable formación de fases cristalinas [15]. La GFA es vital para comprender el origen de la formación de vidrio y es importante para diseñar y sintetizar nuevos vidrios metálicos en volumen con propiedades mecánicas únicas u otros atributos. Aunque el indicador GFA directo y cuantificable de una aleación podría ser la velocidad de enfriamiento crítico,  $R_c$ , y el grosor o diámetro máximo de la sección,  $Z_{max}$ , es muy difícil obtener los valores de  $R_c$  y  $Z_{max}$  experimentalmente [16]. Sin embargo, Inoue y su grupo de trabajo han encontrado que se pueden obtener aleaciones vitrificadas metálicas en volumen (BMG) incluso por técnicas de colada convencionales a velocidades de enfriamiento relativamente lentas.

Inoue propone que las aleaciones de BMG presenten tres características comunes mencionadas a continuación:

- 1) Pertenecer principalmente a sistemas multicomponentes
- 2) Tener relaciones de tamaño atómico significativas superiores al 12%.
- 3) Exhibir calores negativos de mezcla entre los elementos constitutivos.

La satisfacción de estos principios conduce a una elevada temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y a una baja temperatura de *liquidus* ( $T_l$ ). La popularidad de esos materiales fue impulsada en parte con el objetivo de desarrollar materiales prometedores para futuras aplicaciones, así como por la meta científica de comprender la formación y la estructura de los sólidos vítreos [17].

## 2.4 Técnicas de fabricación de vidrios metálicos

La técnica para la fabricación de estas aleaciones, llamada solidificación rápida, involucra el enfriamiento de metal fundido a velocidades tan elevadas como  $10^{-6}$  K/s de manera de que no tienen tiempo suficiente para cristalizar [9]. Las velocidades altas de enfriamiento se logran al esparcir una capa delgada de líquido en buen contacto con un substrato altamente conductivo, por ejemplo metales y zafiro. La velocidad de enfriamiento se determina por la transferencia de calor líquido-substrato y su espesor, así como por la conductividad térmica de la capa líquida. El espesor de los vidrios metálicos se limita a pocos mm [18].

Existen varias técnicas para la formación de sólidos vítreos entre los cuales los más conocidos son:

- 1) Enfriamiento en horno (templado al aire)
- 2) Templado con líquido (*Splat Cooling*)
- 3) Enfriamiento por láser (*Laser Glazing*)
- 4) Evaporación (condensación de vapor)
- 5) Templado giratorio (*Melt spinning*)

A continuación se describe cada una de las técnicas de manera breve.

#### ***2.4.1 Enfriamiento en horno (templado al aire)***

Esta técnica no es fundamentalmente diferente de las que se usa para preparar estructuras cristalinas, ya que requiere de un tiempo prolongado y temperaturas estables. Esta técnica puede ser utilizada para materiales con alta tendencia a la formación de sólidos vítreos. Se puede obtener la fundición con enfriamiento lento, lo cual se consigue apagando el horno.

Típicamente, el rango de enfriamiento es aproximadamente entre  $10^4$  y  $10^1$  K/s. Los sólidos vítreos de esta categoría son  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{As}_2\text{S}_3$  y poliestireno.

#### ***2.4.2 Templado con líquido (Splat Cooling)***

Básicamente se trata de sumergir una probeta o recipiente mediante baños de agua y hielo, entre los rangos de enfriamiento del orden de  $10^1$  y  $10^2$  K/s. Las sustancias tienen una tendencia suficientemente alta como para permitir la producción de un pequeño volumen de estructura vítrea. Entre las sustancias vítreas que se logran con este método destacan las aleaciones de Al-Au, el selenio y un vidrio metálico como el Pd-Ni-P.

#### ***2.4.3 Enfriamiento por láser (Laser Glazing)***

Comienza con un material cristalino, y un intenso pulso de láser, penetra el material fundiéndolo en una pequeña región. Al apagar el láser, el resto de material cristalino no fundido actúa como refrigerante de modo que el líquido se enfría rápidamente formando un vidrio. Este método tiene una velocidad de templado de alrededor de  $10^{10}$ ,  $10^{12}$  K/s.

#### ***2.4.4 Evaporación (condensación de vapor)***

Un flujo de vapor formado dentro de una cámara de vacío mediante una fuente de evaporación térmica del material en cuestión, choca y se deposita en la superficie fría, formándose materia vítrea. Trabaja en los rangos de  $10^9$  y  $10^{12}$  K/s. Variaciones de este método pueden involucrar vaporización de la fuente por el uso de haces de electrones, o utilizando el bombardeo de iones. Otro método consiste en la descomposición inducida de plasma en una especie molecular, técnica desarrollada para depositar la sílica vítrea desde el vapor de  $\text{SiH}_4$  [19].

#### **2.4.5 Templado giratorio (*Melt spinning*)**

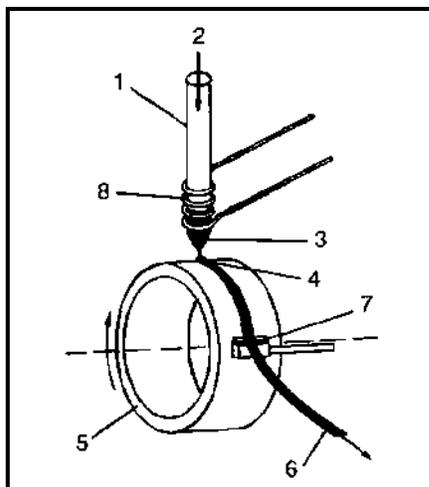
El *melt spinning* es el método comúnmente más usado hoy en día para producir cintas continuas y largas. En realidad, el desarrollo de esta técnica ha sido el principal responsable para el progreso acelerado de la tecnología de la solidificación rápida desde los setenta. El nombre del proceso de *melt spinning* se deriva en que involucra la extracción de metal líquido para producir fibras finas en forma similar de la manufactura de fibras textiles sintéticas. El proceso de *melt spinning* se puede derivar ampliamente en dos categorías, esto es, con o sin orificio. Cada uno de estos procesos, se pueden subdividir en dos variantes dependiendo de la forma en que el metal es enfriado, ya sea por radiación (en atmósfera) llamado de “vuelo libre” o en un bloque enfriante.

##### **2.4.5.1 *Melt spinning* de “vuelo libre”**

Consiste en crear y subsecuentemente solidificar un chorro de metal líquido estable. Generalmente, se crea un chorro estable por la inyección del líquido a través de un orificio y el metal es entonces solidificado por el paso a través de un medio gaseoso o líquido [18].

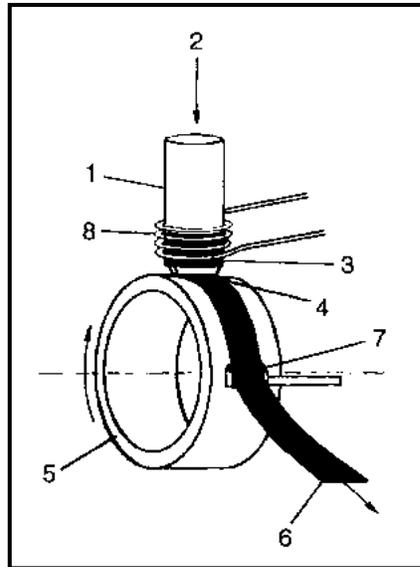
##### **2. 4.5.2 *Melt spinning* de bloque de enfriamiento (*Chill-Block Melt spinning*)**

La técnica de *Chill-Block Melt Spin* (CBMS) es el proceso de solidificación más importante debido a su bajo costo y flexibilidad en comparación con otras tecnologías como tubos de goteo y solidificación rápida por atomización [20]. El proceso incluye la expulsión del chorro de metal fundido a través de una boquilla redonda contra el sustrato de enfriamiento rápido. Este proceso es un objeto de mayor interés durante las últimas décadas, lo mismo es válido también para el método de flujo plano (PFC). Ambos métodos se basan en el uso de un único disco de enfriamiento rápido masivo como un sustrato. La Figura 1.2 muestra esquemáticamente el principio de trabajo del método CBMS.



**Figura 2.2** Esquema del equipo para la fusión de Chill-Block (CBMS): 1) crisol cilíndrico de vidrio de sílice, 2) presión de inyección de gas (N<sub>2</sub>, Ar o He), 3) aleación metálica fundida, 4) paleta de fusión en contacto con el substrato de enfriamiento, 5) disco de Cu de enfriamiento rápido, 6) cinta vítrea, 7) alerón antiadherente, 8) calentador inductivo del HF [21].

La Figura 1.3 muestra esquemáticamente un equipo para la producción de cintas metálicas vítreas anchas de acuerdo con el método PFC (método de flujo planar). La diferencia principal entre los métodos CBMS y PFC consiste en la forma de los orificios del crisol y la distancia entre el orificio y el disco giratorio de enfriamiento. En el primer caso, el orificio tiene una sección transversal redonda y un diámetro comprendido entre 0.5 y 1.5 mm. Este diámetro máximo de 1.5 mm es determinado por el requisito de la tensión superficial para poder soportar con éxito el propio peso de fusión intentando provocar un flujo de fusión espontánea a través del orificio antes de aplicar cualquier presión de eyección [21].



**Figura 2.3** Esquema de un equipo para el hilado por fusión de acuerdo con el método PFC: 1) crisol de vidrio de sílice cilíndrico con un orificio rectangular, 2) presión de inyección ( $N_2$ , Ar o He), 3) fundición metálica, 4) paleta de fusión en contacto con la superficie del disco de enfriamiento rotatorio (Cu), 5) disco de enfriamiento, 6) cinta vítrea, 7) alerón antiadherente, 8) calentador inductivo de HF [21].

Una característica importante de este proceso es que el ancho de la cinta puede ser variable, lo cual puede ser posible usando este proceso en una atmósfera inerte o al vacío, el espesor de la cinta varía de 20 a 100  $\mu m$  y las velocidades de enfriamiento alcanzadas están alrededor de  $10^6$  K/s. Gutiérrez y Szekely [18] analizaron el proceso PFC usando un modelo matemático, el cual sugiere que los parámetros más importantes del proceso PFC son:

- La velocidad de flujo del metal
- La velocidad del disco
- La naturaleza de contacto mecánico y térmico de la interfase metal-disco
- La geometría del sistema
- Las propiedades del material

Todos estos parámetros han mostrado que el PFC en operación, existe una dependencia muy delicada entre el balance de los procesos de capilaridad y el fenómeno de solidificación del

charco de metal líquido. Esto denotaría que la perturbación del metal sobre el disco es debido a la capa de gas y la superficie rugosa de disco [22-24].

## **2.5 Propiedades mecánicas de los vidrios metálicos**

Las propiedades mecánicas de los vidrios metálicos en bulto como la resistencia y dureza superiores y excelente resistencia a la corrosión y al desgaste, combinada con su incapacidad general para someterse a la deformación plástica ha sido objeto de fascinación para científicos e ingenieros [25].

## **2.6 Resistencia a la fatiga**

La resistencia a la fatiga en las aleaciones vítreas en forma de alambre se incrementa debido principalmente a dos razones:

1) Ausencia de aparición de inicio de grieta por picadura de corrosión, ya que en las aleaciones vítreas defectos estructurales asociadas con aleaciones cristalinas están ausentes, tales como límites de grano, ya que es un lugar preferente para la iniciación de dichas picaduras y por ende el avance de la grieta hasta llegar al rompimiento total del material.

2) Decremento del esfuerzo constante por tensión; esta propiedad también se da en aleaciones metálicas cristalinas, ya que el esfuerzo total en la amplitud de esfuerzo disminuye y por lo tanto la resistencia y/o límite de fatiga se incrementa [26].

## **2.7 Resistencia a la fractura**

Los vidrios metálicos son, materiales casi frágiles, porque no poseen micromecanismos intrínsecos suficientes para mitigar altas concentraciones de tensión en las puntas de las fisuras. Además, hay una ausencia de endurecimiento por deformación y una falta de barreras intrínsecas de propagación de grietas tales como los límites de grano. A pesar de estas limitaciones, algunas aleaciones vítreas presentan valores de tenacidad comparables a las aleaciones estructurales cristalinas. Por otro lado, algunos son bastante quebradizos, con características similares a un óxido o a vidrios de silicato [27]. Sin embargo, han surgido BMGs basados en Zr que presentan altas energías de fractura de impacto Charpy que oscilan entre 110 y 140 kJ/m<sup>2</sup> y un alto límite de

tenacidad a la fractura. Teniendo en cuenta que la resistencia a la fractura oscila alrededor de los 1600 MPa que es aproximadamente el doble que la de las aleaciones cristalinas [18].

## **2.8 Resistencia a la corrosión**

El comportamiento de corrosión de los BMG biomédicos basados en Zr se ha investigado en varias soluciones fisiológicas, incluyendo PBS, solución de Hank, solución salina al 0.9% NaCl, solución de Ringer, solución artificial de saliva, y soluciones SBF. Las aleaciones a base Zr y aleaciones base Ti, han mostrado una densidad de corriente pasiva inferior, un potencial de picado mucho mayor, lo que sugiere que las películas pasivas formadas en los BMG basados en Zr son más protectoras que el acero inoxidable 316L convencional, indicando su comportamiento mejorado contra la resistencia a la corrosión. La alta resistencia a la corrosión de los BMG biomédicos basados en Zr se puede atribuir a la formación de las películas pasivas, compuestas principalmente por  $ZrO_2$ , sobre la superficie de la aleación. La adición de Nb y Ag son beneficiosos para la resistencia a la corrosión, especialmente aumentada la resistencia a la corrosión contra la corrosión por picaduras [18].

## **2.9 Vidrios metálicos basados en Zr**

Entre los diversos tipos de BMG los basados en Zr han atraído el mayor interés de investigación debido a la excelente biocompatibilidad del elemento base Zr, el alto GFA y el bajo módulo de Young [28]. Se han reportado numerosas aleaciones biomédicas candidatas a BMG en sistemas de aleación basados en Zr [29, 30], Ti [31, 32], Fe [33, 34] y Mg [35, 36]. El Zr vítreo se puede obtener en condiciones ambientales y demuestra una estabilidad térmica superior en comparación con otras aleaciones vítreas, lo que podría conducir a nuevas aplicaciones a alta temperatura de metales vítreos [37]. Debido a que el Zr es un elemento altamente biocompatible [38, 39], los BMG basados en Zr se encuentran entre los sistemas de formación de vidrios más estudiados, sus aplicaciones biomédicas atraen intereses tanto científicos como industriales. Estos se han presentado con una alta dureza aproximadamente dos o tres veces más alta que la del acero 316L biomédico convencional y que las aleaciones de Ti y Zr, así como un alto límite elástico considerablemente mayor [40]. Por ejemplo, la resistencia y dureza superiores dan lugar a una buena resistencia al desgaste, la alta resistencia a la biocorrosión ofrece una larga vida útil y baja liberación de iones; lo que inspira sus prometedoras aplicaciones biomédicas, especialmente

como materiales de implantes ortopédicos, dispositivos de fijación de huesos pequeños (implantes de osteosíntesis) o aleaciones para implantes dentales [41]. Wang y col. [42] evaluaron la viabilidad de BMGs  $Zr_{41}Ti_{14}Cu_{12}Ni_{10}Be_{23}$ ,  $Zr_{44}Ti_{11}Cu_{10}Ni_{10}Be_{25}$ , y  $Zr_{57}Nb_5Cu_{15.4}Ni_{12}$  obteniendo que muestran una gran biocompatibilidad. Sin embargo, exhiben corrosión por picaduras durante la medición electroquímica, así como iones disueltos de Ni y Be en fluido corporal simulado (SBF).

Los BMG basados en Zr poseen módulos elásticos relativamente bajos (70-90 GPa) más cercanos a los del hueso humano (20-30 GPa) que las aleaciones comerciales para implantes (> 100 GPa), lo que puede aliviar el efecto de protección contra el estrés. Mientras tanto, la alta resistencia específica de los BMG basados en Zr garantiza implantes competentes con una geometría más pequeña, lo que reduce el daño tisular. Además, su alta dureza les ofrece una buena resistencia al desgaste, lo que resulta en menos restos de desgaste inflamatorio. Por otra parte, la homogeneidad química y estructural de los BMG basados en Zr les proporciona una buena resistencia a la corrosión, que desempeña un papel importante en la supervivencia del entorno agresivo in vivo. Además, estudios de biocompatibilidad in vitro encontraron que respaldan una adhesión celular o proliferación similar o incluso mejor en comparación con las aleaciones biomédicas comerciales. Evaluaciones in vivo revelaron una respuesta común de cuerpo extraño y no toxicidad de BMGs en pruebas en animales.

En la última década, se han explorado series de sistemas de formación de vidrio basados en Zr con alto GFA. Generalmente se utilizan elementos como Ni y Cu para lograr un alto GFA; sin embargo, esos elementos son altamente tóxicos para el metabolismo celular, lo cual restringe sus aplicaciones biomédicas. Por lo tanto, se espera que el desarrollo de aleaciones de BMG sin níquel con alta capacidad de formación de vidrio (GFA) mejore aún más su biocompatibilidad [43]. Buzzi y colaboradores [44] estudiaron la citotoxicidad de BMG libres de Ni demostrando muy buena biocompatibilidad en términos de viabilidad celular y actividad metabólica. Recientemente, se ha investigado la biocompatibilidad de los BMG basados en Zr libres de Ni, utilizando células de fibroblastos de ratón. Sin embargo, los ensayos de biocompatibilidad que utilizan células humanas se parecen más a las condiciones clínicas [45]. Entre los diversos BMG basados en Zr, el sistema Zr-Al-Co libre de Ni y Cu es atractivo debido a su buena estabilidad térmica, propiedades mecánicas superiores, alta resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad comparables al Zr puro y aleaciones de Ti-6Al-4V. Sin embargo, el ternario

Zr-Al-Co BMG exhibe un pequeño GFA con un diámetro crítico de 3 mm para el cilindro vítreo. Un estudio previo descubrió que la adición de Cu tóxico a la aleación de Zr-Al-Co puede mejorar su GFA. Por el contrario, los elementos biocompatibles de Ti, Nb y Ta pueden mejorar notablemente la resistencia a la corrosión de la aleación de Zr-Al-Co pero reducen fuertemente su GFA [46]. Liu y col. [47] investigaron las propiedades mecánicas y de biocompatibilidad del BMG  $Zr_{60.14}Cu_{22.31}Fe_{4.85}Al_{9.7}Ag_3$  exento de Ni, encontrando que tenía un módulo de Young bajo de  $82 \pm 1.9$  GPa, y una liberación de iones metálicos por debajo de los límites permitidos en el cuerpo humano. Sun y col. [48] estudiaron el BMG  $Zr_{62.5}Cu_{22.5}Fe_5Al_{10}$  libre de Ni, que comparado con Ti biomédico comercial, presentó un bajo módulo elástico de 50 GPa, mejor morfología de adhesión y disposición citoesquelética de células madre mesenquimales de médula ósea humana, y un alto nivel de adsorción de proteína. Recientemente, la biocompatibilidad de BMGs basados en Zr libres de Ni ha sido investigada utilizando células de fibroblastos de ratón. Sin embargo, ensayos de biocompatibilidad utilizando células humanas son más cercanos a las condiciones clínicas reales [45].

Por otra parte, durante las últimas dos décadas, se han desarrollado varias aleaciones formadoras de BMG tales como aleaciones basadas en Mg, Cu, Fe y Ti mediante un método de fundición de molde de cobre convencional. Sin embargo, típicamente exhiben flujo plástico limitado y falta de endurecimiento por trabajo, y por lo tanto son propensos a fallas catastróficas a temperatura ambiente [49]. Muchos de los actuales BMG basados en Zr pueden considerarse desarrollos de aleaciones ternarias simples en los sistemas Zr-Al-Cu, Zr-Al-Co y Zr-Al-Ni. El uso de adiciones de aleación en BMG basados en Zr ha sido ampliamente estudiado y bien practicado. Con adiciones de aleación, se pueden producir muestras completamente vítreas con diámetros superiores a 20 mm en varios sistemas multicomponentes. Mientras tanto, las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión de los BMG basados en Zr se pueden mejorar sin deteriorar su GFA seleccionando adecuadamente los elementos de aleación, lo que impulsa las aplicaciones de ingeniería de esos BMG.

Los BMG basados en Zr con altos contenidos de Zr (62.5-70%) como las aleaciones  $Zr_{70}Ni_{16}Cu_6Al_{18}$  [50] y  $Zr_{69.5}Cu_{12}Ni_{11}Al_{7.5}$  [51], se han considerado candidatos importantes para aplicaciones estructurales debido a su deseable deformación plástica y resistencia a la fractura. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la dificultad para lograr un equilibrio entre un GFA superior y una alta plasticidad. Por ejemplo, el aumento en el contenido de Zr podría conducir a

una disminución en el GFA. El enfoque de la adición elemental en los BMG basados en Zr se ha llevado a cabo correctamente para mejorar el rendimiento integral de los BMG. De hecho, entre estas sustituciones elementales, Co muestra un radio atómico similar y electro-negatividad con Ni, ya que se encuentran en el mismo subgrupo tradicional en la tabla periódica elemental [49].

Informes recientes indican que la adición de Ag (o Y), que tiene una entalpía positiva de mezcla con Cu (o Zr), a algunos BMG basados en Cu-Zr puede mejorar su plasticidad. Se ha argumentado que la adición de un elemento con calores positivos de mezcla con algunos de los elementos constitutivos de la aleación puede conducir a la falta de homogeneidad química local, lo que mejora la formación de múltiples bandas de corte, facilitando el flujo plástico. Curiosamente, la mejora de la plasticidad mediante la adición de un elemento que tiene un calor positivo de mezcla con el elemento constituyente a menudo acompaña a la mejora simultánea de los GFA [28].

Entre estos, el sistema Zr-Al-Co-Ag BMG libre de Cu y de Ni exhibe alta capacidad de formación de vidrio, buena biocompatibilidad mecánica, alta resistencia a la corrosión en fluidos corporales artificiales, así como buena viabilidad celular in vitro y actividad de proliferación comparable a Zr puro y la aleación Ti-6Al-4V. Por lo tanto, es de gran interés preguntarse si el Zr-Al-Co-Ag BMG está calificado para ser utilizado para implantes ortopédicos o prótesis de tejido duro [41].

## **2.10 REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE**

La solidificación rápida (RQ) es la técnica más utilizada para producir aleaciones vítreas; se han desarrollado una serie de técnicas que utilizan los principios del enfriamiento rápido desde el estado líquido: hilado de fusión, fundición a presión, moldeo de cobre, colado por succión, etc. La solidificación rápida es una técnica de procesamiento en la que se pueden obtener propiedades y microestructuras inusuales en contraste con los métodos convencionales. Se pueden producir materiales con grano fino, tamaño de grano uniforme y homogeneidad química dentro de los granos. Jassim y col. [52] obtuvieron cintas de aleaciones de Al-Mg 5052 y 5083 con espesor de 20 a 330  $\mu\text{m}$  y anchura de 0.97 a 7.4 mm., utilizando un proceso de hilado por fusión en rollo único; mejorando las propiedades de las aleaciones de solidificación rápida. La dureza y la resistencia a la tracción fueron mejoradas a más del doble de los valores originales antes del proceso de solidificación rápida. La velocidad de corrosión de las cintas solidificadas

rápidamente se mejoró siendo inferior a la velocidad de las aleaciones originales antes de la solidificación rápida. Se convirtieron en 1.643 en lugar de 10.02 mpy (milímetros por año, por sus siglas en inglés) para la aleación 5052 y 1.954 en lugar de 6.911 mpy para la aleación 5083.

Generalmente, la composición química de las aleaciones se limita a una estrecha gama de composiciones próximas a eutécticos profundos. En comparación con las técnicas de enfriamiento rápido, el aleado mecánico puede producir aleaciones vítreas incluso cuando su composición está lejos de la correspondiente a los eutécticos profundos o si el calor de mezcla de los constituyentes es positivo. En la molienda de bolas de alta energía, una mezcla de polvos elementales de los constituyentes se somete a fenómenos de deformación plástica severa repetida, soldadura en frío y fracturas. Debido a muchos defectos inducidos por la molienda, tiene lugar la reacción de estado sólido entre los constituyentes, dando lugar a la formación de la aleación. Neamtu y col. [53] presentan un estudio comparativo sobre la preparación de aleaciones vítreas basadas en Fe a través de la aleación mecánica (MA) y enfriamiento rápido (RQ). La preparación de  $\text{Fe}_{75}\text{Si}_{20}\text{B}_5$  % at. en estado vítreo mediante aleación mecánica seca o enfriamiento rápido no fue posible cuando se usó una mezcla de polvo elemental como muestra inicial. Sin embargo utilizando la misma mezcla de polvos elementales pero mediante aleación mecánica húmeda utilizando benceno como agente de control del proceso (PCA), la amorfización de la aleación se alcanzó después de 20 h de molienda. Se demostró que la descomposición del PCA durante la molienda conduce a una contaminación de la aleación con un 2.3 % en peso de C, siendo esta contaminación el motivo del éxito de la amorfización de la aleación. Usando los polvos obtenidos por MA húmeda o una mezcla de polvo elemental de Fe, Si, B y C, se obtuvieron cintas vítreas por RQ. Durante la cristalización de las muestras vítreas, se forma una mezcla de  $\alpha$ -Fe (Si) y boruros de Fe. Las mediciones magnéticas mostraron que las características magnéticas de las muestras están fuertemente influenciadas por la técnica utilizada para su preparación.

Estudiando la formación de vidrio superficial en la deposición por electro-chispa de precursores con GFA alto y bajo usados como electrodos consumibles, Petrzhik y col. [12] encontraron que la formación de vidrio superficial es posible debido a la interacción química débil y fuerte de un electrodo y un sustrato. El primero se debe a la transferencia de masa de un precursor de alta capacidad de formación de vidrio (GFA) sobre un sustrato metálico con fusión de ánodo "gota a gota" local estimulada por descarga eléctrica y no necesita interacción química. El segundo debido a la interacción de difusión entre precursor de bajo GFA y un sustrato metálico por una

fusión local, que es otra manera de formar capa superficial vítrea. En ambos casos, la velocidad de solidificación de las gotas fundidas por deposición por electro-chispa es suficiente para suprimir la cristalización y se compara con el hilado por fusión.

La composición de las aleaciones que forman BMG a base de Fe, así como de base Zr, sometidas a recocido consiste en una mezcla de fases cristalinas de equilibrio con estructura compleja, denominada Compuestos de Formación de Vidrio (GFC). Al menos uno de ellos es fase de Laves. Pueden formar eutécticos como lo hacen los elementos químicos. La síntesis de BMG por fusión, así como polvos vítreos por aleación mecánica va mucho más rápido a partir de una mezcla de GFC, que a partir de elementos puros. La unión de elementos constituyentes en un GFC multicomponente reduce una serie de componentes del sistema y facilita la determinación del punto eutéctico para nuevos sistemas de formación de BMG. La porción de fase vítrea en las muestras a granel enfriadas depende fuertemente de la temperatura de enfriamiento de la masa fundida, su máximo se observa solamente para un rango de temperatura limitado.

Los vidrios metálicos en volumen poseen un empaquetamiento vítreo de sus elementos metálicos constituyentes, por lo que no implican mecanismos de plasticidad a partir de dislocaciones y de límites del grano sino que se deforman por localización de tensiones en bandas estrechas de cizalladura, Li y col. [54] utilizan las teorías de la inestabilidad y el método de elemento finito basados en el volumen libre para investigar sistemáticamente la relación entre las bandas de cizallamiento y los factores geométricos de BMG con muescas. Aunque generalmente se cree que un sólido frágil presentará una resistencia reducida con la introducción de muescas, esto se entiende principalmente por la competencia entre la falla de cavitación y la localización por cizallamiento, Li añade dos factores importantes que contribuyen a estos efectos de muesca. El primero cuando el mecanismo dominante es la fractura normal a lo largo del plano de la muesca, el comportamiento de puente a gran escala es responsable de la insensibilidad de la muesca. En este caso, una zona débil adicional a partir de las raíces de muesca reducirá aún más la concentración de tensión y, de este modo, ampliará el régimen paramétrico para la insensibilidad de la muesca. En segundo lugar, la ductilidad de los BMG con muescas depende de la eficacia con la que las bandas de corte están bloqueadas geoméricamente o por los campos de tensión en descomposición. Las predicciones explícitas de los patrones de las bandas de cizalla ayudan a identificar los papeles clave desempeñados por los factores geométricos a lo largo de esta línea.

La banda de corte en aleaciones vítreas se origina a partir de la dilatación a escala atómica debido a la cizalla de átomos aleatoriamente empaquetados, Jiang y col. [55] desarrollaron un modelo para predecir la dilatación de la banda de corte en aleaciones vítreas. Teniendo en cuenta la creación de volumen libre y la difusión a través de transformaciones de corte (STs). El modelo revela que la dilatación en bandas de corte con espesor fijo aumenta con la disminución del volumen de activación de STs que determina la distancia de difusión del volumen libre. El grado de desarrollo de una banda de cizallamiento, denotado por su grosor, afecta también la dilatación resultante dentro de ella. Las bandas de cizallamiento maduras suelen poseer una dilatación mayor que las bandas de cizallamiento recientemente formadas. Las dilataciones previstas coinciden con los valores de las mediciones y simulaciones. Los resultados obtenidos corroboran la idea de que las bandas de corte en aleaciones vítreas resultan de inestabilidades topológicas locales de ST.

Por medio de la técnica de proceso de hilado de fusión de baño de agua giratorio, Torres y col. [56] presentan un estudio detallado de los parámetros óptimos para obtener alambres vítreos de ultra alta resistencia. Produjeron 2 Series de aleaciones de vidrios metálicos en forma de alambre. La serie A tiene la fórmula general de  $Fe_{78-x} Cr_x Si_{10} B_{12}$  con  $X=0, 3.5, 6.25$  y  $8$  % at.; y las Serie B tienen la fórmula  $Fe_{77.5-x} Cr_x Si_{7.5} B_{15}$  con  $X=0, 4$  y  $8$  % at.. La resistencia a la tensión de estos sistemas de aleación se compara con la de alambres de acero de alta resistencia (HT) utilizados para refuerzos neumáticos (diámetro  $245 \mu m$ ). Lograron una resistencia a la tensión de algunos alambres aleados de 3.5 GPa. Que es atribuida a la fuerte interacción entre metales de transición y metaloides y su mejoramiento cuando un segundo elemento de transición es añadido; en este caso, cromo (Cr). De este modo, la resistencia a la tensión aumenta sustancialmente cuando Cr reemplaza gradualmente Fe de 8 a 10 % de Cr. Obtuvieron alambres dúctiles y continuos con una redondez cercana al 100% a partir de la combinación de una serie de condiciones de fundición, que dependen de la composición de la aleación, orificio de la boquilla, distancia de la punta agua/boquilla, sobre calentamiento de fusión, velocidad de chorro de fusión y velocidad de agua/tambor.

Déo y col. [57] han propuesto un nuevo criterio para predecir y seleccionar la capacidad de formación de vidrio (GFA) de las aleaciones metálicas. Este criterio de selección se aplicó en aleaciones Zr-Ni-Cu obtenidas por técnicas de solidificación rápida y su predictibilidad se analizó experimentalmente. Los resultados confirman que las composiciones de aleación con los mejores

valores teóricos de GFA tienen más porcentaje de fase vítrea, así como la impureza de oxígeno redujo drásticamente la GFA. Sin embargo, la reducción sistemática de la GFA produjo una buena correlación entre el criterio de selección y los resultados experimentales. Encontraron que la velocidad de enfriamiento crítico para la formación de vidrio ( $R_c$ ) se correlaciona bien con la combinación de la mínima inestabilidad topológica ( $\lambda_{\min}$ ) y el parámetro termodinámico ( $\Delta h$ ). El criterio ( $\lambda_{\min}$ ) se basa en el concepto de inestabilidad topológica de estructuras cristalinas estables y ( $\Delta h$ ) depende de la diferencia media de la función de trabajo ( $\Delta\Phi$ ) y de la diferencia de densidad electrónica media  $\Delta n_{1/3ws}$  entre los elementos constitutivos de la aleación. Con el criterio de selección abre la posibilidad de obtener nuevas composiciones de aleación con una alta GFA, reduciendo los procedimientos experimentales.

La estructura y las propiedades de los materiales pueden adaptarse mediante adiciones de aleación adecuadas, ésta técnica se ha considerado ampliamente para mejorar propiedades mecánicas en aplicaciones metalúrgicas. En el campo de los vidrios metálicos a granel (BMGs), las adiciones de aleación también han demostrado desempeñar papeles efectivos en la mejora de la capacidad de formación de vidrio (GFA), estabilidad térmica, resistencia a la corrosión, propiedades mecánicas y magnéticas. Hua y col. [58] investigaron los efectos de la sustitución parcial de Ni por Ag en aleaciones de  $Zr_{56}Al_{16}(Ni_{1-x}Ag_x)_{28}$  (at.%,  $X = 0, 0.1, 0.2, 0.3$  y  $0.4$ ) sobre su capacidad formadora de vidrio (GFA), cinética de cristalización, propiedades mecánicas y comportamiento de la corrosión. Encontraron que la sustitución parcial de Ni por Ag en Zr-Al-Ni, BMG aumenta significativamente la estabilidad del líquido sobre-enfriado con alto valor de (temperatura reducida de transición vítrea)  $T_{rg}$  y  $Y$ , lo que conduce a una mejora significativa en la GFA. Obtuvieron una varilla de aleación totalmente vítrea con un diámetro de 20 mm en aleación  $Zr_{56}Al_{16}(Ni_{0.7}Ag_{0.3})_{28}$ . El BMG a base de Zr soportado con Ag, presenta un exponente  $n$  de Avrami menor que el del BMG Zr-Al-Ni libre de Ag, lo que indica que la velocidad de nucleación se reduce mediante la adición de Ag. El BMG de Zr-Al-Ni-Ag exhibe mayor resistencia a la corrosión en solución de NaCl al 3 % en masa que la de otros BMGs basados en Zr conocidos con una alta GFA. Además, los BMGs poseen una alta resistencia a la compresión de 1830-2000 MPa, una gran deformación plástica de 2.7-3.1%, un módulo de Young de 93-100 GPa y una resistencia específica elevada de 274-312 MPa cm<sup>3</sup>/g.

En comparación con películas de aleación cristalina convencionales, las películas delgadas de vidrios metálicos (TFMG, por sus siglas en inglés) presentan propiedades únicas, tales como alta resistencia, propiedades de fatiga mejoradas y buena resistencia a la corrosión.

Wang y col. [59] fabricaron vidrios metálicos de películas delgadas TFMG de Zr-Ti-Si-W sobre sustratos de Si y acero inoxidable AISI 316L por un sistema de co-pulverización, fabricaron 5 TFMG con diferentes concentraciones de Si, entre 14.3 y 19.7 % at.; para un bajo contenido de oxígeno en la muestra, se observó que a medida que aumentaba el contenido de Si aumentaba la dureza y la resistencia a la corrosión. La mayor dureza que registraron fue de 8.1 GPa, el cual se obtuvo de una muestra que contenía 19.6 % de Si (el segundo contenido de Si más alto) y una baja concentración de oxígeno. Se produjeron muestras con alto contenido de oxígeno debido a la contaminación de la atmósfera residual dentro de la cámara durante el proceso de pulverización catódica que fueron alrededor de 9 a 10 % at., para estas muestras se mostró un efecto perjudicial para la dureza y la resistencia a la corrosión del recubrimiento, debido a defectos de fisuras superficiales pronunciados en comparación con las muestras con bajo contenido de oxígeno. Sin embargo, se observó una dureza similar y un aumento de la resistencia a la corrosión por la concentración creciente de Si para los TFMG de Zr-Ti-Si-W con alto contenido de oxígeno. Ellos concluyeron que se obtuvieron suficientes propiedades de adhesión, buena resistencia a la corrosión y una biocompatibilidad aceptable para los cinco recubrimientos vítreos de Zr-Ti-Si-W independientemente de su concentración de oxígeno.

Deng y col. [60] depositaron exitosamente cuatro vidrios metálicos de película delgada Zr-Ti-B-Si que contenían diversas concentraciones de silicio de 12.4 a 17.3 % at. utilizando objetivos puros de Zr, Ti, B y Si mediante un sistema de co-pulverización catódica. Sólo se observó fase vítrea para cada revestimiento. La rugosidad superficial del TFMG de Zr-Ti-B-Si disminuyó con el aumento del contenido de Si. Se encontraron microestructuras densas y habituales para recubrimientos con un contenido de Si superior al 13.9 % at.. Se obtuvo una muy alta dureza, superior a 10 GPa, además el módulo de elasticidad y la relación H/E aumentaron con el aumento de la concentración de Si debido a su naturaleza de enlace covalente y su efecto sobre el decremento de la distancia atómica media, el empaquetamiento atómico más denso y menor volumen libre. Obtuvieron una excelente resistencia a la corrosión de los TFMGs Zr-Ti-B-Si confirmada por el ensayo de polarización potenciodinámica en solución acuosa de NaCl al 5.0 %

en peso. Concluyendo que el contenido de Si mostró una influencia positiva en la dureza, adherencia y comportamiento anticorrosivo del vidrio metálico de película delgada Zr-Ti-B-Si. La estructura de los vidrios metálicos no se caracteriza por una disposición periódica de largo alcance o una disposición completamente aleatoria de los átomos. Las unidades base estructurales no son celdas unitarias como en el caso de sólidos cristalinos, sino varios tipos de poliedros de grupos de átomos. La presencia de estas unidades estructurales específicas basadas en agrupaciones da lugar a excepcionales propiedades físicas y funcionales de aleaciones metálicas no cristalinas en comparación con sus contrapartes cristalinas. Zeman y col. [61] prepararon aleaciones binarias de película delgada Zr-Cu mediante co-pulverización no reactiva convencional de DC y de magnetron de impulso no reactivo utilizando dos magnetrones desequilibrados equipados con objetivos de Zr y Cu. El magnetron con el objetivo Zr fue operado en régimen de corriente continua mientras que el magnetron con el objetivo de Cu en un régimen de impulsos en condiciones de descarga de baja o alta densidad. Se prepararon películas delgadas de Zr-Cu con una estructura vítrea en un intervalo muy amplio del contenido de Cu (18-88 % at.) cuando se empleó la deposición en las condiciones de descarga de baja densidad. Investigaron sistemáticamente la evolución de la estructura, el comportamiento térmico, las propiedades mecánicas, eléctricas y superficiales de las películas de Zr-Cu con un contenido creciente de Cu. La transición vítrea se reconoció inequívocamente para las películas con el contenido de Cu entre aproximadamente 30 y 65 % at. de Cu independientemente de las condiciones utilizadas de descarga de baja o alta densidad. La temperatura de transición vítrea aumentó gradualmente con el aumento del contenido de Cu y se alcanzó el máximo de la región líquida superenfriada para aproximadamente 55 % at. de Cu. Se observó una clara correlación entre la evolución de la temperatura de cristalización y las propiedades mecánicas con el aumento del contenido de Cu. La deposición en las condiciones de descarga de alta densidad dio como resultado una preparación de las aleaciones metálicas de película delgada Zr-Cu con un esfuerzo de compresión ( $<0$  GPa), una dureza aumentada ( $> 7$  GPa), muy lisa (rugosidad superficial  $<1$  nm) y superficie hidrofóbica (ángulo de contacto de agua  $> 100^\circ$ ).

La adherencia microbiana en la superficie de contacto que conduce a la contaminación microbiana y afecta el funcionamiento de una variedad de ambientes humanos. Por lo tanto, la reducción de la adhesión microbiana y la formación de bio-película en las superficies de los materiales es un tema de importancia médica y social. Chu y col. [39] fabricaron vidrios

metálicos de películas delgadas TFMG basado en Zr que contiene Cu en placas de acero inoxidable SUS304, consiguiendo una tasa bactericida del 99% contra *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en todos los recubrimientos TFMG. Los resultados muestran que la superficie del sustrato de acero inoxidable SUS 304 puede ser modificada con el TFMG Zr-Cu-Ni-Al depositado, y su eficacia antimicrobiana mejorada contra esas bacterias se atribuye a su superficie vítrea áspera, propiedades hidrófobas y liberación de iones de cobre. Los TFMG desarrollados tienen una dureza adecuada, buena capacidad de adhesión y eficiencias antimicrobianas por lo que pueden ser utilizados como un candidato prometedor para mejorar las propiedades superficiales de los aparatos médicos y también para reducir la posibilidad de infección nosocomial.

Lou y col. [62] cultivaron seis películas delgadas vidrios metálicos TFMGs de Zr-Ti-Fe mediante un sistema de co-pulverización de magnetrón usando blancos puros de Fe, Zr y Ti bajo diferentes controles de potencia de objetivo. El contenido en Fe de recubrimientos aumentó de 17.8 a 49.8 % obtuvieron fases vítreas y microestructura habitual de sección transversal para cada recubrimiento. Encontraron muy poca acumulación después de la prueba de nanoindentación, que no tuvo influencia sobre la medición de propiedades mecánicas. La dureza y el módulo elástico del TFMG aumentaron de 5.4 a 10.4 GPa y 73 a 135 GPa, respectivamente, con el aumento del contenido de Fe de 17.8 a 49.8 %. Parece que el átomo de Fe no se ionizó en solución para convertirse en tóxico para las células adheridas a la superficie del TFMG. Por lo tanto, el contenido de Fe tiene principalmente un efecto sobre las propiedades mecánicas de la TFMG en lugar de la biocompatibilidad. Se confirmó la buena biocompatibilidad de cada TFMG con el ensayo de proliferación usando células MG-63. Debido a la mejora intrínseca de la dureza y las propiedades adicionales de la biocompatibilidad, concluyendo así que los seis materiales de película delgada de vidrio metálico muestran posibilidades prometedoras para la aplicación biomédica.

La mayoría de los BMG basados en Zr y en Ti contienen Ni como un elemento importante que es propenso al problema de alergia humana, por lo que Li y col. [63] seleccionaron BMGs basados en Ti y Zr libres de Ni,  $Ti_{40}Zr_{10}Cu_{36}Pd_{14}$  y  $Zr_{48}Cu_{36}Al_8Ag_8$ , con tres metales comparación aleación  $Ti_6Al_4V$ , Cu puro, y Zr puro, que también se examinan simultáneamente de acuerdo con ISO10993-5 (Evaluación biológica de los dispositivos médicos). Realizaron varias pruebas de biocompatibilidad, co-culturales con la línea celular de fibroblastos L929, las cuales se dividieron

en contacto directo y contacto indirecto (ensayo MTT), en estos dos BMGs, así como en las muestras de comparación de  $Ti_6Al_4V$  y Cu puro. Observaron que tanto el BMG  $Ti_{40}Zr_{10}Cu_{36}Pd_{14}$  como la aleación  $Ti_6Al_4V$  presentan un comportamiento similar de adherencia celular después de 48 horas de cultivo, las células L929 de salud muestran una morfología muy dispersa y extendida con un filopodio de forma de huso. Además, se encontró que un mayor número de células se unían a la superficie del BMG  $Ti_{40}Zr_{10}Cu_{36}Pd_{14}$  que a la superficie de la aleación  $Ti_6Al_4V$ . La tasa de supervivencia celular de BMG  $Ti_{40}Zr_{10}Cu_{36}Pd_{14}$  y la aleación  $Ti_6Al_4V$  puede alcanzar hasta  $99\% \pm 5\%$  mediante pruebas de contacto directo e indirecto. De acuerdo con la norma ISO 10993-5,  $Ti_{40}Zr_{10}Cu_{36}Pd_{14}$  BMG se puede clasificar en el primer nivel (ligera citotoxicidad) que es el mismo nivel que la aleación  $Ti_6Al_4V$ , pero BMG  $Zr_{48}Cu_{36}Al_8Ag_8$  se clasificaría en el cuarto nivel (severa citotoxicidad). En base a los resultados obtenidos se cree que BMG  $Ti_{40}Zr_{10}Cu_{36}Pd_{14}$  tiene un gran potencial en el campo médico debido a su excelente biocompatibilidad similar o incluso mejor que la aleación  $Ti_6Al_4V$ .

Actualmente, el titanio y sus aleaciones, se han utilizado ampliamente en aplicaciones clínicas como dispositivos implantables a largo plazo debido a su excelente biocompatibilidad, peso ligero y buena resistencia a la corrosión. Los productos de Ti-6Al-4V se han desarrollado como implantes que reemplazan tejidos duros defectuosos, como placas óseas, articulaciones de la cadera tornillos y clavos para reconstrucción oral y maxilofacial así como implantes de raíces dentales. Sin embargo, las principales limitaciones del Ti y sus aleaciones incluyen un desajuste significativo en el módulo de Ti de Young ( $E=110$  GPa) con el del hueso (10-30 GPa) produciendo un "efecto de protección contra el estrés" en el hueso circundante, el desgaste de las partículas que causa el aflojamiento y el fallo del implante, y la distorsión de la evaluación de imágenes de resonancia magnética (RMN) postoperatoria. Mientras que, se duda clínicamente de la bioseguridad de la aleación Ti-6Al-4V porque la liberación de iones de vanadio al cuerpo humano puede causar problemas de salud a largo plazo, como neuropatía periférica y enfermedad de osteomalacia [43, 64]. El circonio (Zr) y el titanio (Ti) comercialmente puro tienen muchas propiedades similares, como buena resistencia mecánica y biocompatibilidad, estructuras electrónicas de valencia de metales de transición similares y superficies que generalmente están cubiertas con una película de óxido delgada y químicamente estable, que sirve como una capa protectora contra la corrosión. El Ti y sus aleaciones son los materiales de implantes más utilizados clínicamente, a diferencia de Zr y sus aleaciones. Sin embargo, después de la

implantación, ambos materiales tienen una buena consolidación, aunque la respuesta ósea es mejor con Zr que con Ti. Incluso si se considera la inevitabilidad de la liberación de iones metálicos durante la biocorrosión, se reconoce que la toxicidad de los iones Zr es mínima debido a la falta de combinación con las biomoléculas. Además, los estudios in vivo indican que los materiales de Zr y relacionados con Zr, como cerámicas y recubrimientos de Zr, exhiben una excelente osteointegración y se han utilizado previamente como materiales para implantes óseos. Por lo tanto, se cree que Zr es el mejor material de implante y debería ser más utilizado en el futuro. [64, 65]. El elemento Zr está en el mismo grupo con Ti. Oak y col. [66] prepararon cintas de aleación vítrea con base de Ti mediante el método de hilatura por fusión en rollo simple, las cuales no contienen los elementos Al y Ni que originan citotoxicidad y neurotoxicidad. Examinaron las propiedades mecánicas y químicas en comparación con la aleación  $Ti_{60}Al_{4}V$  y Ti puro que se han utilizado en la actualidad para biomateriales. De diferentes composiciones nominales utilizadas la cinta de aleación vítrea  $Ti_{60}Zr_{10}Ta_{15}Si_{15}$  presentó buena flexibilidad para la fijación del hueso, resistencia a la tensión y módulo de Young de 2390 MPa y 88 GPa, respectivamente. Las pruebas de polarización anódica y ICP/AES demostraron que la cinta de aleación  $Ti_{60}Zr_{10}Ta_{15}Si_{15}$  fue pasivada muy fácilmente por una fuerte película pasiva incluso en varias soluciones acuosas y tenía una densidad de corriente pasiva inferior de aproximadamente  $10^{-2} Am^{-2}$  en 1 % en peso de ácido láctico, 3 % masa de NaCl y soluciones acuosas PBS (-) que los de la aleación Ti y  $Ti_{60}Al_{4}V$  abierta al aire a 310 K. Debido a su alta resistencia a la corrosión la cinta de aleación vítrea  $Ti_{60}Zr_{10}Ta_{15}Si_{15}$  tiene gran potencialidad para biomateriales como dispositivos ortopédicos de fijación ósea.

Nagase y col. [67] obtuvieron alambres continuos de aleación binaria de Ti-Zr por el método de extracción de fusión del tipo fusión de arco, a pesar de la alta reactividad de las aleaciones en estado fundido. La aleación binaria Ti-Zr mostró una alta capacidad de formación de alambre durante el proceso de extracción por fusión, independientemente de la concentración de Ti. Por lo tanto, fue posible formar hilos rápidamente templados usando aleaciones  $Ti_{100-x}Zr_x$  ( $x=10-80$  % at.). Los alambres de aleación Ti-Zr binarios continuos mostraron un brillo blanco metálico, que indica que no se forma una capa gruesa de óxido indeseada durante el proceso de extracción de fusión; rugosidad superficial despreciable que puede atribuirse a la cristalización de la fusión y/o transición de fase durante el vuelo libre en la atmósfera de gas Ar y alta resistencia a la tensión estimada de 900 MPa para alambres de diámetro de 100  $\mu m$ . Todos los alambres fabricados se

doblaron a través de un ángulo de  $180^{\circ}$  sin ninguna fractura. Por lo tanto, se pueden producir alambres metálicos dúctiles con alta resistencia a la tensión a partir de aleaciones de Ti-Zr en un amplio rango de composición. Como una rama importante de biomateriales, los metales biomédicos son ampliamente utilizados para reemplazar o reparar los componentes que soportan la carga del cuerpo humano, incluyendo cadera, rodilla, articulaciones de los dedos y raíces dentales. Con la agravación del envejecimiento de la población y los accidentes de lesiones por la industria, el tráfico o los deportes, la demanda de aleaciones para implantes médicos está aumentando notablemente. Las aleaciones biomédicas ampliamente utilizadas hasta ahora consisten principalmente en aleaciones a base de titanio, aleaciones con memoria de forma de Ni-Ti, acero inoxidable 316 L y aleaciones basadas en Co-Cr. Estas aleaciones reemplazan los tejidos duros fallidos, cuyos ejemplos incluyen articulaciones artificiales, implantes dentales, corazones artificiales, dispositivos maxilofaciales, stents, marcapasos, tornillos para huesos, placas óseas, etc. A pesar del notable progreso en las últimas décadas y su gran éxito clínico en el servicio, las aleaciones para implantes comerciales aún padecen de complejidades como estabilidad reducida a largo plazo en ambientes corrosivos, el llamado "efecto de protección contra el estrés" que es causado por un alto módulo elástico entre los materiales de implante con el hueso y la liberación de iones metálicos tóxicos generada por la tribocorrosión cuando las aleaciones de implantes sirven en un entorno fisiológico [68]. Cuando un material de implante se une al hueso, durante las cargas cíclicas, los movimientos relativos generan tensiones de desgaste debido a la diferencia del módulo de Young entre el hueso y el material del implante. A menudo existe una preocupación con respecto al efecto de protección contra el estrés de los implantes hechos de biometales tradicionales como las aleaciones de titanio y los aceros inoxidables debido a la gran diferencia en el módulo entre los dispositivos de implante y los huesos circundantes. Este fenómeno puede conducir a la resorción ósea y la falla eventual de la artroplastia. Por lo tanto, la resistencia al desgaste es crucial para los materiales de implante ya que los restos de desgaste en los tejidos aumentan el riesgo de revisiones quirúrgicas y afectan la longevidad de los materiales del implante. Durante el proceso de fricción y desgaste in vivo, la pérdida por desgaste del material está dominada por los efectos sinérgicos de la corrosión y el desgaste.

La interacción de la corrosión y el desgaste para las aleaciones de implantes convencionales, tales como acero inoxidable 316L, aleaciones basadas en Co-Cr y Ti, fue popular en el entorno fisiológico simulado. En comparación con la aleación de Ti-6Al-4V biocompatible, los BMG

basados en Zr muestran un menor coeficiente de fricción y una resistencia superior al desgaste en condiciones de fricción seca. Sin embargo, la tribocorrosión de BMGs basados en Zr ocurrirá en el entorno físico, y la interacción entre la corrosión y el desgaste podría convertirse en el principal factor de falla del material. En consecuencia, la mejora de la resistencia a la tribocorrosión de los BMG basados en Zr en medios fisiológicos es fundamental para su aplicación biomédica.

Mientras tanto, el daño por corrosión es también un tema muy importante para las aleaciones de implantes que sirven en un ambiente fisiológico severo. La degradación de los metales en el cuerpo conduce a la acumulación a largo plazo de iones metálicos que pueden afectar la biocompatibilidad y la integridad mecánica. Bajo condiciones fisiológicas, la pérdida de material puede atribuirse a las acciones combinadas de desgaste y corrosión que tienen lugar simultáneamente durante el proceso de fricción. Antes de que los materiales de implante ortopédicos de carga puedan usarse in vivo, sus propiedades tribológicas requieren una gran cantidad de investigaciones. Sin embargo, la evaluación de las propiedades tribológicas de los vidrios metálicos potencialmente aplicables en situaciones en las que el desgaste y la corrosión actúan simultáneamente sigue siendo muy limitada. Por otro lado, las propiedades tribológicas no son propiedades intrínsecas de los materiales, dependen en gran medida del entorno de servicio y de la contraparte. Por lo tanto, el comportamiento tribológico de los BMGs no ha sido bien entendido hasta ahora [28, 38, 41, 46]. La primera aplicación que se encontró fue como cabezas de palos de golf. Se ha utilizado como material en los dispositivos de reemplazo de rodilla, marcapasos, cuchillas de bisturí que son de mayor calidad pero menos caro que el diamante, más nítido y duradero que el acero. Otras aplicaciones de herramientas afiladas incluyen cuchillos y cuchillas de afeitar [14].

Actualmente las células más prometedoras en el área de ingeniería tisular son las células madres mesenquimales adultas (CMM) debido a que son células con la capacidad de autorrenovarse, son pluripotentes con morfología fibroblastoide y plasticidad a diferentes linajes celulares como osteocitos, condrocitos y adipocitos entre otros. Las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC, por sus siglas en inglés) se aislaron por primera vez por Gronthos y col. en el año 2000 [69]. Estas células demuestran propiedades características de células madre y una tasa de proliferación rápida, así como la capacidad de formar tejido mineralizado similar a la dentina tanto in vivo como in vitro. Debido a su potencial regenerativo, se favorece el uso de hDPSC en

la regeneración dental. Se ha estudiado una variedad de materiales en la regeneración de tejidos dentales duros, incluidos andamios de hidrogel, polímeros sintéticos degradables, biocerámica, así como agregado de trióxido mineral (MTA) [70]. Es importante destacar las características principales de las hDPSC que se observan bajo el microscopio mostrando morfología en forma de huso, múltiples proyecciones citoplasmáticas que les permiten establecer colonias bien definidas, un núcleo y nucléolo altamente prominentes [71, 72]. Las células T son los principales linfocitos en la función inmune celular, y su activación es un requisito previo importante para su función inmune. Las células T están inactivas in vivo y son activadas por el antígeno linfoblástico o el mitógeno de los linfocitos, lo que les permite realizar el efecto inmunológico correspondiente [73]. Hasta la fecha, pocos informes han demostrado las interacciones entre BMG basados en Zr con linfocitos T y células hDPSC. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación es la obtención y caracterización de cintas vítreas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  para generar un precedente de este material y dar pie a estudios posteriores de biocompatibilidad con la finalidad de proponerla como biomaterial.

## CAPÍTULO III METODOLOGÍA

### 3.1 Preparación de lingotes

Inicialmente se prepararon lingotes de **15 g** partiendo de zirconio (99.5 %), plata (99.99 %) de alta pureza, Cobalto (99.9 %) y Aluminio (99.9 %) en forma de granalla.

Los pesos de los elementos químicos se calcularon según la fórmula de la aleación ( $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ ), de la siguiente manera:

$$\% Zr = \left( \frac{58 * 91.224}{58 * 91.224 + 21 * 58.933 + 9 * 26.982 + 12 * 107.87} \right) * 100 = 65.59$$

Si 15 g es el 100 %, por lo tanto, 65.59 % = **9.8396 g**

$$\% Co = \left( \frac{21 * 58.933}{58 * 91.224 + 21 * 58.933 + 9 * 26.982 + 12 * 107.87} \right) * 100 = 15.34$$

Si 15 g es el 100 %, por lo tanto, 15.34 % = **2.3015 g**

$$\% Al = \left( \frac{9 * 26.982}{58 * 91.224 + 21 * 58.933 + 9 * 26.982 + 12 * 107.87} \right) * 100 = 3.011$$

Si 15 g es el 100 %, por lo tanto, 3.011 % = **0.4516 g**

$$\% Ag = \left( \frac{12 * 107.87}{58 * 91.224 + 21 * 58.933 + 9 * 26.982 + 12 * 107.87} \right) * 100 = 16.04$$

Si 15 g es el 100 %, por lo tanto, 16.04 % = **2.4073 g**

Después los elementos fueron pesados en una balanza de precisión AND-HR200 con un rango de precisión, de 0.0001 g. Una vez hechas los pesajes, los lingotes de aleación se prepararon por fusión de arco de mezclas de metales puros en una atmósfera de argón EDMUND BÜHLER (Arc-Melter AM) (Figura 2.1) en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México (IIM-UNAM).

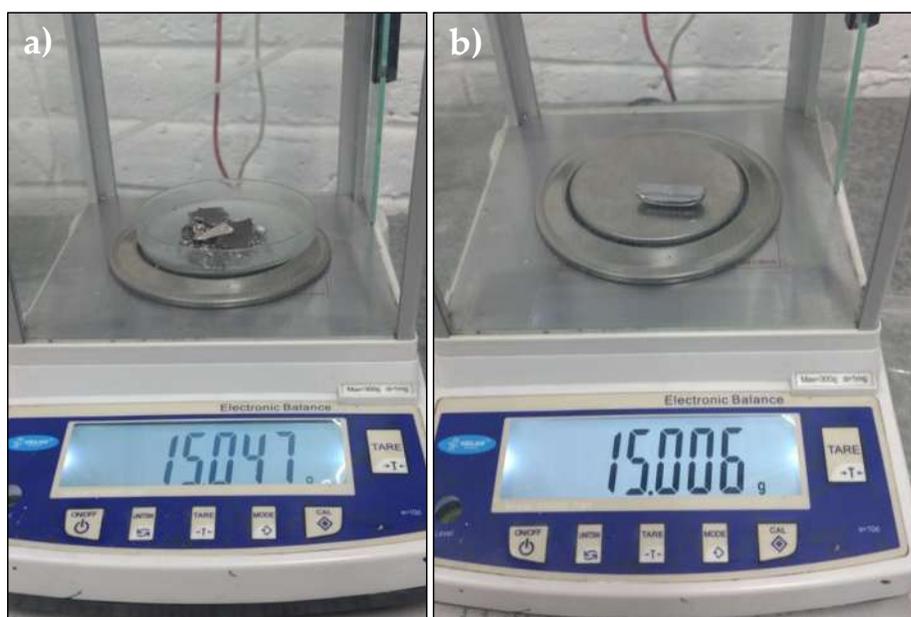
En esta fusión la cámara fue evacuada hasta una presión aproximada de  $2.2 \times 10^{-5}$  Torr seguido de 2 purgas con argón de alta pureza (99.99 %), esta operación se realizó con la finalidad de obtener una atmósfera inerte de argón. Al tener la atmósfera deseada se procedió a fundir los elementos, realizando 5 refusiones con la finalidad de homogenizar la aleación lo mejor posible; la Figura 3.2 muestra el aspecto de la superficie de los lingotes la cual es lisa, presenta brillo metálico y baja incidencia de defectos de fabricación. Una vez terminada la fusión de homogenización se procedió a pesar los lingotes, dando como resultado una pérdida en peso menor al 0.3 % Figura 3.3.



**Figura 3.1** Horno de arco eléctrico EDMUND BÜHLER (Arc-Melter AM), utilizado para la fusión y homogenización del sistema de aleación.



**Figura 3.2** Lingotes de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  obtenidos por fusión de arco con atmósfera de Ar.



**Figura 3.3** Comparación del peso de los elementos de la aleación a) antes de la fusión, con b) lingote obtenido por fusión de arco con atmósfera de Ar.

### 3.2 Colado de cintas

Las cintas metálicas vítreas fueron producidas en el IIM-UNAM, utilizando el proceso de colada en bloque enfriante giratorio EDMUND BÜHLER (*chill block melt spinning CBMS*, por sus siglas en inglés) (Figura 3.4). En este proceso la aleación se fundió en un crisol de cuarzo y se inyectó a través de un pequeño orificio por medio de la presión de helio. La presión del He empuja al metal líquido para impregnar la superficie del disco, el cual se encuentra girando rápidamente (7-20 m/s) originando que el metal líquido solidifique y forme de esta manera las cintas. Los lingotes se fragmentaron en partes lo suficientemente pequeñas para poder ser acomodadas en el crisol de vidrio del horno, al cual se le hizo previamente la boquilla de aprox 0.8-1 mm de diámetro. El crisol con la aleación se colocó dentro de la bobina del horno de inducción del equipo. La punta de la boquilla se colocó a una distancia de 5mm de separación del disco de cobre (diámetro de 20 cm), el cual fue previamente pulido con una lija de carburo de silicio de 1500, seguido por un baño de acetona para limpiarlo de impurezas, la distancia de la bobina al disco fue de 1 a 2 mm para evitar una posible solidificación del material antes de tocar el disco y por consiguiente la obstrucción del crisol.

La cámara se cerró y posteriormente se hizo un vacío hasta una presión de  $9.5 \times 10^{-3}$  Torr, para después llenarla con helio. Se realizaron tres coladas de cintas acelerando el disco variando la velocidad tangencial de 7- 20 m/s, esta velocidad de enfriamiento se estima sobre la base del espaciamiento del brazo secundario dendrítico de una aleación Al-Cu (proporciona una relación gráfica entre el espaciamiento del brazo y la velocidad de enfriamiento o el tiempo de solidificación) [74, 75]; el diámetro de la boquilla del crisol fue de 0.8 mm. Los fragmentos de la aleación fueron fundidos e inyectados bajo una presión de helio previamente estipulada de 0.45 Bar, produciendo así cintas de un espesor de 1 a 4mm; en la Tabla 3.1 se muestran los parámetros utilizados en este proceso.



**Figura 3.4** Horno proceso de colada en bloque enfriante giratorio EDMUND BÜHLER (chill block melt spinning CBMS), utilizado para el colado de las cintas.

**Tabla 3.1** Parámetros de colada de las cintas

Distancia del crisol al disco de Cu	5 mm
Distancia de la bobina al disco de Cu	1-2 mm
Velocidad del disco	7-20 ms <sup>-1</sup>
Presión de inyección	0.45 Bar
Diámetro de la boquilla del crisol	0.8 mm

### 3.3 Caracterización estructural

Una vez obtenidas las cintas por el proceso de colada en bloque enfriante giratorio (CBMS), se realizó su caracterización estructural mediante las técnicas mencionadas a continuación.

### ***3.3.1 Difracción de rayos X (DRX)***

Todas las cintas fueron analizadas utilizando difracción de rayos X, con el objetivo de examinar si se encuentra presente en ellas una estructura vítrea, el cual es el objetivo principal. Se colocaron de manera que la superficie que estuvo en contacto con el disco de enfriamiento del CBMS quedara en contacto con el portamuestras, de forma que la parte que estuvo en contacto con la atmósfera fuera la que se sometiera al estudio. Esto es debido a que la cristalización puede ocurrir o presentarse en esta superficie porque su velocidad de enfriamiento es menor que la que estuvo en contacto con el disco. Más adelante se procedió a realizar una prueba de inmersión química en SBF, las muestras utilizadas para esta prueba también se analizaron mediante esta técnica una vez concluida la inmersión. Las muestras fueron analizadas en un difractómetro de rayos X Bruker modelo D8 usando radiación  $K\alpha$  de Cu ( $\lambda=0.15406$  nm) a 40 KV. El ángulo de barrido fue de 20 a 120°.

### ***3.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)***

La homogeneidad química de las superficies de las cintas coladas y las fases después de la inmersión en SBF fueron examinadas por microscopía electrónica de barrido (SEM, JEOL JSM-7600F). Este microscopio cuenta con un detector de EDS para efectuar un análisis químico puntual. Para realizar este análisis las cintas se sometieron a limpieza por baño ultrasónico en acetona durante 10 minutos para prevenir cualquier contaminación.

### ***3.3.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)***

Las cintas coladas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  fueron caracterizadas estructuralmente mediante MET (Phillips Tecnai F20) para identificar las fases cristalinas presentes y la estructura.

## **3.4 Caracterización térmica**

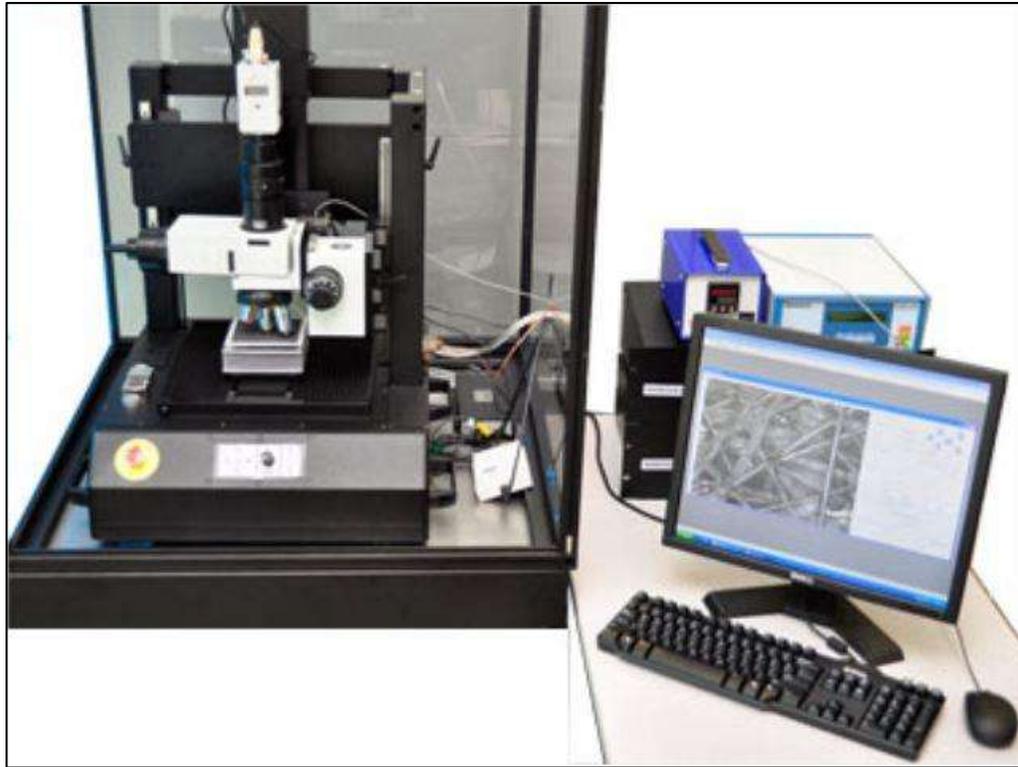
### ***3.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)***

Una de las principales desventajas de los vidrios metálicos, es que no se pueden utilizar a altas temperaturas ya que se perdería la estructura vítrea y por lo tanto, todas las ventajas que en ella se

encuentran también se perderían, por lo cual, es necesario determinar las temperaturas de cristalización de las cintas. Las cintas coladas se analizaron mediante las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis Térmico Diferencial, para la determinación de los parámetros termodinámicos relacionados a la habilidad de formación vítrea (GFA, por sus siglas en inglés) como son las temperaturas de cristalización, líquida y de transición vítrea ( $T_x$ ,  $T_l$ ,  $T_g$  y  $T_m$ ) respectivamente. También, mediante esas temperaturas se determinan el intervalo de transición vítrea y otros aspectos tales como formación y transformación de fases. El análisis térmico se realizó utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC, TA Instruments SDT Q600); se tomaron muestras menores a 30 mg, lavadas en acetona por ultrasonido durante 10 minutos previamente. Las muestras fueron calentadas a una velocidad de 20 °C/min desde 30 a 1200 °C, empleando un flujo de argón de 100 ml/min.

### **3.5 Prueba de nanoindentación**

El módulo elástico se midió utilizando un nanoindentador Berkovich (BE0102 Nanovea Indenter) Figura 3.5, utilizando una punta de diamante y una tasa de carga única aplicada de 100 mN/min; durante la prueba, se consideró un promedio de 10 indentaciones por muestra, descartando los valores máximos y mínimos en cada caso.



**Figura 3.5** Nanoindentador Berkovich (Nanovea Indenter, CUCEI-UdG, Jalisco,Mex).

### **3.6 Análisis de bioactividad**

#### ***3.6.1 Ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF)***

La capacidad de unión ósea de un material a menudo se evalúa mediante el examen de la capacidad de formar apatita en su superficie en un fluido corporal simulado (por sus siglas en inglés SBF) con concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano. Con la finalidad de investigar la bioactividad de las cintas, se realizó una prueba de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) con un pH de 7.4 de acuerdo con la norma ASTM-G31-72 para evaluar la capacidad inductora de apatita [76]. La inmersión de las muestras se mantuvo a una temperatura constante de 36.5 °C durante 3, 7, 14, 21, and 28 días. La solución se renovó cada 2 días para mantener un valor de pH relativamente estable [77, 78].

Se realizó la preparación del fluido corporal simulado en base al procedimiento propuesto por Kokubo y col [79], para determinar in vitro la habilidad de formar apatita parecida al hueso sobre

la superficie de las cintas vítreas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , utilizando los siguientes reactivos:

- Cloruro de sodio NaCl
- Bicarbonato de sodio  $NaHCO_3$
- Cloruro de potasio KCL
- Fosfato de ácido de potasio  $K_2HPO_4$
- Cloruro de calcio  $CaCl_2$
- Sulfato de sodio anhidro  $Na_2SO_4$
- Ácido clorhídrico HCL
- Tris-(hidroximetil)-aminometano
- Cloruro de magnesio hexahidratado  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- Agua desionizada

Se siguió el procedimiento descrito a continuación:

- 1.- En un recipiente de polietileno con capacidad de 1 litro se adicionaron 700 ml de agua desionizada, se calentó el agua a  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$  y se agitó con un agitador magnético de manera constante durante todo el procedimiento.
- 2.- Se agregaron uno a uno los reactivos hasta el número 8 en la cantidad y orden mostrados en la Tabla 3.2. Dejando disolver completamente cada uno antes de agregar el siguiente.
- 3.- Se midió el pH en este punto, asegurándose que se encuentre entre 1-2.
- 4.- Se ajustó la temperatura de la solución exactamente a  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$  y se agregó más agua hasta 900 ml.
- 5.- Se comenzó a agregar lentamente el reactivo número 9 hasta un pH de 7.45.
- 6.- Posteriormente se ajustó el pH a 7.25 mediante la adición de más solución de HCL 1M y nuevamente el reactivo 9 para lograr un pH de 7.5. Repitiendo este procedimiento varias veces hasta agotar todo el reactivo 9 y ajustar a un pH exacto de 7.40 a una temperatura exacta de  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$ .
- 7.- Se transfirió la solución a un matraz aforado de un litro y se esperó a que enfriara para agregar más agua, ya que es normal que el fluido se reduzca al enfriarse.
- 8.- Se aforó a un litro y se dejó enfriar.

9.- Finalmente la solución se transfirió a un recipiente de polietileno para almacenar a una temperatura entre 5-10 °C.

**Tabla 3.2.** Orden de reactivos para SBF

<b>ORDEN</b>	<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD (GRAMOS)</b>
<b>1</b>	Cloruro de sodio NaCl	8.035
<b>2</b>	Bicarbonato de sodio NaHCO <sub>3</sub>	0.355
<b>3</b>	Cloruro de potasio KCl	0.225
<b>4</b>	Fosfato de ácido de potasio K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.231
<b>5</b>	Cloruro de magnesio hexahidratado MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.311
<b>6</b>	Ácido clorhídrico HCl 1M	39 ml
<b>7</b>	Cloruro de calcio CaCl <sub>2</sub>	0.292
<b>8</b>	Sulfato de sodio anhidro Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.072
<b>9</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano	6.118
<b>10</b>	Ácido clorhídrico HCl 1M	0-5 ml

Una vez lista la solución SBF se eligieron muestras de cada una de las 3 cintas metálicas de la aleación Zr<sub>58</sub>Co<sub>21</sub>Al<sub>9</sub>Ag<sub>12</sub>, las cuales se lavaron con acetona en baño ultrasónico por 10 minutos y se dejaron secar en un desecador antes de realizar la prueba y una vez terminada se enjuagaron cuidadosamente con agua desionizada y se dejaron secar durante 24 horas en un desecador.

### **3.7 Prueba de liberación de iones**

La concentración de iones metálicos liberados durante la inmersión en SBF, fue medida utilizando un espectrómetro de emisión atómica por plasma (Agilent Technologies 4100 MP-AES), Figura 3.6. Dicha concentración fue medida para los tiempos evaluados durante 28 días de la prueba de inmersión en SBF.



**Figura 3.6** Espectrómetro de emisión atómica por plasma (Agilent Technologies 4100 MP-AES. Laboratorio de fisicoquímica y fluidos complejos, Facultad de ciencias físico-matemáticas, UMSNH).

Durante la prueba de inmersión en SBF se extrajeron 5 ml del fluido SBF por cada uno de los tiempos a evaluar; éste se almacenó en refrigeración para evitar la precipitación del fluido hasta tener todas las muestras disponibles. Una vez teniendo las muestras completas se procedió a filtrar el fluido con la finalidad de evitar la presencia de agentes contaminantes que pudieran causar la obstrucción del capilar del espectrómetro. Posteriormente se verificó que los valores de longitud de onda de los elementos de la aleación no fueran cercanos a menos de 3 nm entre ellos, considerando la resolución del equipo para evitar que las mediciones pudieran traslaparse; los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.3:

**Tabla 3.3** Valores de longitud de onda de elementos de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .

<b>Elemento de aleación</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
Zr	343.823
Ag	328.068
Co	340.512
Al	396.152

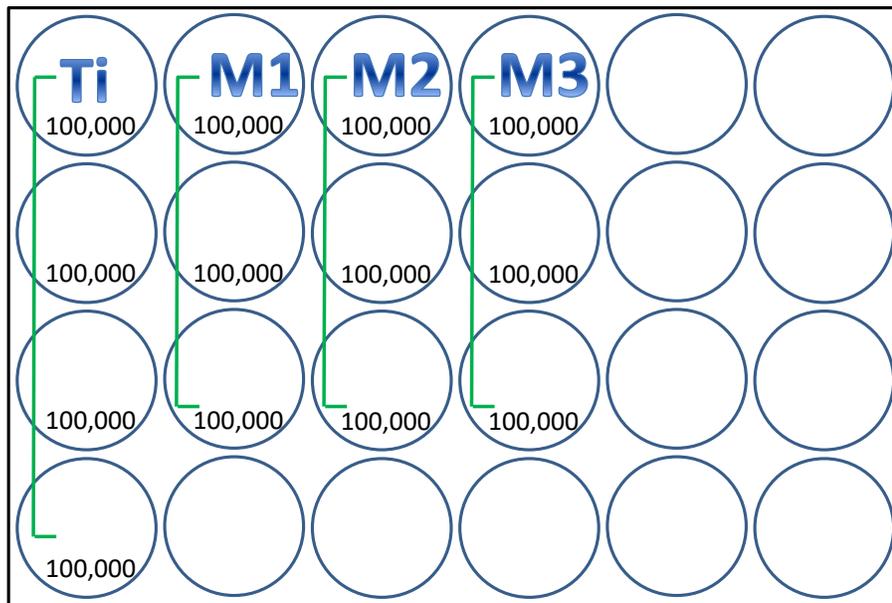
De manera que se comprueba que es posible realizar todas las mediciones en una misma lectura, por lo que se procedió a calibrar el equipo con los estándares de cada uno de los elementos de la aleación. De esta manera se dio inicio a la realización de la prueba, utilizando diluciones del orden de 1/100 ml.

### **3.8 Ensayo de adherencia celular**

Se realizó una prueba de adherencia celular utilizando células madre mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC) informadas anteriormente [80], en el pasaje 3 de cultivo primario, con Medio Dulbeco's Eagle Modificado (DMEM) suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB), 1% L-glutamina y 1 % penicilina/estreptomicina (10,000 IU/mL y 10,000  $\mu$ g/mL) como antibiótico. Para determinar la adherencia celular al material, se colocaron muestras de las 3 cintas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  en la parte inferior de la placa ( $1 \times 10^6$  células/pozo) en una placa de 24 pozos. Las placas sin material se consideraron control. Se analizaron nueve muestras por grupo. La suspensión celular se inoculó ( $5 \times 10^4$  células/pozo), luego las células se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular. En esta prueba, solo se analizó el grupo Ti6Al4V. La adhesión celular al material se determinó mediante tinción con violeta cristal (violeta de metilo). Después de 24 horas de incubación, las células se fijaron y tiñeron de acuerdo con el siguiente procedimiento; inicialmente, se retiró el medio de cultivo, se fijaron las células agregando 1 ml de paraformaldehído al 4 %, y se les permitió incubar a temperatura ambiente por 15 minutos para favorecer la fijación de las células a la superficie y así evitar el deterioro en ausencia de medio de cultivo. Después, se añadió la solución tinte de cristal violeta (glutaraldehído 6.0 %

(vol/vol); cristal violeta 0.5 % (wt/vol) en H<sub>2</sub>O [81]) durante 20 minutos de incubación para permitir la tinción celular; finalmente, se enjuagó dos veces con agua desionizada para eliminar el exceso de cristal violeta y poder observar las cintas bajo el microscopio óptico. La adherencia se visualizó bajo el microscopio. Las células se tiñeron con violeta cristal (violeta de metilo) y se observaron bajo un microscopio óptico invertido Carl Zeiss Axio y se fotografiaron. Se cuantificó el número de células adheridas, considerando las células adheridas al material por campo. Se analizaron al menos nueve imágenes para cada grupo experimental.

Se determinó realizar la prueba de adherencia celular utilizando una placa de 24 pozos, un número inicial de 100,000 células hDPSC por cada pozo, 3 muestras para cada cinta y 4 muestras de control de Ti6Al4V en base a la configuración mostrada en la Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Esquema con número inicial de células utilizadas y su disposición en la caja de 24 pozos para prueba de adherencia celular.

- 1.- Ti: Aleación Ti6Al4V (Control positivo, 4 muestras),  $\bar{X}$  (0.26857 g)  $\pm$  SD (0.07303 g)
- 2.- M1: Aleación Zr<sub>58</sub>Co<sub>21</sub>Al<sub>9</sub>Ag<sub>12</sub> con 78.8 % de fase vítrea (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.03423 g)  $\pm$  SD (0.00598 g)

3.- M2: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 79.8 % de fase vítrea (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.00988 g)  $\pm$  SD (0.00022 g)

4.- M3: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 82.6 % de fase vítrea (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.01674 g)  $\pm$  SD (0.00088 g)

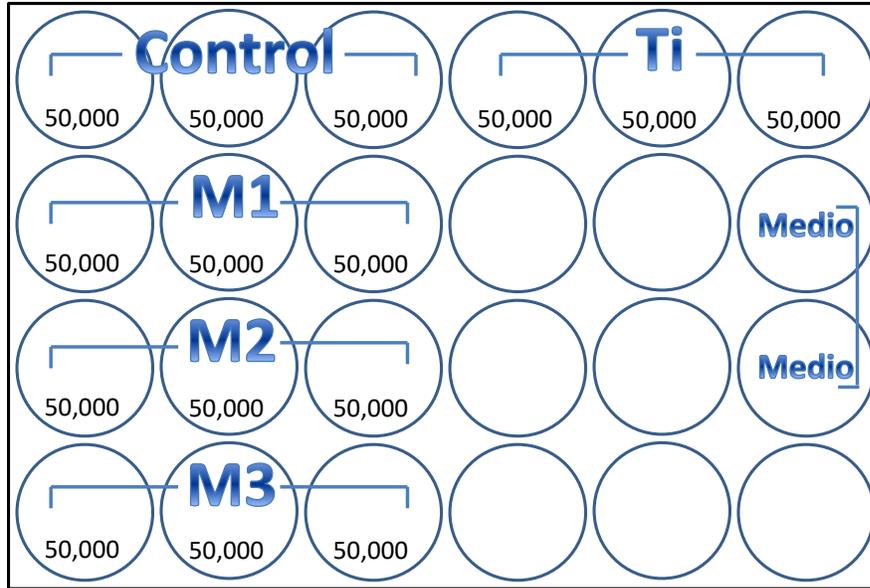
### **3.9 Ensayo de viabilidad celular y proliferación in vitro**

La biocompatibilidad de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  se evaluó mediante un ensayo de viabilidad y comportamiento de proliferación celular utilizando un kit de conteo celular CCK-8, en linfocitos T humanos (Jurkat, clone E61 ATCC TIB152). Medio Dulbecco's Eagle Modificado sin rojo fenol de glucosa media-alta (SIGMA) con 10 % de suero fetal bovino (SIGMA), incubado a 37 °C bajo una atmósfera de 5 %  $CO_2$  y 95 % de humedad. Para verificar si la presencia de una fracción de fase cristalina en las cintas de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  influye en la respuesta inerte informada para BMGs basados en Zr completamente vítreos. La suspensión celular fue inoculada ( $5 \times 10^5$  células/pozo) en una placa de 24 pozos. Luego se colocó cada muestra por pocillo (forma de rectángulo) 0.5 x 1 x 0.1 cm ancho, largo y espesor, respectivamente. Las células sin material se consideraron control. Se analizaron nueve muestras por grupo. La placa se pre-incubó en una incubadora humidificada a 37 °C, 5 %  $CO_2$ . Después a cada pocillo de la placa se le añadió 10  $\mu$ l de solución CCK-8. Las células fueron incubadas durante 24, 48, 72, y 96 h. La absorbancia fue medida a 440 nm utilizando un lector de microplacas (Figura 3.8) para el medio de cultivo celular cada vez.



**Figura 3.8.** Lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scientific. Centro multidisciplinario de estudios en biotecnología, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UMSNH).

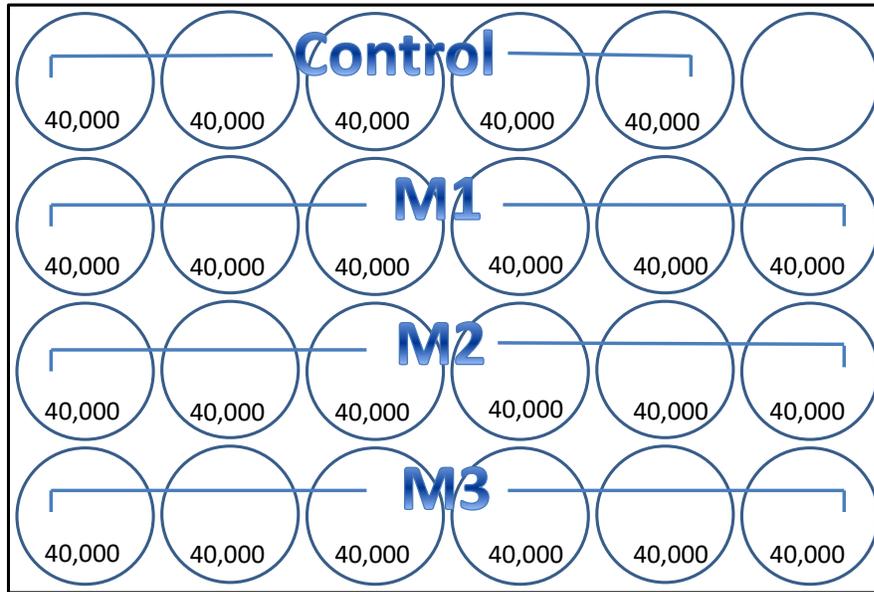
En la Figura 3.9 se presenta la configuración utilizada en una prueba preliminar con un número inicial de 50,000 células T por cada pozo, agregando a la placa las muestras de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , así como muestras de Ti6Al4V con fines comparativos, ambos después de 24 horas de incubación.



**Figura 3.9.** Esquema con número inicial de células T utilizadas y su disposición en la caja de 24 pozos.

- 1.- Células control (Control positivo)
- 2.- M1: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 78.8 % de fase vítrea (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.01160 g)  $\pm$  SD (0.00559 g)
- 3.- M2: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 79.8 % de fase vítrea (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.00686 g)  $\pm$  SD (0.00049 g)
- 4.- M3: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 82.6 % de fase vítrea (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.01723 g)  $\pm$  SD (0.00067 g)
- 5.- Ti: Aleación Ti6Al4V (3 muestras),  $\bar{X}$  (0.23469 g)  $\pm$  SD (0.06265 g)
- 6.- Medio de cultivo (Control negativo)

Posterior a la prueba preliminar se realizó otra prueba con un número inicial de 40,000 células T por pozo, sin embargo, en esta ocasión se agregaron las muestras desde el inicio de la incubación. La configuración utilizada se muestra en la Figura 3.10.



**Figura 3.10** Esquema con número inicial de células T utilizadas y su disposición en la caja de 24 pocillos.

- 1.- Células control (Control positivo)
- 2.- M1: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 78.8 % de fase vítrea (6 muestras),  $\bar{X}$  (0.03371g)  $\pm$  SD (0.01019 g)
- 3.- M2: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 79.8 % de fase vítrea (6 muestras),  $\bar{X}$  (0.00862g)  $\pm$  SD (0.00101 g)
- 4.- M3: Aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con 82.6 % de fase vítrea (6 muestras),  $\bar{X}$  (0.01710g)  $\pm$  SD (0.00074 g)
- 5.- Medio de cultivo (Control negativo)

## CAPÍTULO IV RESULTADOS

### 4.1 Caracterización estructural

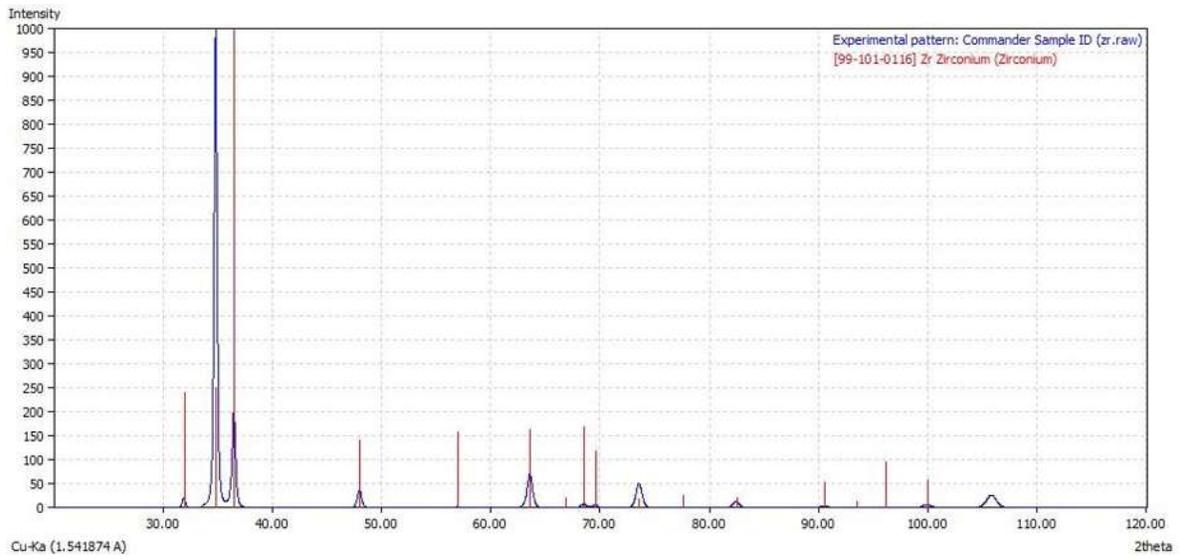
Para determinar la capacidad de formación de vidrio de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , se obtuvieron tres cintas mediante CBMS variando las condiciones de procesamiento, indicadas en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Condiciones de las tres cintas base Zr obtenidas por CBMS.

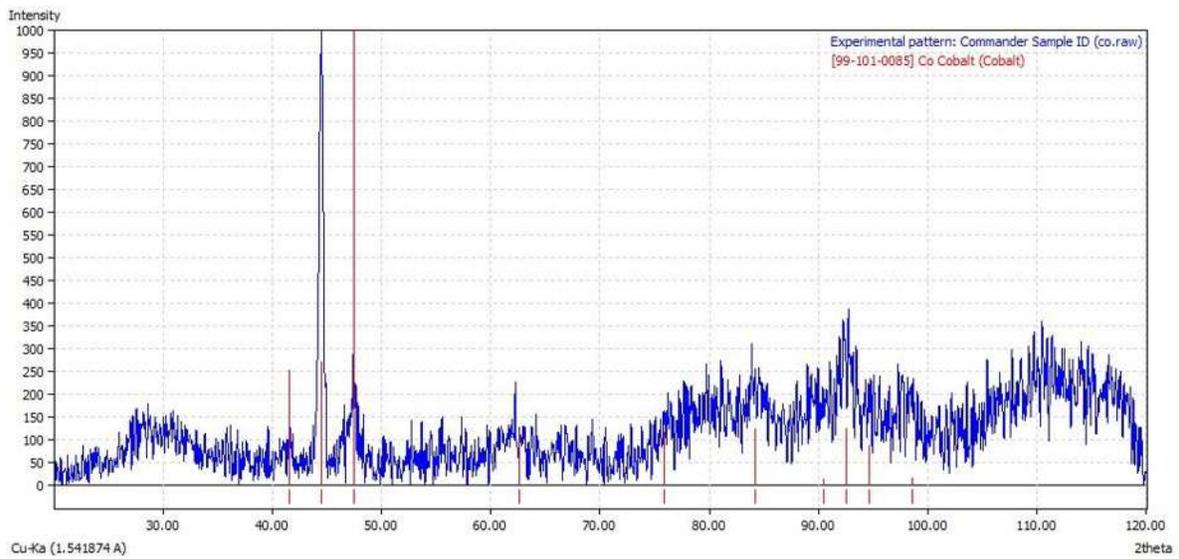
Cinta	Velocidad tangencial del disco (m/s)	Fase vítrea (%)
1	7	78.8
2	20	79.8
3	10	82.6

#### 4.1.1 Difracción de rayos X (DRX)

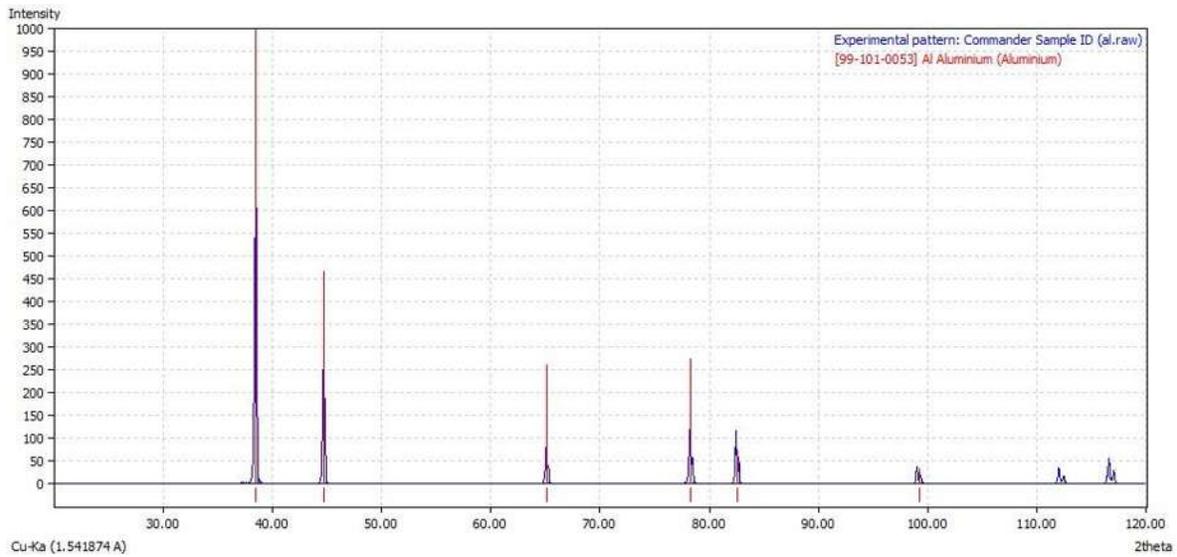
Inicialmente se identificaron los patrones de difracción de los elementos puros contenidos en la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  para utilizarlos como referencia con los patrones de las cintas vítreas que en caso de presentar fracciones cristalinas poder hacer una comparación e identificar a partir de sus elementos iniciales a que elemento pertenecen. Éstos, corresponden a las tarjetas mostradas (JCPDS Tarjeta No. 99-101-0116) para Zr en la Figura 4.1, (JCPDS Tarjeta No. 99-101-0085) Co en la Figura 4.2, (JCPDS Tarjeta No. 99-101-0053) de Al en la Figura 4.3 y (JCPDS Tarjeta No. 99-101-3078) de Ag en la Figura 4.4.



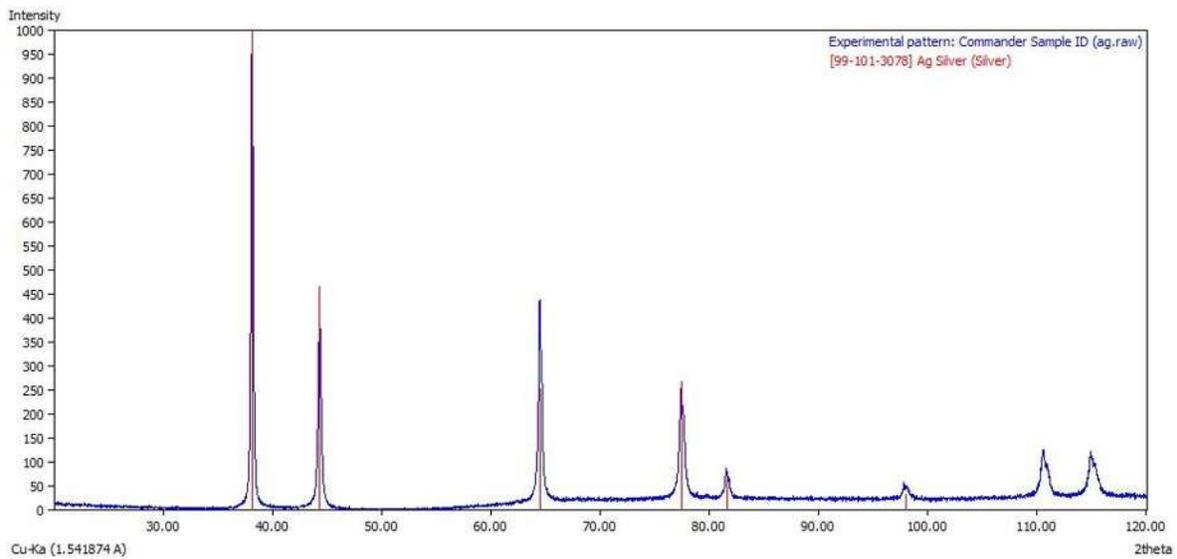
**Figura 4.1.** Patrón de difracción de rayos X correspondiente al Zr puro utilizado en la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .



**Figura 4.2.** Patrón de difracción de rayos X correspondiente a Co puro utilizado en la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .



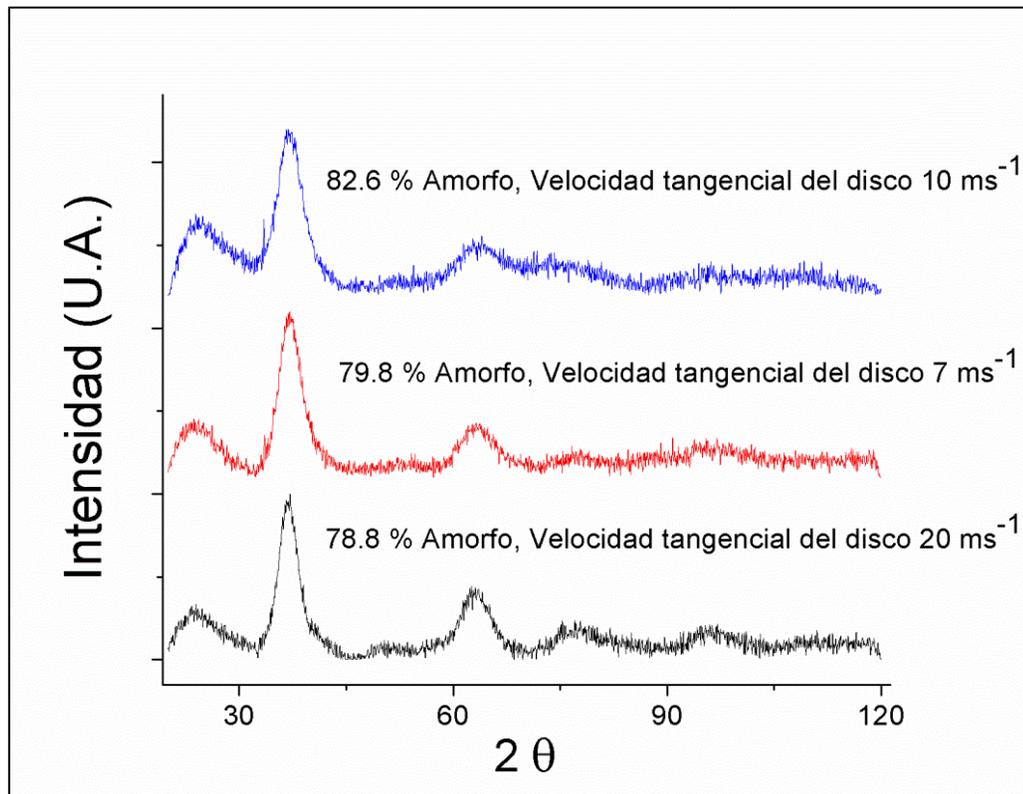
**Figura 4.3.** Patrón de difracción de rayos X correspondiente a Al puro utilizado en la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$



**Figura 4.4.** Patrón de difracción de rayos X correspondiente a Ag puro utilizado en la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .

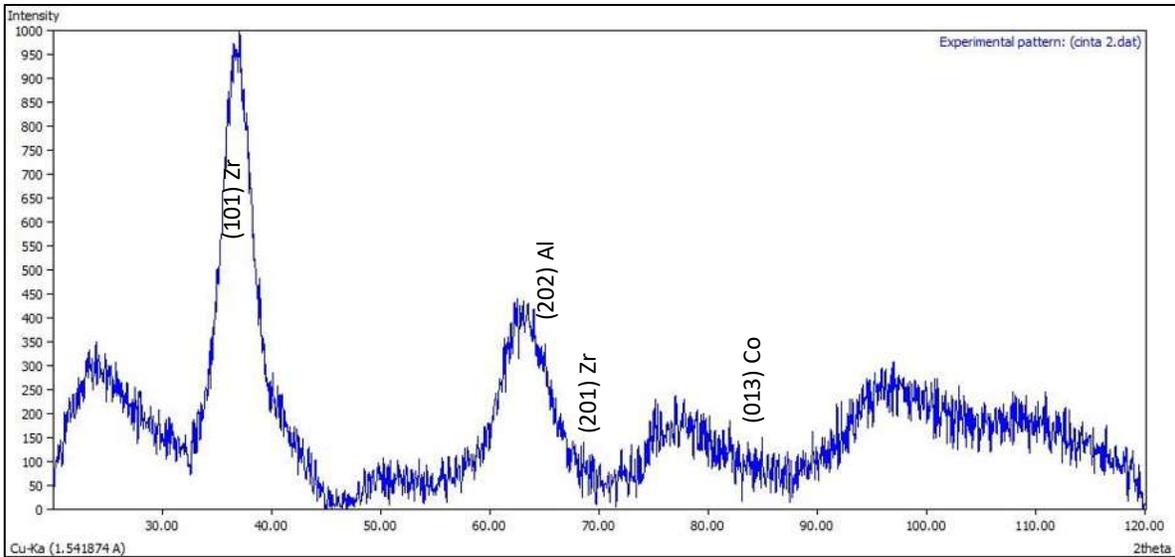
La Figura 4.5 muestra los patrones de difracción de rayos X de las tres cintas coladas obtenidas por CBMS en los que se pueden observar algunos picos de difracción cristalinos que se superponen a un gran máximo de dispersión vítrea ubicada aproximadamente a  $38^\circ$ , surge un pico amplio como resultado de la dispersión de rayos X en una red atómica, sin mostrar un orden

de largo alcance indicando que las cintas están principalmente en estado vítreo. Con ayuda del software Diffrac Suite EVA (instalado en el XRD Bruker D8) fue posible determinar el porcentaje de fase cristalina presente en cada difractograma, el cual se indica en la Tabla 4.1.



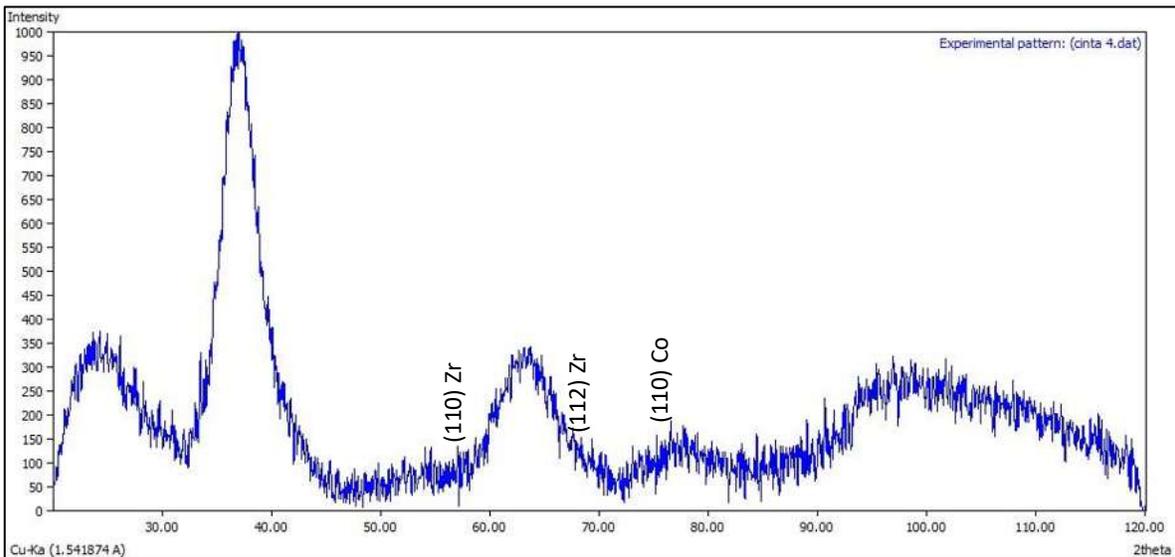
**Figura 4.5** Patrón XRD de las tres cintas base Zr obtenidas por CBMS.

En la Figura 4.6 se muestra el patrón de difracción de rayos X correspondiente a la cinta con 78.8 % de fase vítrea en la cual se confirma la estructura vítrea de la aleación base Zr por un pico amplio de halo alrededor de  $35^\circ$ , tal pico ancho surge como resultado de la dispersión de rayos X en una red atómica, que no muestra orden de largo alcance, por ejemplo, en gases, líquidos o sólidos vítreos [82], también se pueden identificar varios picos pequeños de difracción superpuestos lo que indica que la muestra consiste principalmente de una fase vítrea con una pequeña cantidad de fase cristalina, la fracción de fase vítrea es de 78.8 % por XRD.

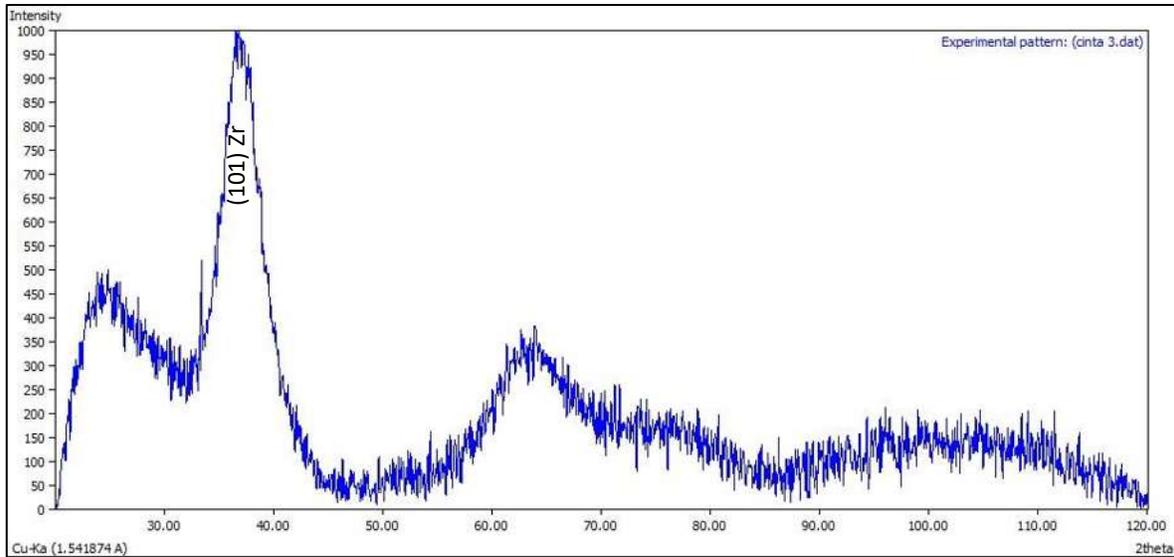


**Figura 4.6** Patrón de difracción de la cinta con 78.8 % de fase vítrea.

En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestra el patrón de difracción de rayos X de las cintas con 79.8 y 82.6 % de fase vítrea, en las cuales se continua observando la aparición de picos de difracción pero con menor intensidad, la fracción de fase vítrea es de 79.8 y 82.6 % respectivamente por XRD.

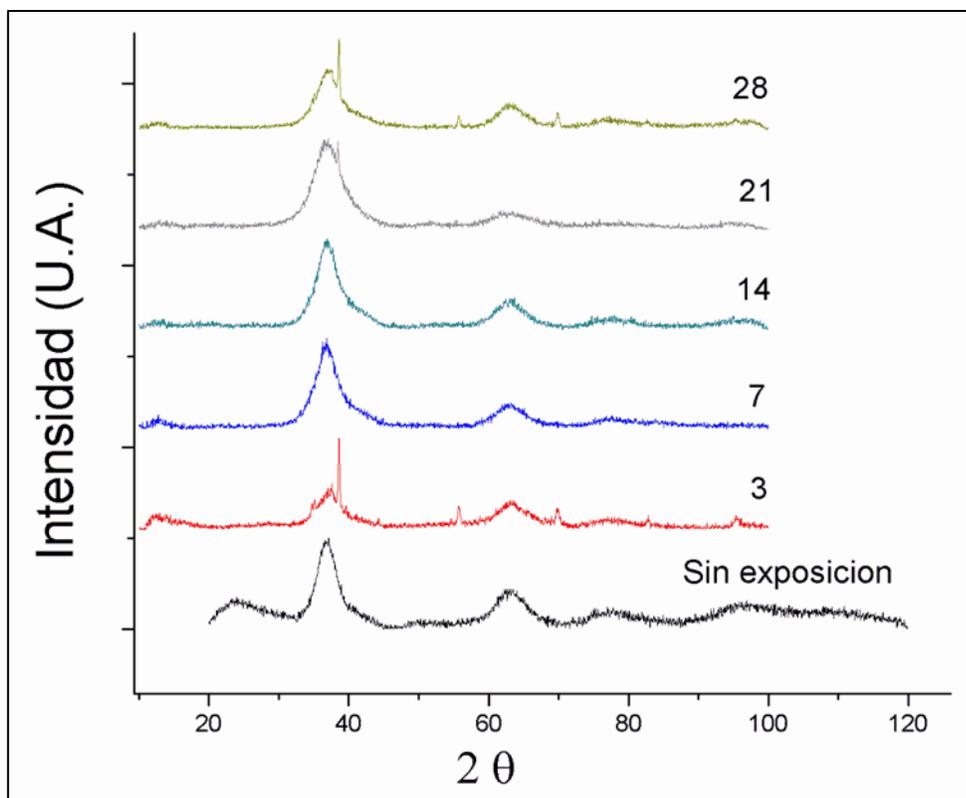


**Figura 4.7** Patrón de difracción de la cinta con 79.8 % de fase vítrea



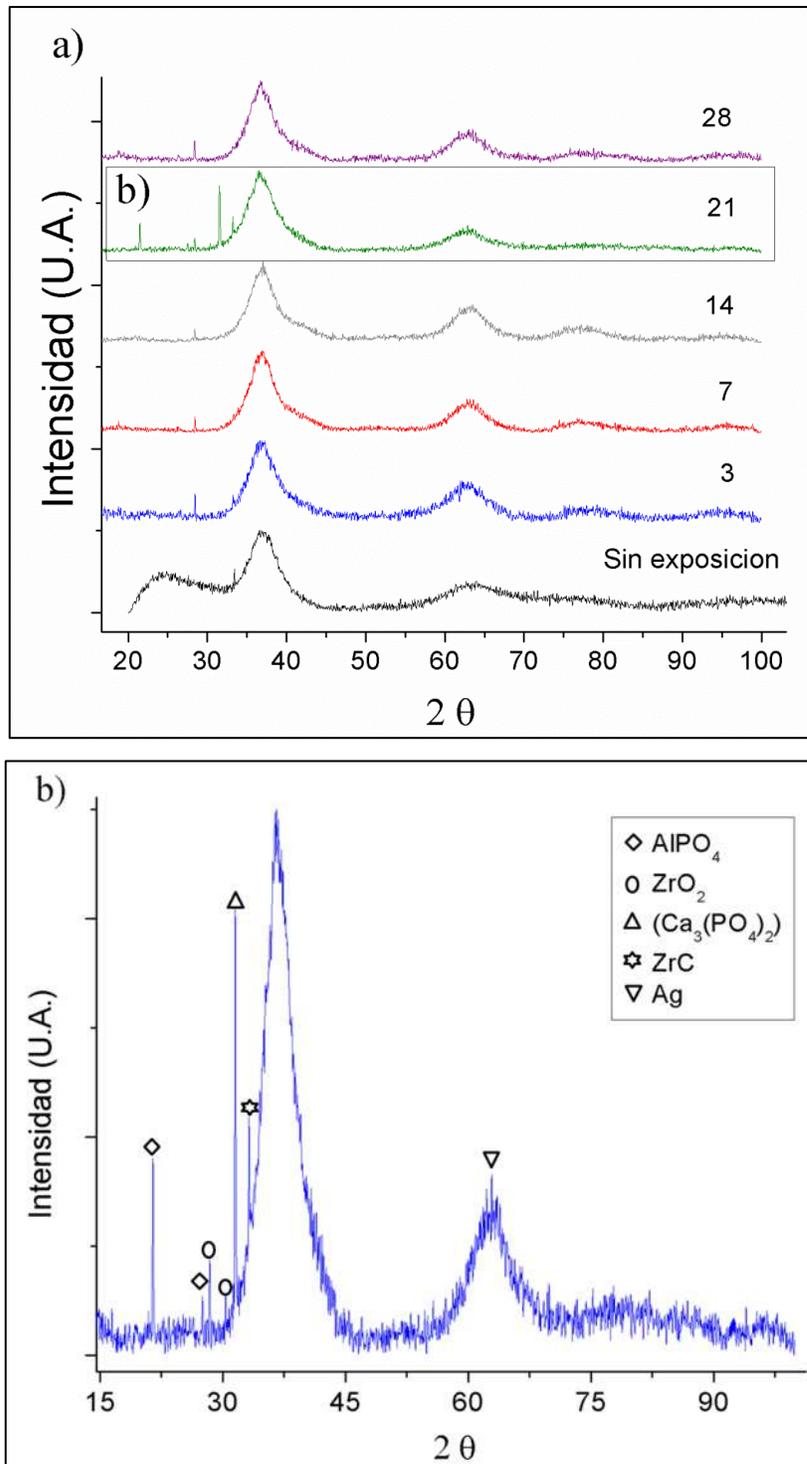
**Figura 4.8** Patrón de difracción de la cinta con 82.6 % de fase vítrea.

Por otra parte, para comprobar que la formación superficial sobre las cintas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  se trata de apatita, una vez realizada la prueba de inmersión en SBF se analizaron las muestras mediante difracción de rayos X (DRX). En la Figura 4.9 se muestran los patrones de difracción correspondientes a la cinta con 78.8 % de fase vítrea, para los cuales se puede observar que entre 3-7 días de inmersión en SBF se presentan picos cristalinos de manera más clara que para tiempos mayores que, sin embargo, también están presentes.



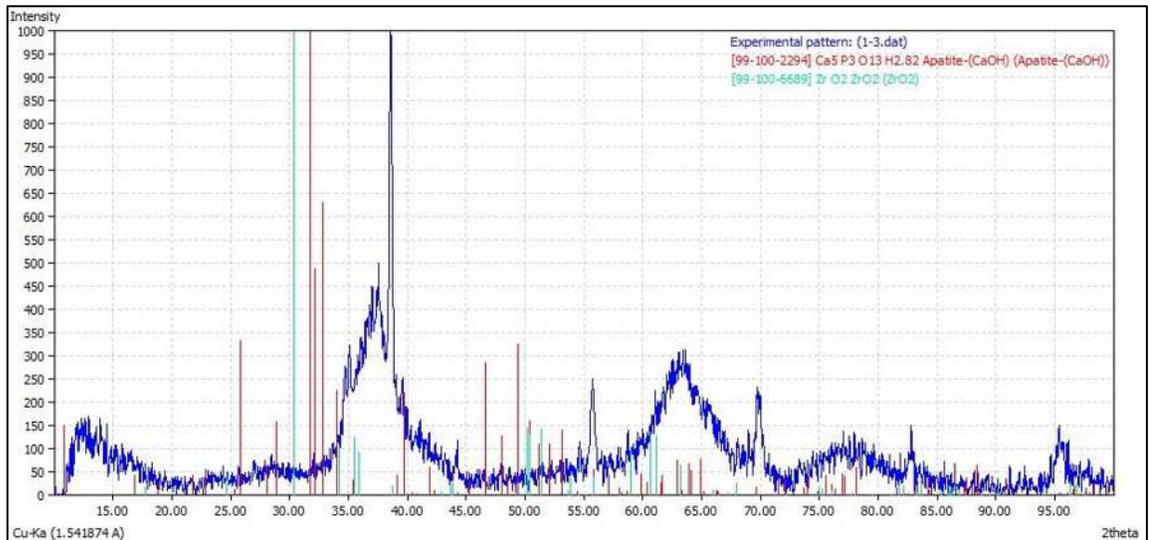
**Figura 4.9** Patrones de difracción de rayos x de la cinta con 78.8 % de fase vítrea de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  para diferentes días de inmersión en SBF.

En la Figura 4.10 a) se muestran los patrones de difracción de la cinta con 82.6 % de fase vítrea, considerando desde la cinta colada y después de la inmersión en SBF en el que se observa un comportamiento bastante similar al que presenta la cinta con 78.8 % de fase vítrea; en esta figura se logra observar que a tiempos prolongados de inmersión, aumenta la presencia de picos cristalinos. Para estudiar este resultado en detalle, se llevó a cabo un examen del patrón correspondiente a 21 días (Figura 4.10 b)). En esta figura, se detectó un conjunto de picos de difracción que coinciden con las siguientes tarjetas: (JCPDS 99-100-7407)  $AlPO_4$ , (JCPDS 99-101-6720)  $Ca_3(PO_4)_2$ , (JCPDS 99-100-0370)  $ZrC$ , (JCPDS 99-100-6690)  $ZrO_2$ , (JCPDS 99-101-3086)  $Ag$ . Se identificó la presencia de  $Ca$  y  $P$ ; estos podrían favorecer la precipitación de fosfatos, acelerando el proceso de deposición de apatita en la superficie [83].

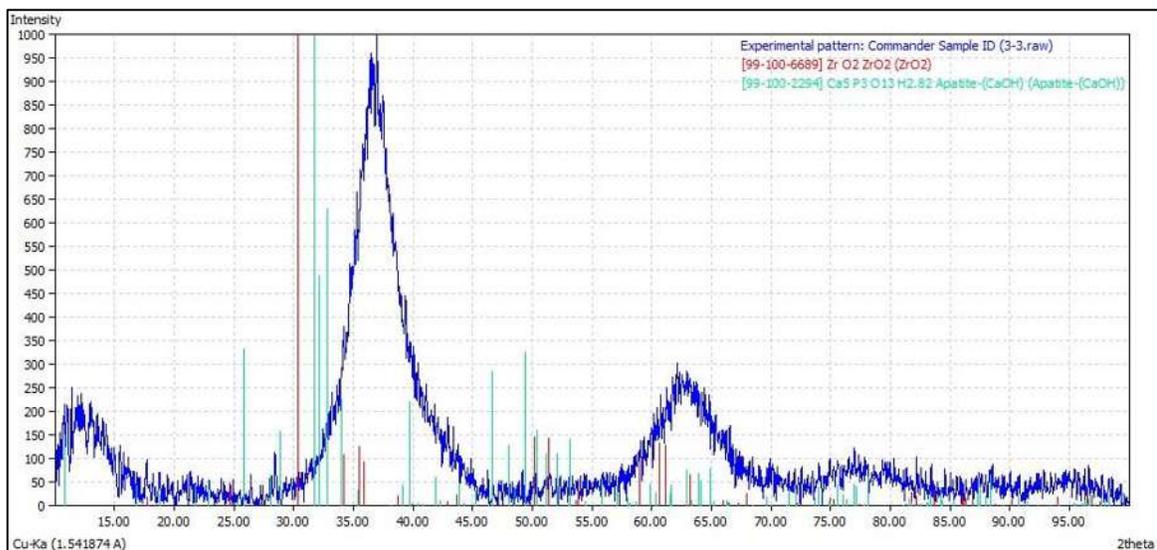


**Figura 4.10** Patrón de difracción de rayos X de la cinta con 82.6 % de fase vítrea, a) Comparación de cinta colada con los diferentes tiempos de inmersión en SBF; b) aumento sobre el patrón de difracción de la muestra con 21 días de inmersión en SBF.

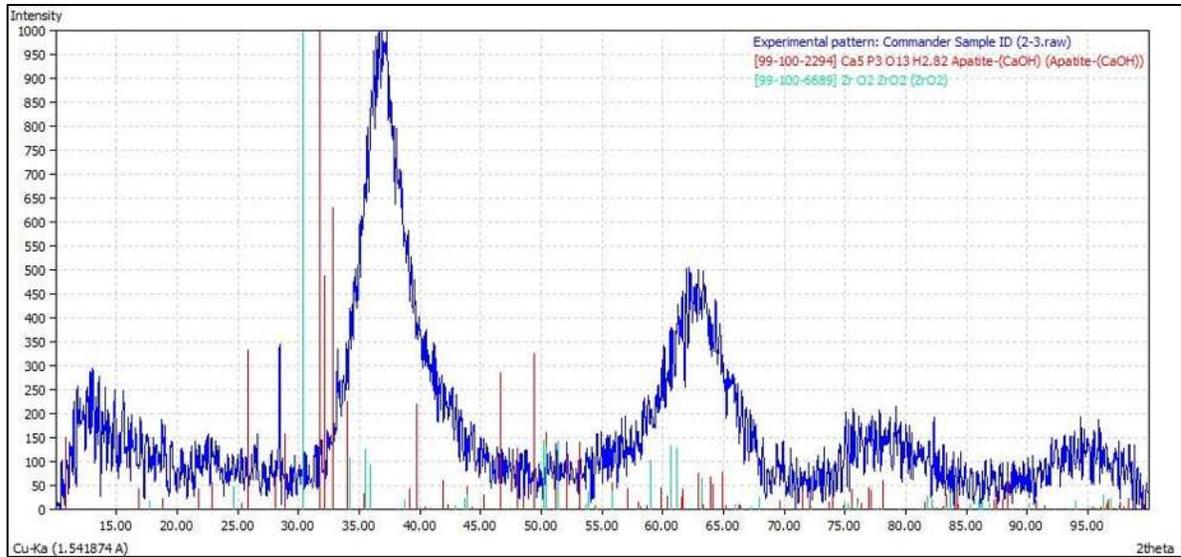
Se detectó, para la cinta con 78.8 % de fase vítrea un conjunto de picos de difracción, correspondientes a  $ZrO_2$  utilizando la tarjeta (JCPDS Tarjeta No. 99-100-6689) de  $ZrO_2$ , lo que indica la formación de una capa de  $ZrO_2$  en la superficie de las cintas mostrada en la Figura 4.11. Este mismo comportamiento fue observado para las cintas con 79.8 % y 82.6 % de fase vítrea como lo muestran sus patrones de difracción en las Figuras 4.12 y 4.13, respectivamente.



**Figura 4.11** Patrón de difracción de rayos x de la Cinta con 78.8 % de fase vítrea, sumergida en SBF a  $37^{\circ}C$  durante 3 días.



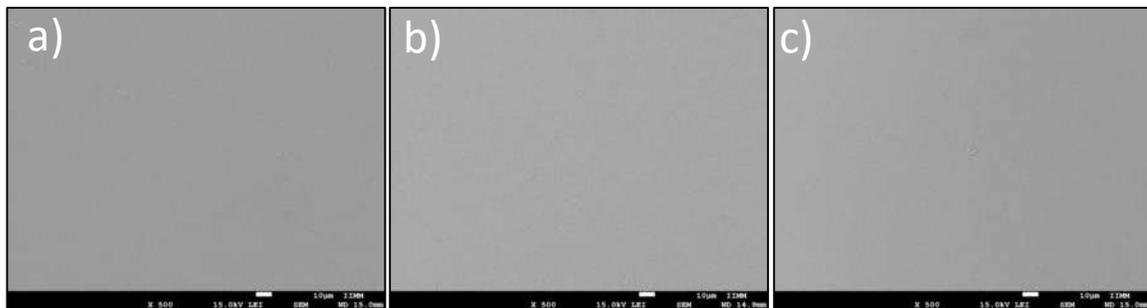
**Figura 4.12** Patrón de difracción de rayos x de la Cinta con 79.8 % de fase vítrea, sumergida en SBF a  $37^{\circ}C$  durante 3 días.



**Figura 4.13** Patrón de difracción de rayos x de la Cinta con 82.6 % de fase vítrea, sumergida en SBF a 37°C durante 3 días.

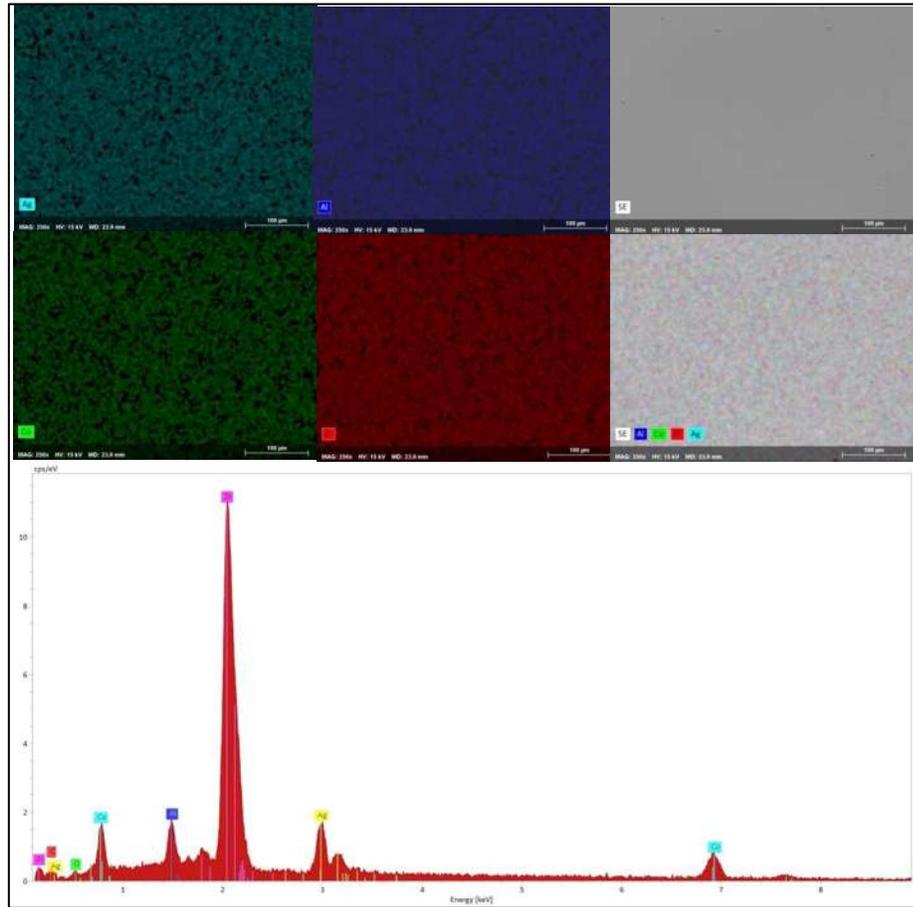
#### 4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Inicialmente se examinó la homogeneidad química de las superficies de las cintas coladas mediante un microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL JSM-7600F para tener una referencia. Observando que para todos los casos se cuenta con una superficie lisa, continua y libre de defectos, como se muestra en la Figura 4.14 para el inciso a) cinta con 78.8 % de fase vítrea, b) cinta con 79.8 % de fase vítrea y c) cinta con 82.6 % de fase vítrea respectivamente.

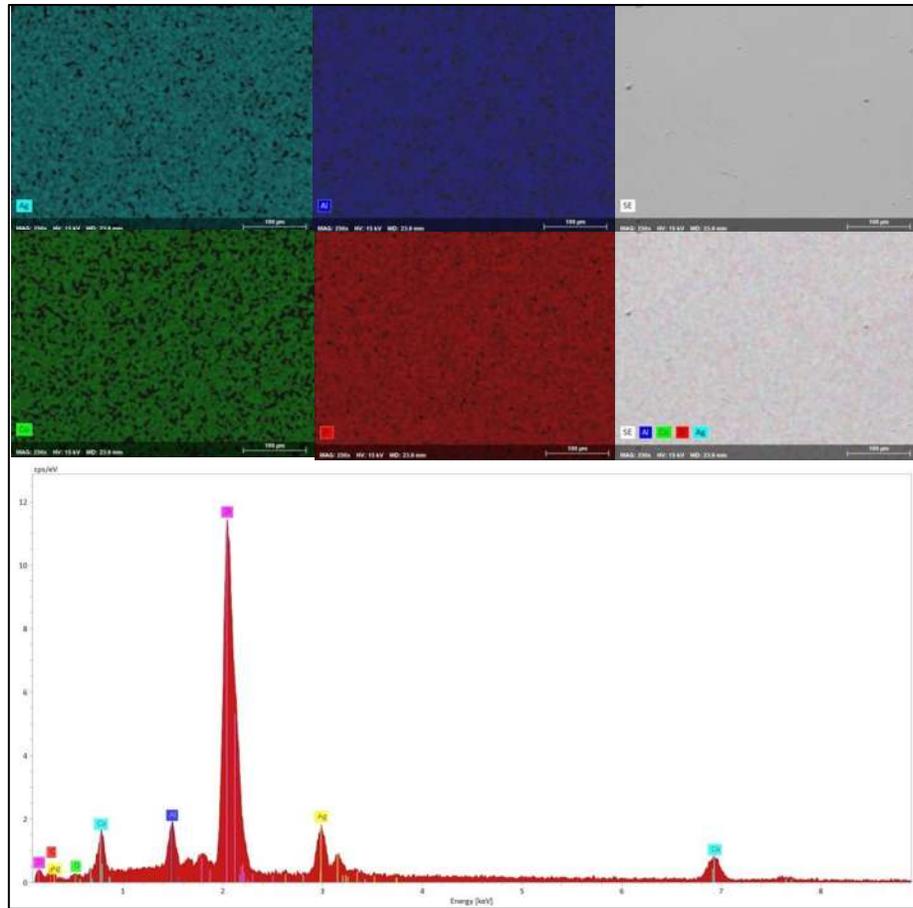


**Figura 4.14** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de las 3 cintas evaluadas de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}A_{19}Ag_{12}$  tomadas a 500 aumentos, correspondientes a a) cinta con 78.8 % de fase vítrea, b) cinta con 79.8 % de fase vítrea y c) cinta con 82.6 % de fase vítrea.

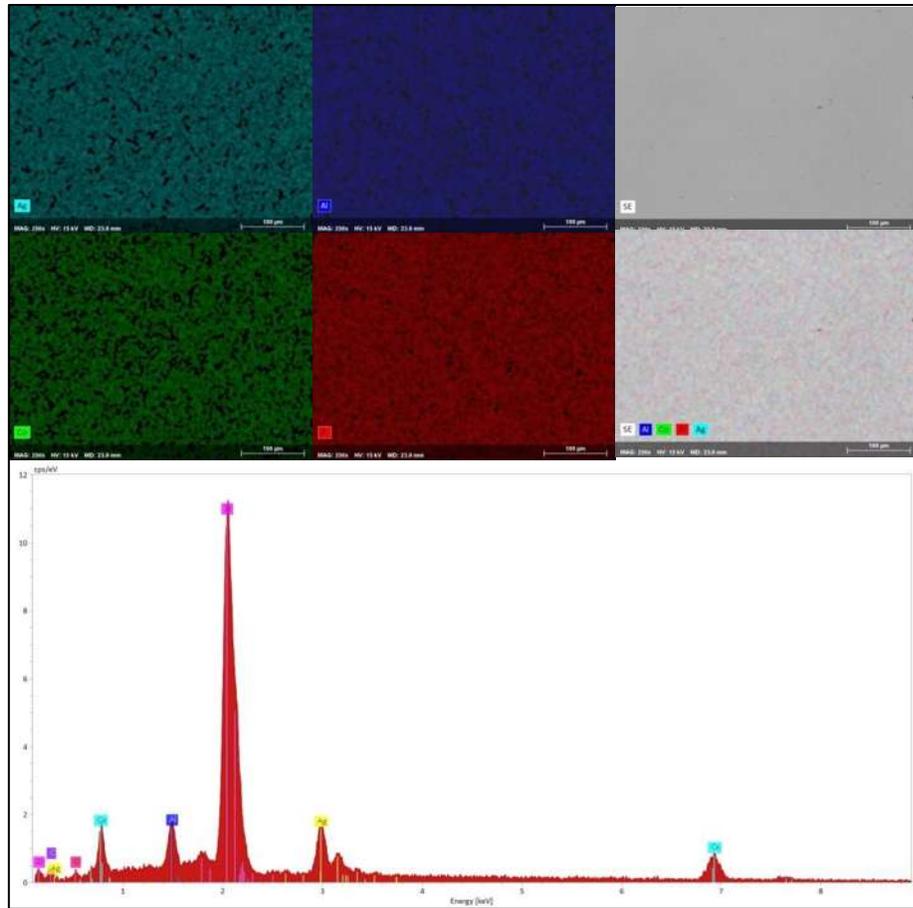
Se realizaron mapeos químicos y por medio de EDS se analizó la composición química de las cintas observando que son químicamente homogéneas en todos los casos, como se muestra en las Figuras 4.15-4.17. En la Tabla 4.2 se muestra la composición de las cintas, es posible observar que no presentan una pérdida considerable de los elementos de aleación iniciales.



**Figura 4.15** Mapeo químico y análisis químico por EDS de la cinta con 78.8 % de fase vítrea.



**Figura 4.16** Mapeo químico y análisis químico por EDS de la cinta con 79.8 % de fase vítrea.

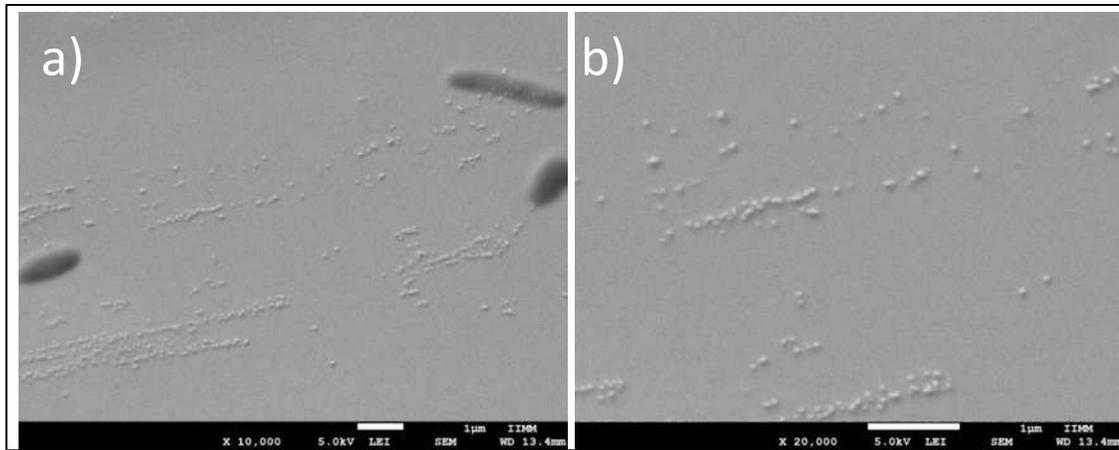


**Figura 4.17** Mapeo químico y análisis químico por EDS de la cinta con 82.6 % de fase vítrea.

**Tabla 4.2.** Análisis químico por EDS, elementos que presentaron variación en % at.

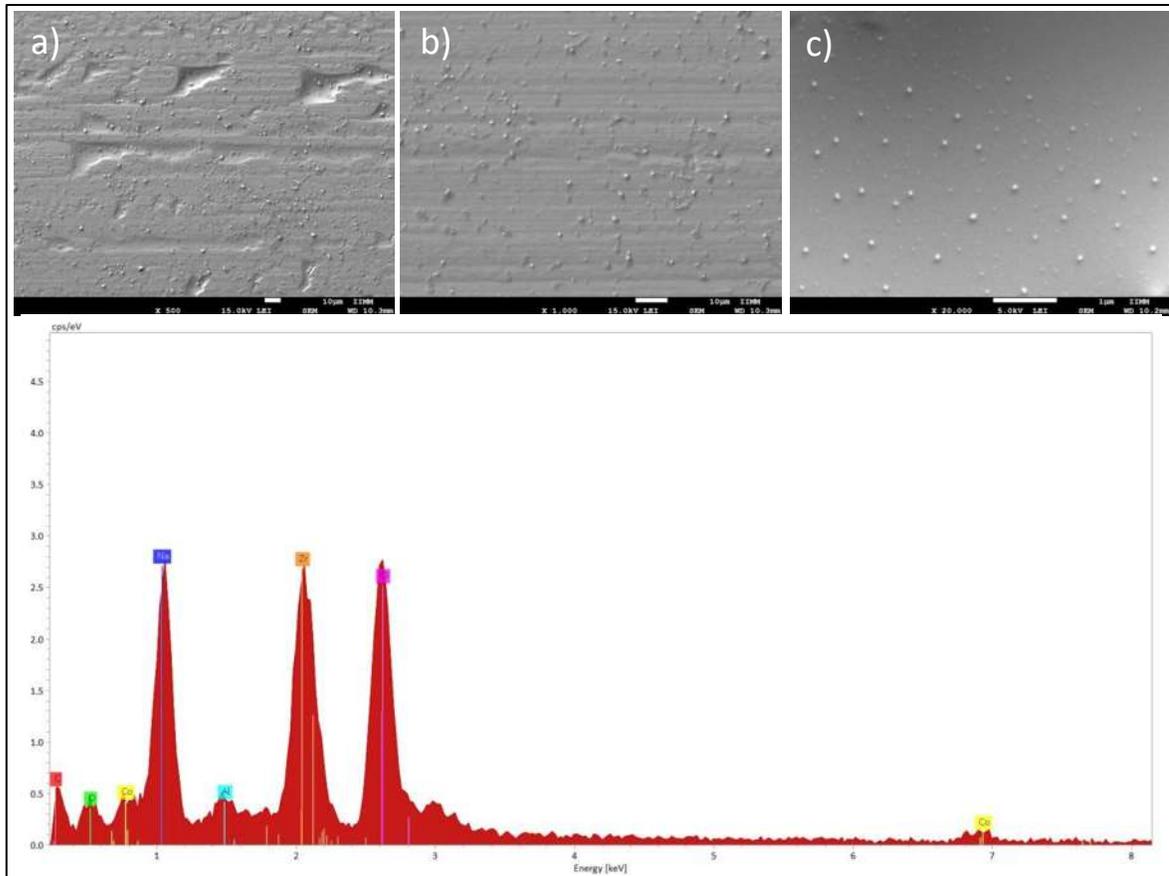
	<b>Cinta 1</b>	<b>Cinta 2</b>	<b>Cinta 3</b>	<b>Prom.</b>	<b>Inicial</b>
<b>Zr</b>	54.92725687	55.56844528	55.99662703	55.61794109	58
<b>Al</b>	7.977357333	8.604938139	8.374344426	8.271322791	9
<b>Ag</b>	11.43172162	11.30746706	11.54673532	11.3260477	12

Por otra parte, una vez realizada la prueba de inmersión en SBF se examinó la morfología superficial de las cintas. En la Figura 4.18 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 28 días a 10,000 aumentos en el inciso a) y 20,000 aumentos en el inciso b) respectivamente, se puede observar que mantiene una superficie lisa y continua.



**Figura 4.18** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 28 días a 10000 y 20000 aumentos, incisos a) y b) respectivamente.

Se observó también la presencia de pequeñas formaciones de partículas, las cuales están dispersas sobre toda la superficie de las cintas, como se muestra en la Figura 4.19 que corresponde a la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 7 días, al realizar un análisis químico por EDS sobre estas partículas no se logra determinar adecuadamente su composición debido a que el volumen de interacción del haz es muy grande respecto al tamaño de las partículas; por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos mediante DRX la formación de estas partículas indica que se trata de hidroxiapatita.

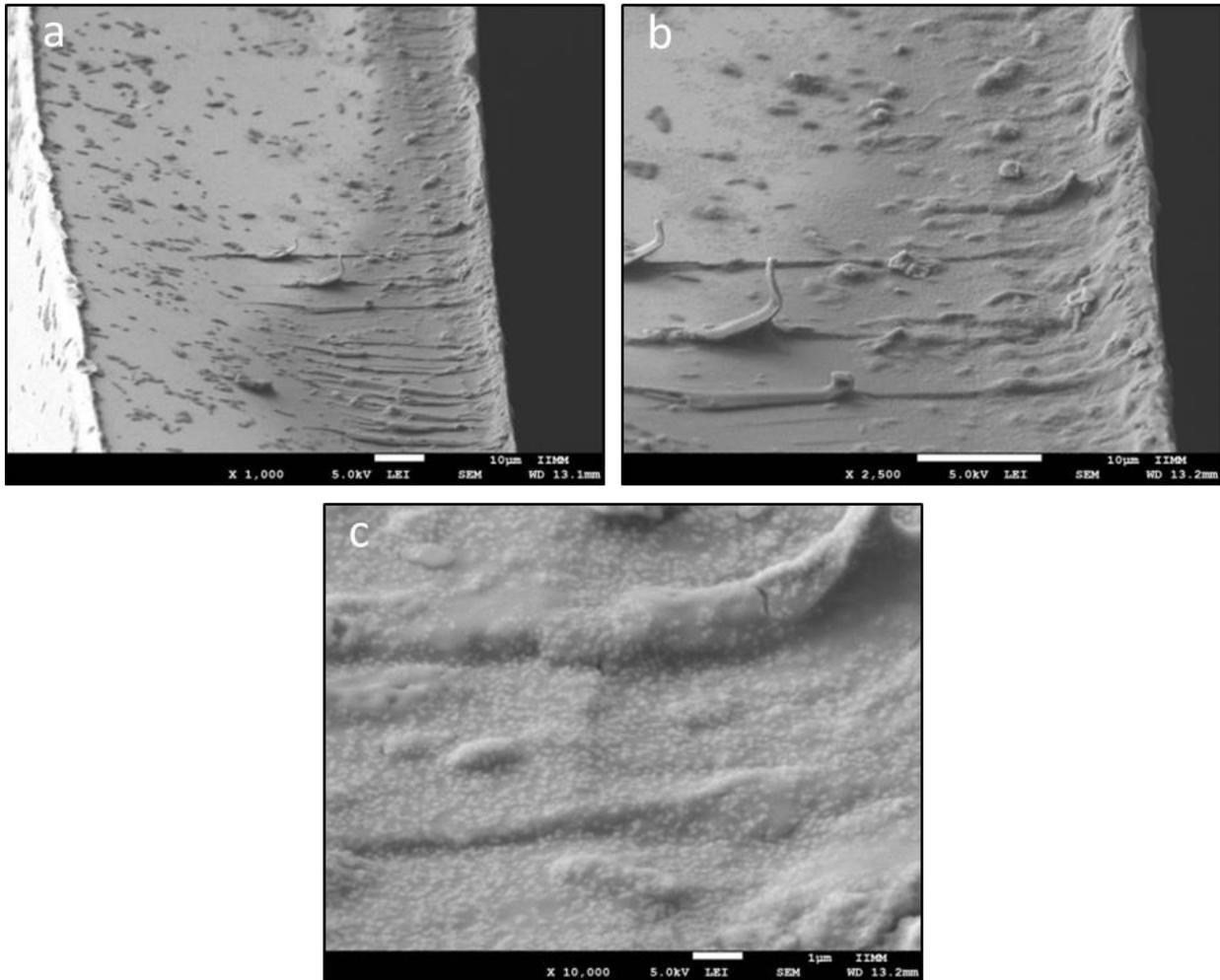


**Figura 4.19** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 7 días a a) 500, b) 1000 y c) 20000 aumentos respectivamente, con análisis químico mediante EDS en la parte inferior.

Se sabe que un material capaz de formar apatita en su superficie en un período corto en SBF se une al hueso vivo de igual manera en un corto período de tiempo, además, los materiales de unión ósea generalmente forman apatita en su superficie en 4 semanas [79]. Consideración este precedente, se realizó una prueba de inmersión en SBF a diferentes periodos a lo largo de 28 días para evaluar la habilidad de las cintas para formar apatita parecida al hueso sobre su superficie.

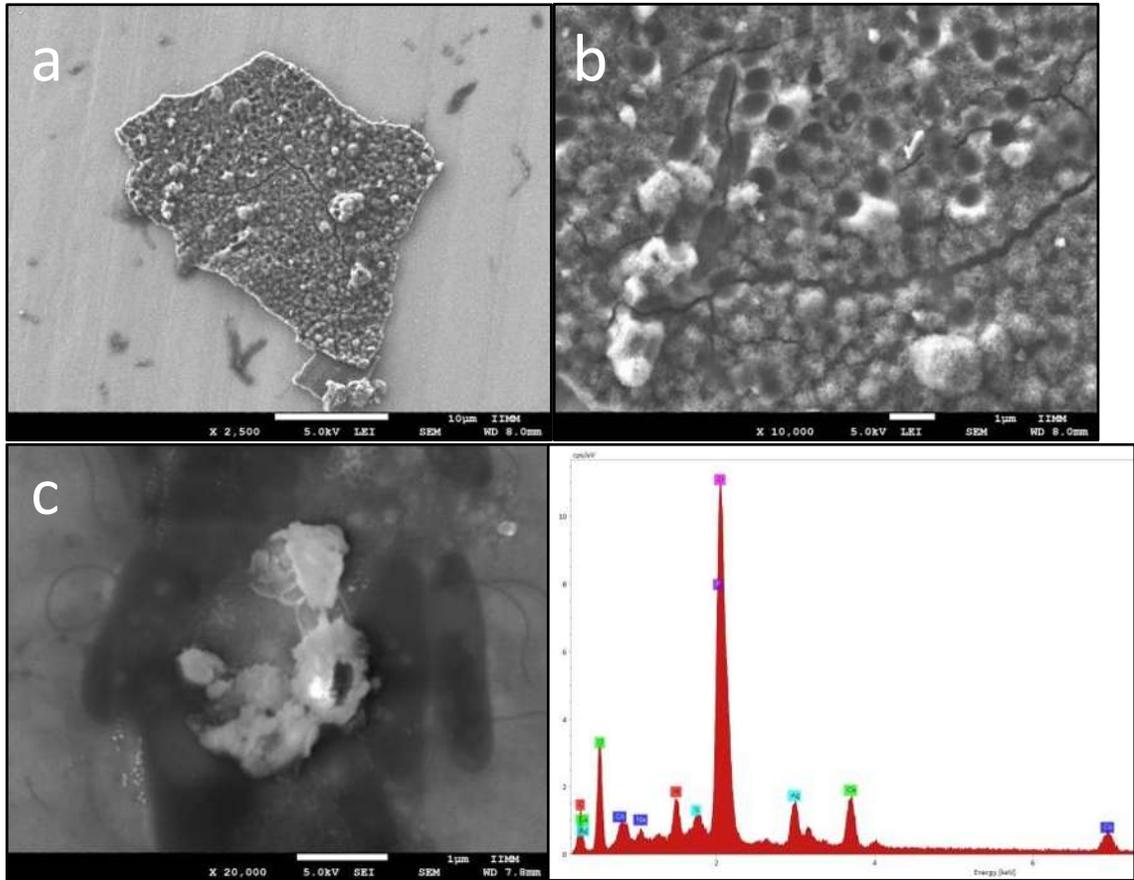
Los periodos evaluados durante el ensayo de inmersión en SBF corresponden a 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días para las 3 cintas; en la Figura 4.20 se muestran imágenes de la superficie de la cinta con 78.8 % de fase vítrea después de 3 días de inmersión a diferentes aumentos, en la cual es posible observar la presencia de pequeñas formaciones de partículas de forma esférica sobre la superficie de la cinta, sin embargo al realizar un análisis químico por EDS sobre estas partículas no se logra

determinar adecuadamente su composición debido a que el volumen de interacción del haz es muy grande respecto al tamaño de las partículas.



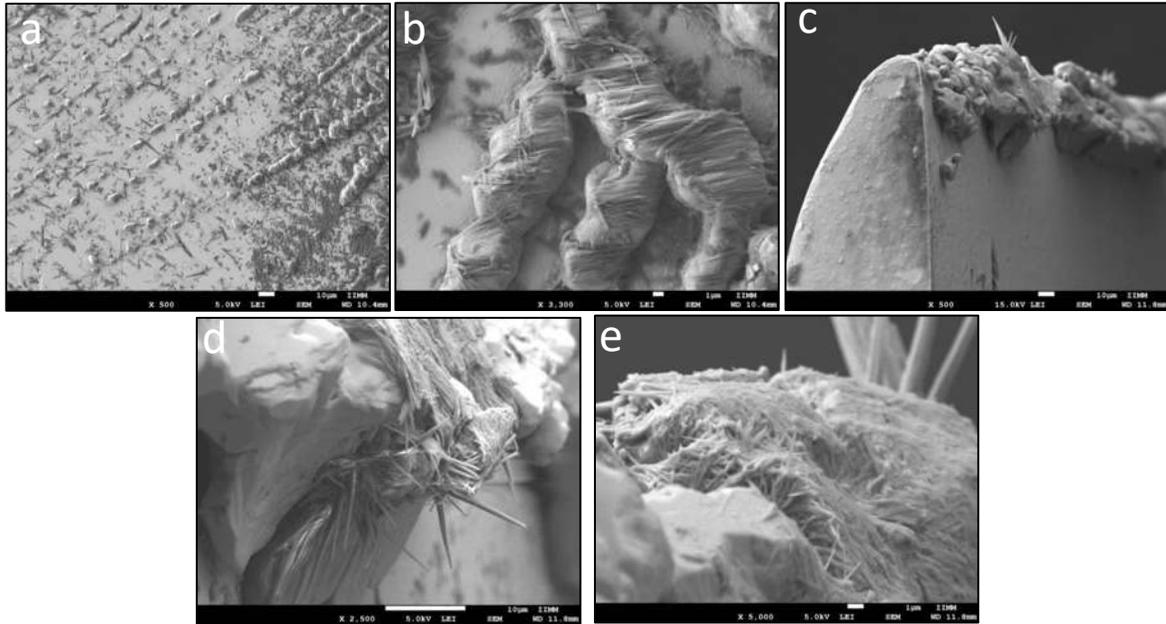
**Figura 4.20.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 3 días tomadas a a) 1,000 aumentos, b) 2,500 aumentos y c) 10,000 aumentos.

En la Figura 4.21 se muestran imágenes de la superficie de la misma cinta con 78.8 % de fase vítrea después de 21 días de inmersión a diferentes aumentos, encontrando la presencia de pequeños dominios con morfología esférica compuesta de pequeños cristales alargados, que son una característica típica de la fase de apatita formada en inmersión en SBF, se muestra también el análisis por EDS que comprueba la presencia de Ca en estos dominios.

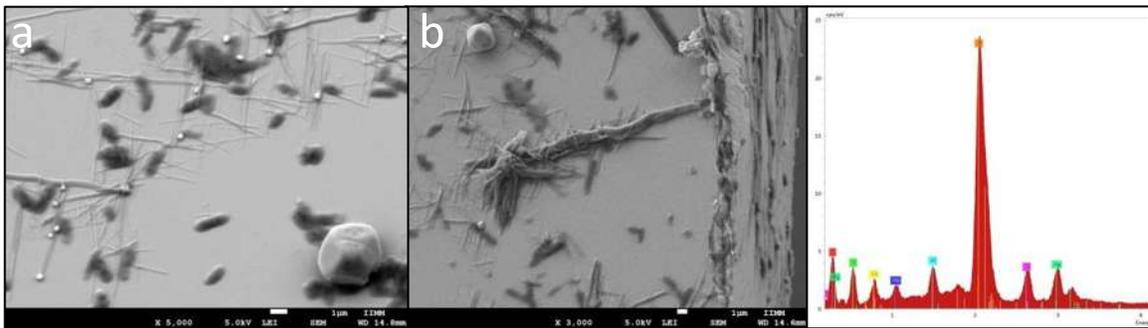


**Figura 4.21.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 78.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 21 días tomadas a a) 2,500 aumentos, b) 10,000 aumentos y c) 20,000 aumentos con su análisis químico por EDS.

Este tipo de cristales alargados se observaron de manera abundante sobre la superficie de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 7 días mostrados en las Figura 4.22 y 4.23, se observa que están presentes en diferentes zonas de la cinta incluyendo los bordes. Sin embargo al hacer un análisis por EDS como se muestra en la Figura 4.23 solamente se detecta la presencia de Cl y Na, que son sales presentes en la composición del SBF.

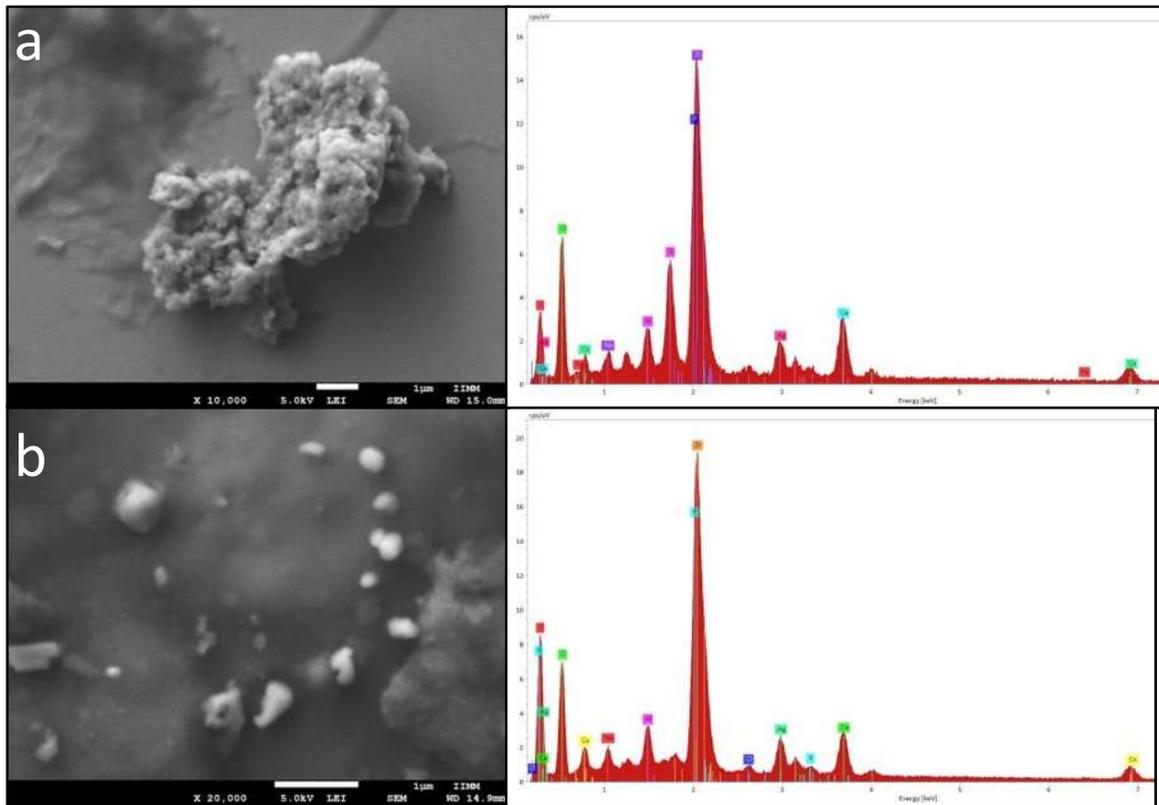


**Figura 4.22.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 7 días tomadas a a) 500 aumentos, b) 3,300 aumentos, c) 500 aumentos, d) 2,500 aumentos y e) 5,000 aumentos.



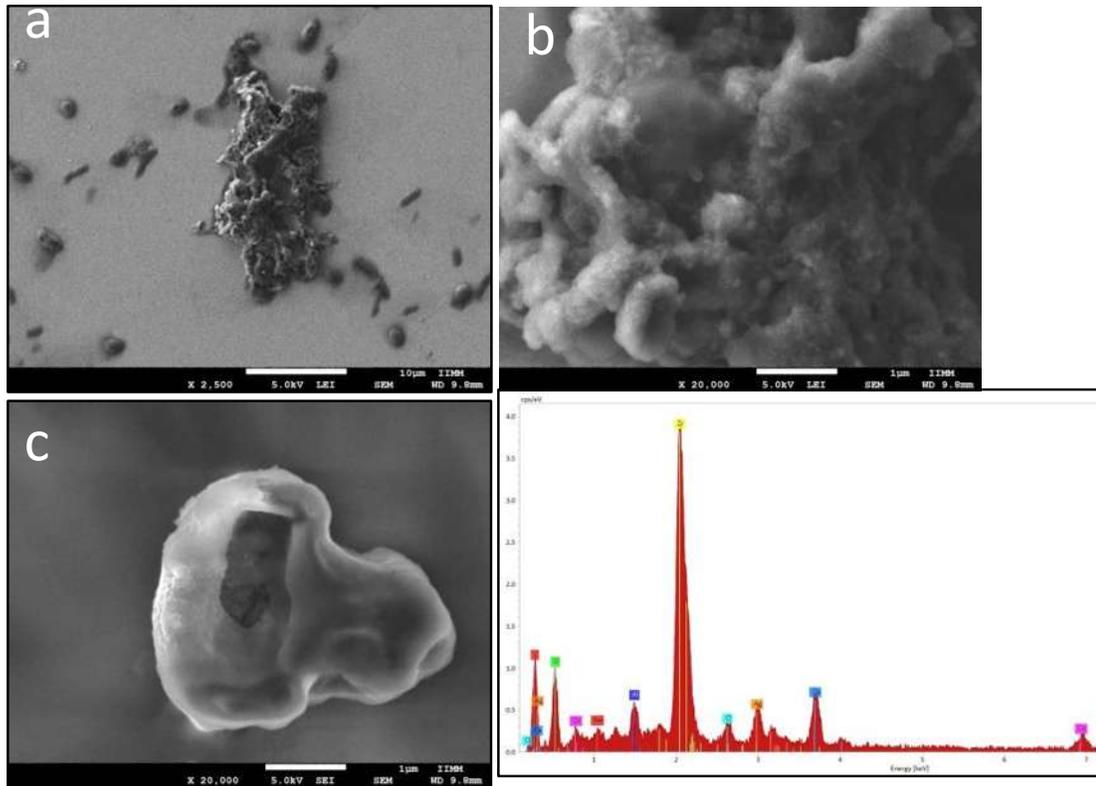
**Figura 4.23.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 7 días tomadas a a) 5,000 aumentos, b) 3,000 aumentos con su análisis químico por EDS.

Para la misma cinta con 79.8 % de fase vítrea en este caso a 21 días de inmersión mostrada en la Figura 4.24, se encontró la presencia de partículas similares, sin embargo, de acuerdo al análisis por EDS éstas partículas contienen Ca.

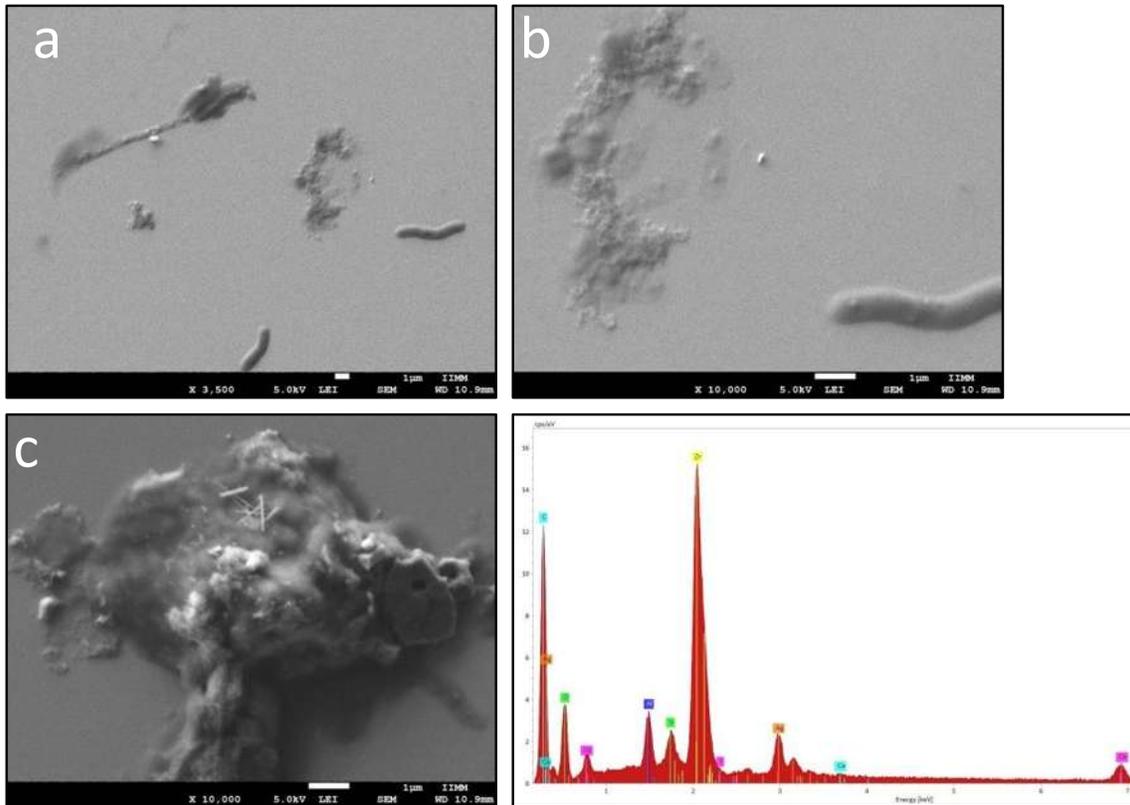


**Figura 4.24.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 79.8 % de fase vítrea sumergida en SBF por 21 días tomadas a a) 10,000 aumentos con su análisis químico por EDS y b) 20,000 aumentos con su análisis químico por EDS.

De igual manera en la Figura 4.25 se muestran imágenes de la cinta con 82.6 % de fase vítrea después de 14 días de inmersión y en la Figura 3.26 después de 21 días de inmersión a diferentes aumentos, en las cuales se observaron a lo largo de la superficie de la cinta pequeños dominios con morfología muy similar para los cuales realizando un análisis por EDS se detecta también la presencia de Ca en ambos casos. Sin embargo a 21 días de inmersión se puede observar la presencia de pequeños cristales alargados junto con los dominios, que como se mencionó anteriormente es la morfología típica de la apatita formada en SBF.



**Figura 4.25.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF por 14 días tomadas a a) 2,500 aumentos, b) 20,000 aumentos y c) 20,000 aumentos con su análisis químico por EDS.

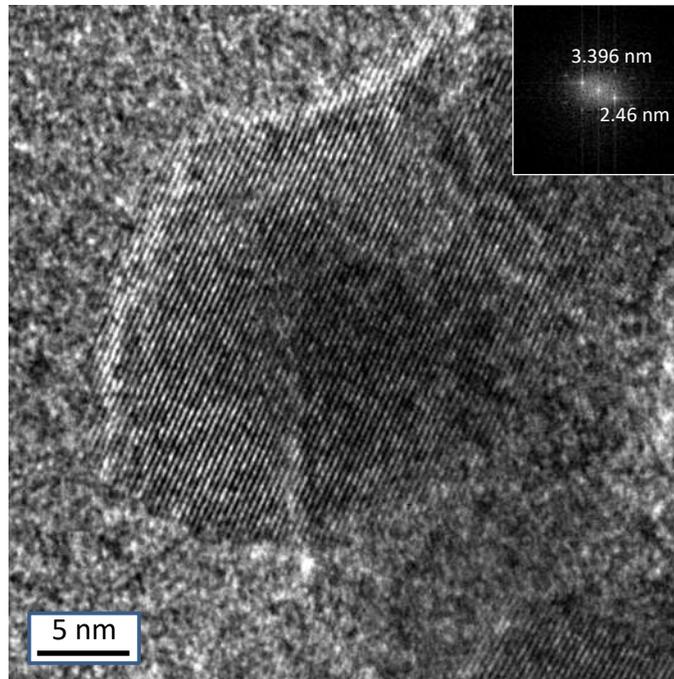


**Figura 4.26.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF por 21 días tomadas a a) 3,500 aumentos, b) 10,000 aumentos y c) 10,000 aumentos con su análisis químico por EDS.

Se identificó para las 3 cintas que las partículas que contienen Ca presentan una morfología muy similar entre ellas con formaciones esféricas a partir de cristales alargados, por lo que se determina que corresponden a apatita debido a su morfología característica.

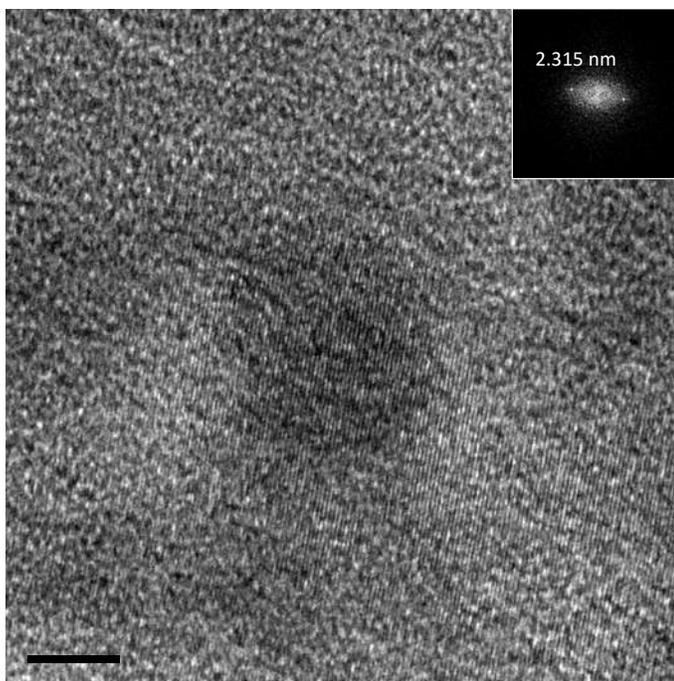
#### **4.1.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Con la finalidad de identificar las fases cristalinas previamente detectadas por XRD, las cintas obtenidas por CBMS fueron caracterizadas por MET. La Figura 4.27 muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), correspondiente a la cinta con 78.8 % de fase vítrea, para la cual las distancias interplanares correspondientes a los planos se identifican a partir de la transformada rápida de Fourier, es decir, FFT (111) de  $ZrO_2$  y (312) de  $Al_2O_3$  de un dominio cristalino.



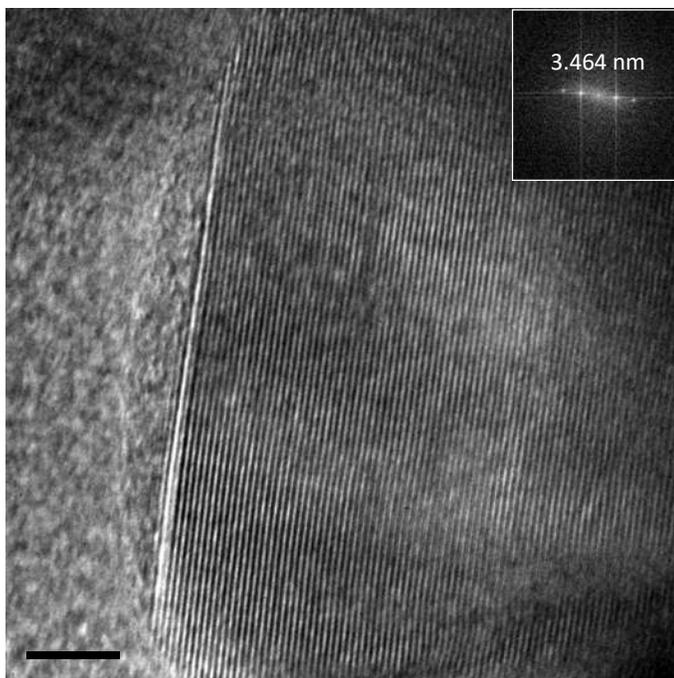
**Figura 4.27** Imagen HRTEM de una cinta con un 78.8 % de fase vítrea de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con inserción en la esquina superior derecha de su transformada rápida de Fourier.

En la Figura 4.28 se muestra una imagen de HRTEM correspondiente a la cinta con un 79.8% de fase vítrea con su respectiva transformada rápida de Fourier insertada en la esquina superior derecha, en la cual se puede identificar una distancia interplanar correspondiente a los planos (314) de  $Al_2O_3$ . Como se puede observar en todos los casos para las 3 cintas se identifica la presencia de óxidos de zirconio y de aluminio pertenecientes a la porción de fase cristalina de las cintas obtenidas el proceso de colada en bloque enfriante giratorio.



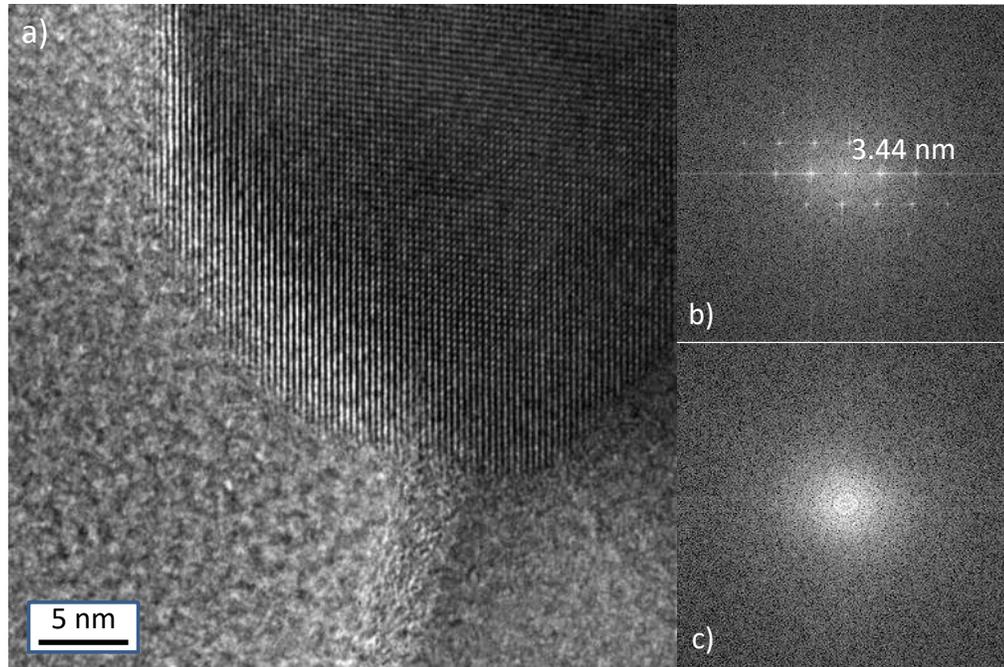
**Figura 4.28** Imagen de HRTEM de una cinta con un 79.8 % de fase vítrea de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con inserción en la esquina superior derecha de su transformada rápida de Fourier indicando la distancia interplanar correspondiente a los planos (314) de  $Al_2O_3$ .

En la Figura 4.29 se muestra una imagen de HRTEM correspondiente a la cinta con un 82.6 % de fase vítrea con su respectiva transformada rápida de Fourier insertada en la esquina superior derecha, en la imagen se puede identificar una distancia interplanar correspondientes a los planos (012) de  $Al_2O_3$ .



**Figura 4.29** Imagen de HRTEM de una cinta con un 82.6 % de fase vítrea de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  con inserción en la esquina superior derecha de su transformada rápida de Fourier indicando la distancia interplanar correspondiente a los planos (012) de  $Al_2O_3$ .

Por otra parte, en la Figura 4.30 se presenta una imagen HRTEM de la cinta con 82.6 % de fase vítrea con su respectiva FFT. Aquí se observa la presencia de una zona cristalina y una zona vítrea, indicadas en b) y c) respectivamente. La distancia interplanar correspondiente a los planos (111) de  $ZrO_2$  se identifica a partir de la zona cristalina, siendo 3.44 nm.

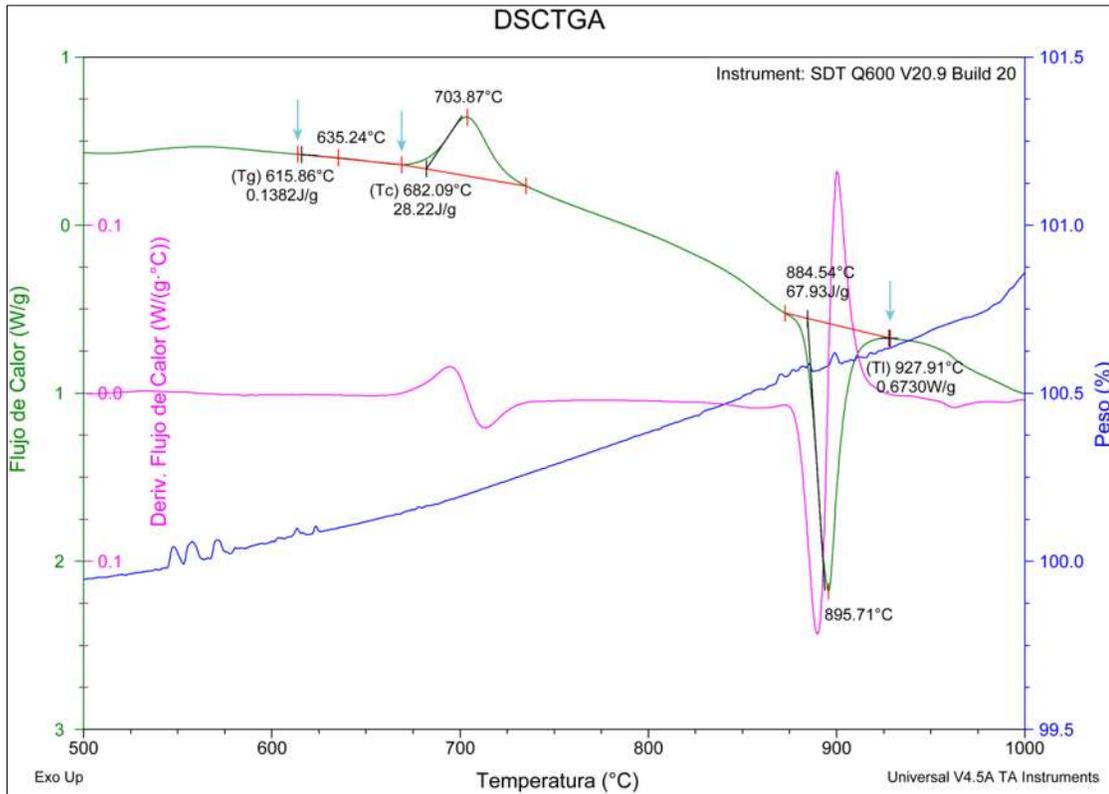


**Figura 4.30** a) Imagen HRTEM de una cinta con un 82.6 % de fase vítrea de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , b) Transformada rápida de Fourier que indica la distancia interplanar correspondiente a los planos (111) de  $ZrO_2$  y c) Transformada rápida de Fourier de una zona vítrea.

## 4.2 Caracterización térmica

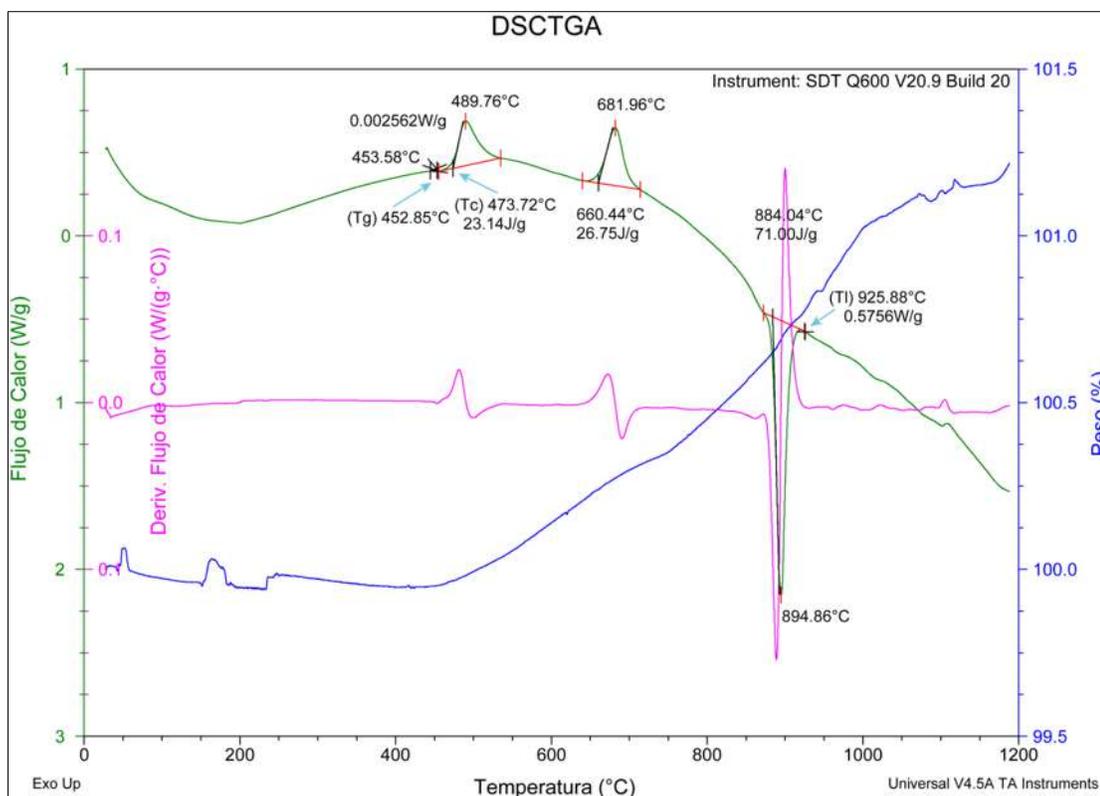
### 4.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La Figura 4.31 muestra la curva DSC de la cinta con 78.8 % de fase vítrea obtenida por CBMS, donde se observa una disminución en el flujo de calor antes de una reacción exotérmica que indica el inicio de la cristalización y se define por la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) en  $682^{\circ}C$ ; este fenómeno es típico de los vidrios metálicos y se manifiesta que es la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) en este caso a  $615^{\circ}C$ ; este comportamiento se atribuye a que la cinta no tiene una estructura puramente vítrea, lo cual es consistente con los resultados previamente observados por DRX; se observa un único pico endotérmico asociado con el proceso de fusión ( $T_m$ ) a  $895^{\circ}C$ , lo que sugiere que se trata de una composición eutéctica; la temperatura del líquido ( $T_l$ ) fue de  $927^{\circ}C$ .



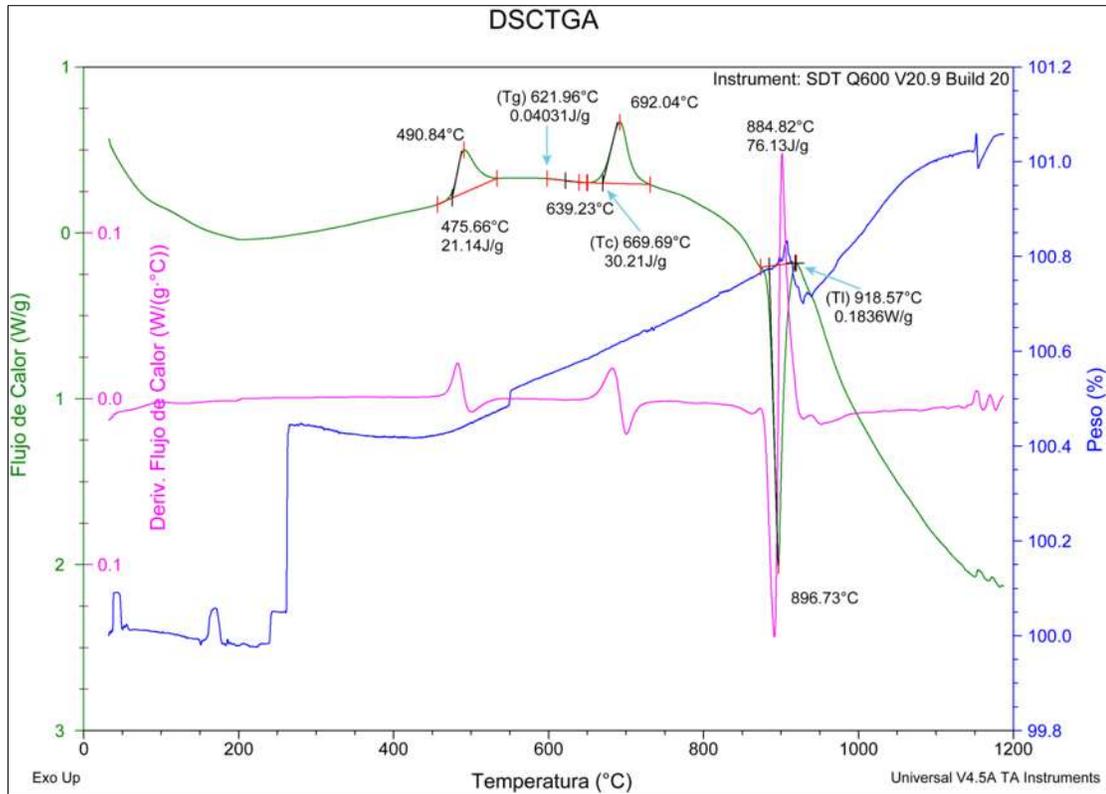
**Figura 4.31.** Curva DSC donde se muestran las temperaturas de transición vítrea  $T_g$ , cristalización  $T_c$  y de líquidus  $T_l$ , de la cinta con 78.8 % de fase vítrea.

En la curva DSC de la cinta con 79.8 % de fase vítrea mostrada en la Figura 4.32, se observa un comportamiento similar con dos picos exotérmicos a 473 °C y 660 °C, respectivamente, lo que indica una transformación de fase asociada con la fracción cristalina presente en la cinta. En esta cinta, se identificó la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) a 452 °C antes del primer pico exotérmico y la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) a 473 °C seguida de un solo pico endotérmico asociado con el proceso de fusión ( $T_m$ ) a 894 °C, la temperatura del líquido ( $T_l$ ) fue de 925 °C.



**Figura 4.32.** Curva DSC de la cinta con 79.8 % de fase vítrea donde se muestra transformación de fase de la porción cristalina así como las temperaturas de transición vítrea  $T_g$ , cristalización  $T_c$  y de líquidos  $T_l$ .

La Figura 4.33 muestra la curva DSC de la cinta con 82.6 % de fase vítrea, donde se observan dos picos exotérmicos a 475 °C y 669 °C, respectivamente, lo que indica una transformación de fase asociada con la fracción cristalina presente en la cinta. Antes del segundo pico exotérmico, se identificaron la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) a 621 °C y la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) a 669 °C, seguida de un solo pico endotérmico asociado con el proceso de fusión ( $T_m$ ) a 896 °C, la temperatura del líquido ( $T_l$ ) fue de 918 °C.



**Figura 4.33.** Curva DSC de la cinta con 82.6 % de fase vítrea donde se muestra transformación de fase de la porción cristalina así como las temperaturas de transición vítrea  $T_g$ , cristalización  $T_c$  y de líquidos  $T_l$ .

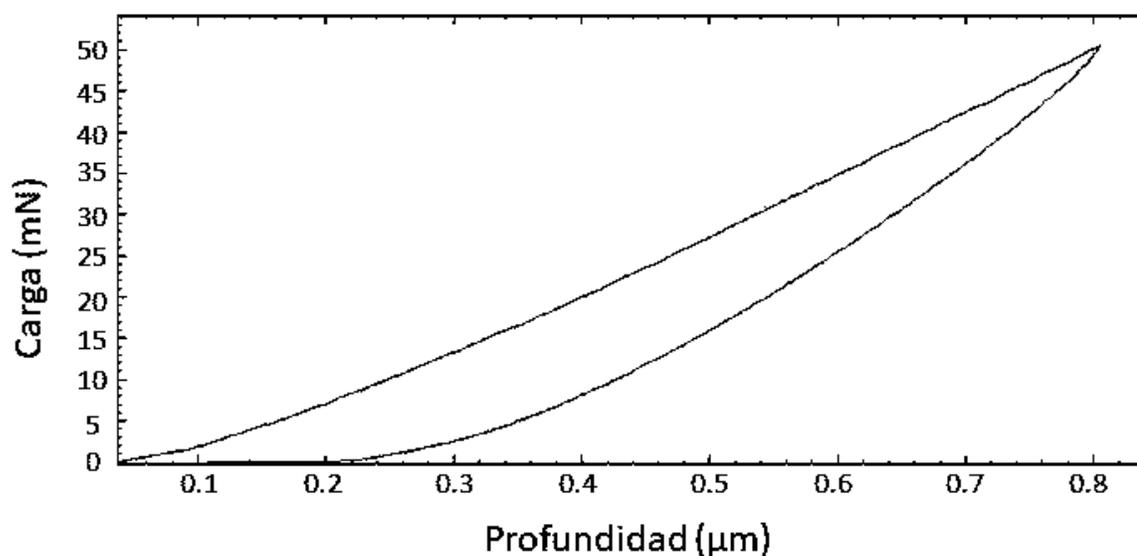
La Tabla 4.3 resume las propiedades térmicas,  $T_g$ ,  $T_c$ ,  $T_m$ ,  $T_l$ , la relación  $\Delta T_x = (T_c - T_g)$ , y la temperatura reducida de transición vítrea  $T_{rg} = (T_g / T_l)$  de las tres cintas producidas.

**Tabla 4.3** Propiedades térmicas de las tres cintas obtenidas por CBMS.

Cintas de la aleación	$T_g$	$T_c$	$T_m$	$T_l$	$\Delta T_x$	$T_{rg}$
<b>Zr<sub>58</sub>Co<sub>21</sub>Al<sub>9</sub>Ag<sub>12</sub></b>						
<b>78.8 % Fase vítrea</b>	<b>615</b>	<b>682</b>	<b>895</b>	<b>927</b>	<b>67</b>	<b>0.6634</b>
<b>79.8 % Fase vítrea</b>	<b>452</b>	<b>473</b>	<b>894</b>	<b>925</b>	<b>21</b>	<b>0.4886</b>
<b>82.6 % Fase vítrea</b>	<b>621</b>	<b>669</b>	<b>896</b>	<b>918</b>	<b>48</b>	<b>0.6765</b>

### 4.3 Nanoindentación

La Figura 4.34 muestra la curva de carga-desplazamiento de nanoindentación obtenida de la muestra de  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , sometida a una tasa de carga única de 100 mN/min, alcanzando una carga máxima de 49.84 mN. El módulo de Young y la dureza fueron 42.43 GPa y 7.72 GPa, respectivamente. Estos resultados mostraron que la dureza obtenida mejoró significativamente con respecto a los biomateriales convencionales, como el acero inoxidable 316 L (3.34 GPa) y la aleación CoCrMo (3.76 GPa). El módulo de Young fue menor que el del Ti biomédico comercial, que generalmente es superior a 100 GPa [84].



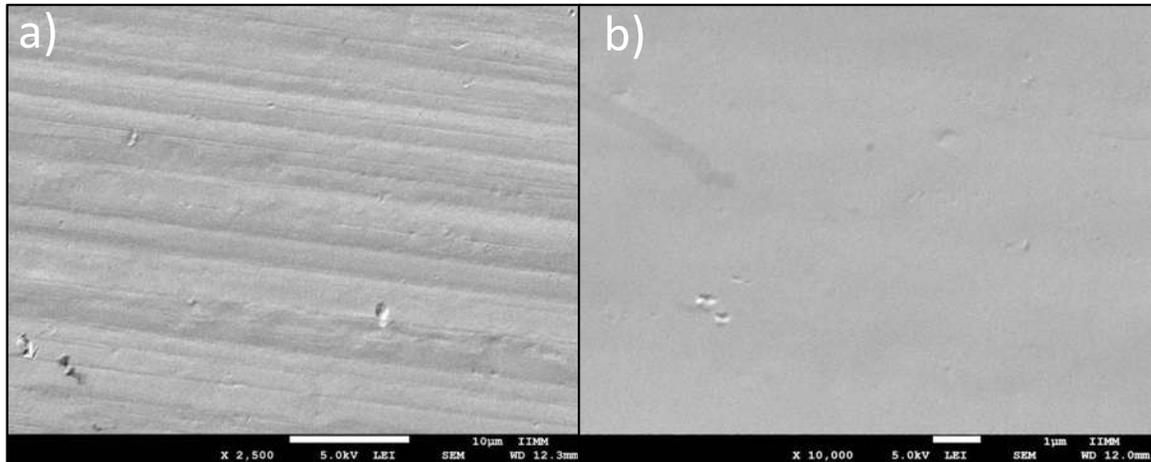
**Figura 4.34** Curva de desplazamiento de nanoindentación de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  para una carga de 100 mN / min.

### 4.4 Análisis de bioactividad

#### 4.4.1 Ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF)

Se examinó por MEB la morfología de la superficie de las cintas sumergidas en SBF. La Figura 4.35 muestra las imágenes MEB de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF durante 28 días. Se observa una superficie lisa y continua, indicando la ausencia de ataque por corrosión, tanto en la parte central como en los bordes. Este comportamiento es interesante, considerando

que las muestras fueron cortadas de la misma cinta, lo que podría generar un punto de corrosión al interrumpir su continuidad, como lo mencionan Sun y col. [48].



**Figura 4.35** Imagen MEB de la cinta con 82.6 % de fase vítrea sumergida en SBF durante a) 21 días a 2,500 X y b) 28 días 10,000 X.

En términos generales, la bioactividad del vidrio está estrictamente correlacionada con la tasa de crecimiento de hidroxiapatita en su superficie, tanto in vitro como in vivo. Aunque se ha demostrado que algunos materiales se unen al hueso sin formar una capa superficial similar a la apatita in vitro (resultados falsos negativos), la evaluación de la bioactividad in vitro se considera una prueba clave que debe realizarse siguiendo las recomendaciones estándar [85].

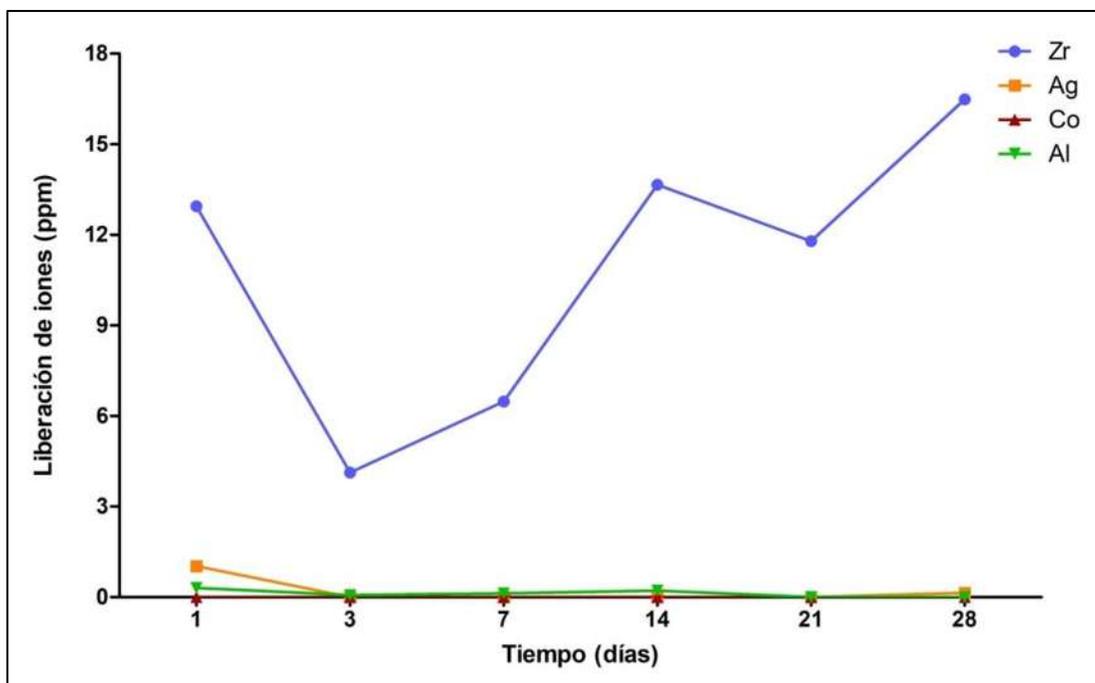
#### 4.5 Liberación de iones metálicos

La Tabla 4.4 muestra la liberación promedio de iones metálicos bajo inmersión estática en SBF considerando las 3 cintas.

**Tabla 4.4** Concentración promedio de iones metálicos liberados de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

Elemento	Concentración media diaria (ppm)
Zr	10.254
Ag	0.099
Co	0
Al	0.407

La Figura 4.36 muestra la gráfica de liberación de iones de la cinta con 78.8 % de fase vítrea, donde se observa una alta concentración de iones Zr desde el primer día de inmersión en SBF, que disminuye considerablemente para el tercer día y continúa incrementando poco a poco los días posteriores, mostrando una breve disminución en el día 21 que vuelve nuevamente a incrementarse. Respecto a la Ag y el Al se observa muy poca liberación durante el primer día y para los días posteriores de la inmersión se mantienen nulos, así como el Co que no presentó liberación en ningún momento durante toda la prueba. En la Tabla 4.5 se muestran los valores promedio de liberación de iones para esta cinta durante la prueba de inmersión.



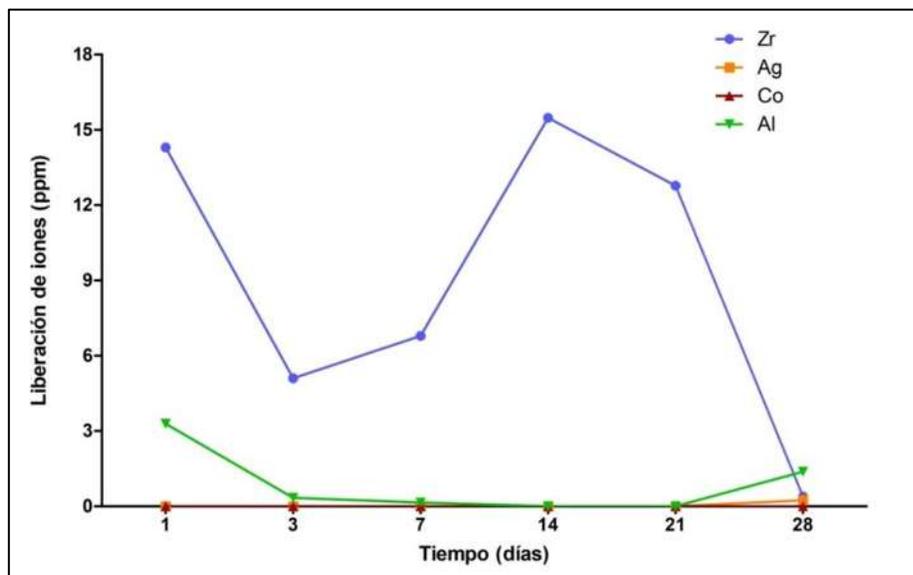
**Figura 4.36** Gráfica de liberación de iones correspondiente a la cinta con 78.8 % de fase vítrea, después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

**Tabla 4.5** Concentración de iones metálicos liberados de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

Elemento	Concentración media diaria (ppm)
Zr	10.916
Ag	0.196
Co	0
Al	0.121

La Figura 4.37 muestra la gráfica de liberación de iones de la cinta con 79.8 % de fase vítrea, donde se puede observar un comportamiento bastante similar al de la cinta con 78.8% de fase vítrea con una alta concentración de iones Zr desde el primer día de inmersión en SBF, que disminuye considerablemente para el tercer día y poco a poco comienza a incrementarse, sin embargo, en esta cinta después de la disminución del día 21, la liberación de Zr disminuye considerablemente para el día 28 a valores casi nulos (0.387 ppm). Ag y Al presentan muy poca liberación durante el inicio de la prueba de inmersión y al llegar al día 28, el Co no presentó

liberación durante toda la prueba. En la Tabla 4.6 se muestran los valores promedio de liberación de iones para esta cinta.



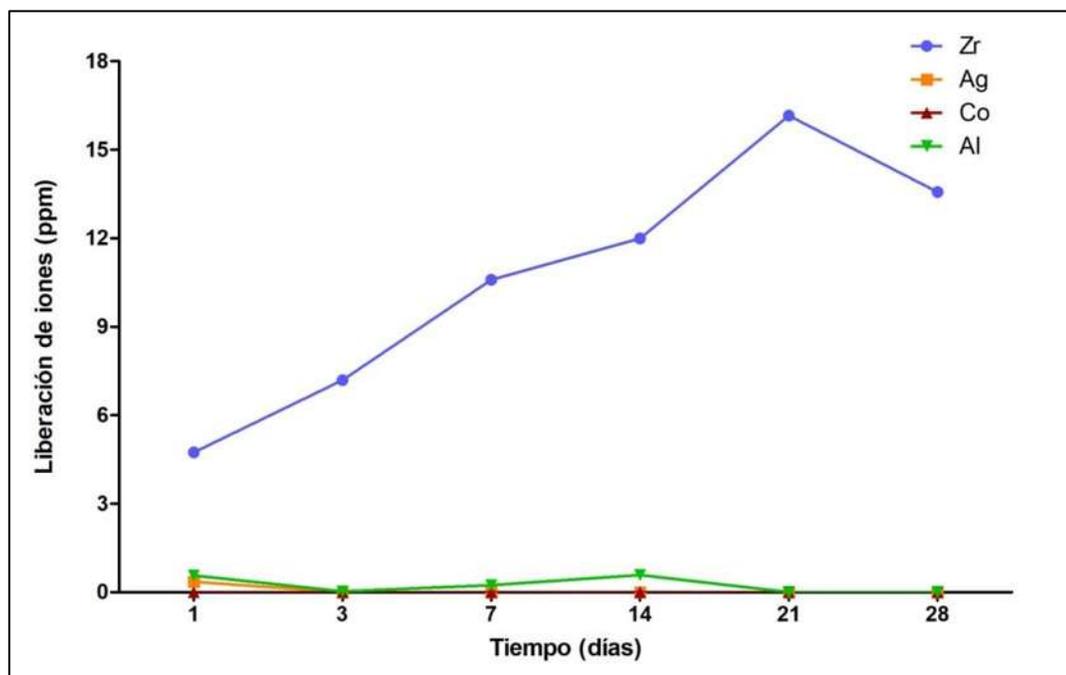
**Figura 4.37** Gráfica de liberación de iones correspondiente a la cinta con 79.8 % de fase vítrea, después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

**Tabla 4.6** Concentración de iones metálicos liberados de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

Elemento	Concentración media diaria (ppm)
<b>Zr</b>	<b>9.138</b>
<b>Ag</b>	<b>0.041</b>
<b>Co</b>	<b>0</b>
<b>Al</b>	<b>0.861</b>

La Figura 4.38 muestra la gráfica de liberación de iones de la cinta con 82.6 % de fase vítrea, en esta gráfica se puede observar un comportamiento ascendente desde el inicio de la prueba respecto a la liberación de iones Zr durante el primer día con valores relativamente bajos (4.74 ppm), hasta el día 21 mostrando un máximo de (16.16 ppm) y a partir de ese momento muestra un descenso hasta el final de la prueba (13.567 ppm); el comportamiento presentado en esta cinta

es un poco más estable en cuanto al ritmo de liberación de iones, sin embargo; es importante considerar que los valores desde el inicio de la prueba van en aumento. Los elementos Ag y Al presentan poca liberación, solamente al inicio de la prueba en el caso de la Ag y hasta el día 14 para el caso del Al; en esta cinta el Co de igual manera que en las anteriores no presentó liberación durante toda la prueba. En la Tabla 4.7 se muestran los valores promedio de liberación de iones para esta cinta.

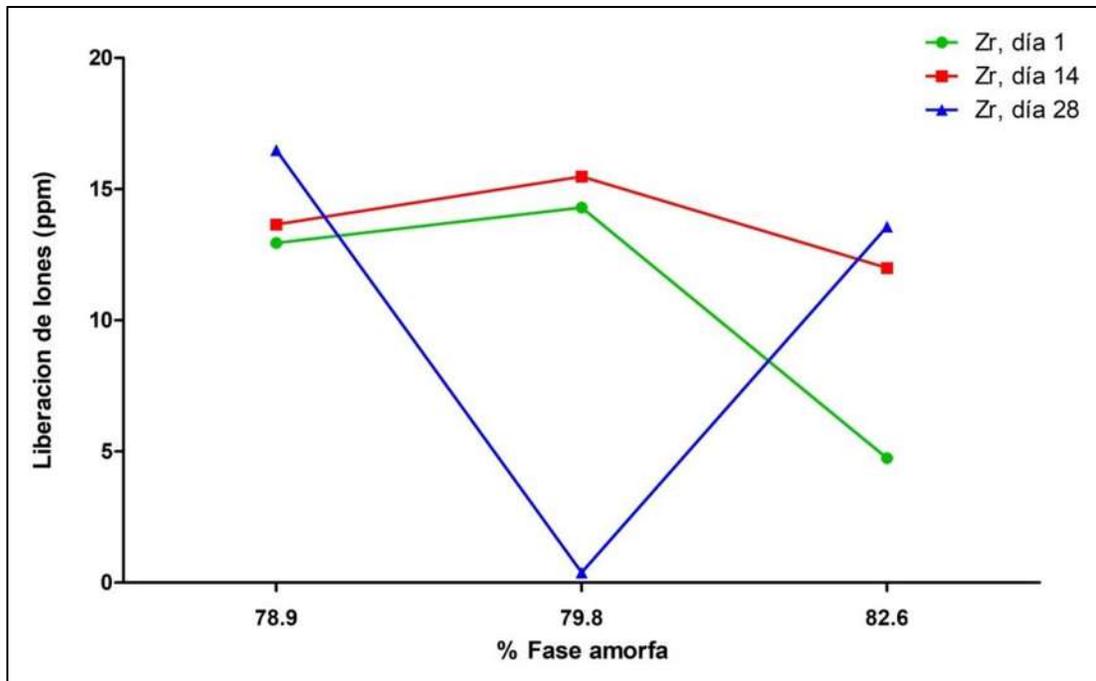


**Figura 4.38** Gráfica de liberación de iones correspondiente a la cinta con 82.6 % de fase vítrea, después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

**Tabla 4.7** Concentración de iones metálicos liberados de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  después de la inmersión estática en SBF a lo largo de 28 días.

Elemento	Concentración media diaria (ppm)
<b>Zr</b>	<b>10.708</b>
<b>Ag</b>	<b>0.06</b>
<b>Co</b>	<b>0</b>
<b>Al</b>	<b>0.238</b>

La liberación de iones de Ag y Al se mantiene con valores bajos durante la prueba de inmersión presentando un comportamiento similar en las 3 cintas evaluadas, así mismo, la presencia de Co no fue detectada en ningún momento el cual es un resultado bastante positivo ya que es un elemento tóxico para el cuerpo humano; este comportamiento se atribuye a que su doble estructura FCC-HCP le confiere estabilidad química permitiendo que no libere iones durante la prueba de inmersión en SBF. En el caso de la liberación de iones Zr mostrado en la Figura 4.39, se puede observar un comportamiento similar entre las cintas con 78.8% y 79.8% de fase vítrea en las que existe liberación de iones al inicio de la prueba que poco a poco disminuye para nuevamente volver a liberar como es el caso de la cinta con 78.8% de fase vítrea y para la cinta con 79.8% de fase vítrea disminuir definitivamente; dicho comportamiento es habitual ya que se espera que la tasa de liberación de iones inicial sea ligeramente superior a la de los días posteriores; esto se debe a que la superficie de la cinta inicial está "fresca" y activa. Comportamiento que, por otra parte, se relaciona con las lecturas en donde existe de igual manera liberación de Ag y Al; lo que podría relacionarse con un fenómeno de interrupción-formación de la capa pasiva que naturalmente presentan Zr y Al debido a su naturaleza oxifílica, que se ve interrumpida al estar inmersos en la solución SBF por la acción de los cloruros que contiene. En el caso de la cinta con 82.6% de fase vítrea este comportamiento varía siendo constante el aumento en la liberación de iones Zr a lo largo de la prueba de inmersión mostrando un pequeño descenso hacia el final, por lo que, al considerar el comportamiento de las 3 cintas al tener diferentes porcentajes de fase vítrea presentes, se puede observar que la composición próxima a un 80% de fase vítrea está más cerca de lograr un equilibrio entre la formación-interrupción de la capa pasiva de óxido tanto de Zr como de Al, y una vez sobrepasado un 80% de fase vítrea se observa en general un aumento en la liberación de iones de Zr que podría indicar que la formación de las capas pasivas de óxidos se dificulta ante la presencia de los iones cloruro de la solución, de manera que en esta prueba la cinta con 79.8% de fase vítrea presenta los mejores resultados en cuanto a liberación de iones.



**Figura 4.39** Gráfica de liberación de iones de Zr comparativa para las 3 cintas durante la prueba de inmersión en SBF.

#### 4.6 Ensayo de adherencia celular

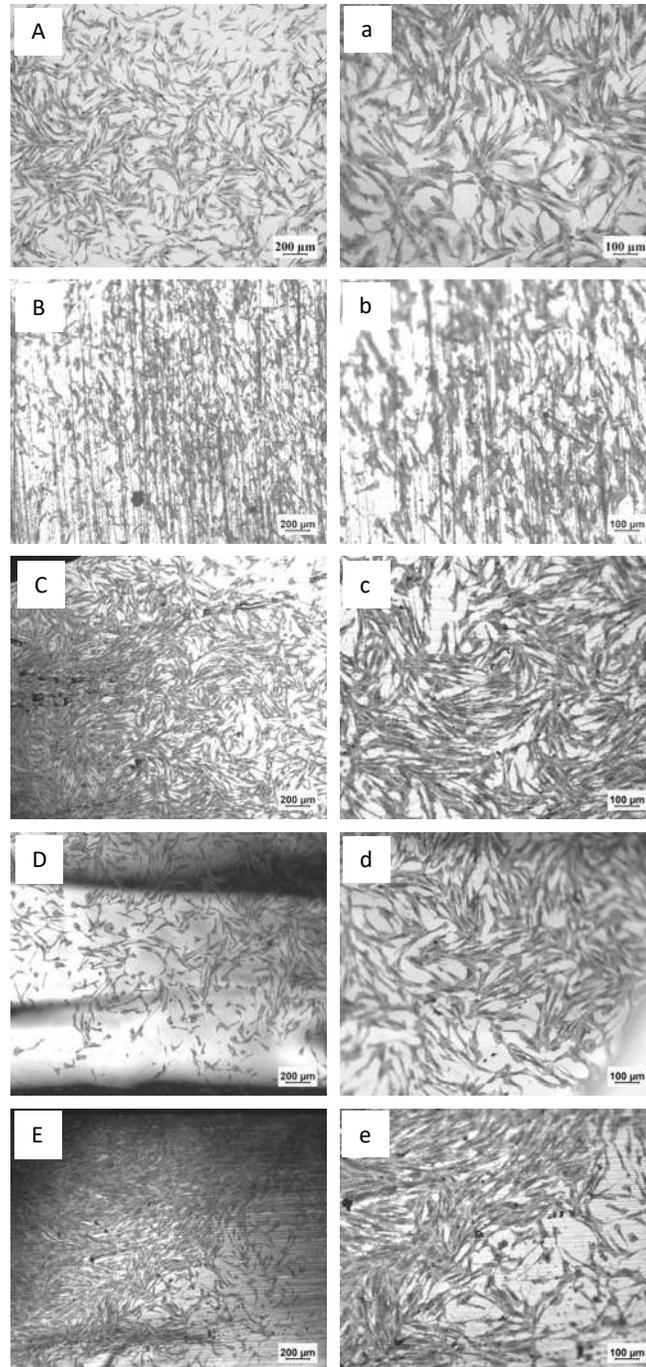
La Tabla 4.8 resume la desviación estándar y media del ensayo de adherencia celular de tres réplicas para cada muestra de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  y cuatro réplicas para el control de Ti6Al4V.

**Tabla 4.8** Medias y desviaciones estándar de las muestras utilizadas para la prueba de adherencia celular.

Cinta de aleación	$\bar{X}$ (g)	SD (g)
<b><math>Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}</math></b>		
<b>78.8 % Fase vítrea</b>	0.03423	0.00598
<b>79.8 % Fase vítrea</b>	0.00988	0.00022
<b>82.6 % Fase vítrea</b>	0.01674	0.00088
<b>Ti6Al4V (Control)</b>	0.26857	0.07303

La Figura 4.40. A y a muestra microfografías del control tomadas a 5 y 10 X respectivamente, donde se observa la superficie de la placa de cultivo en la que se puede apreciar la forma típica de

huso de las células hDPSC, y su distribución luego de un período de incubación de 24 horas; esta imagen representa la morfología y distribución típicas de las células. *B* y *b* muestran micrografías de la aleación Ti6Al4V tomadas a 5 y 10 X respectivamente, se observan las células hDPSC en la superficie de la muestra; sin embargo, se ve claramente que hay muchas áreas sin células adheridas en comparación con la cinta con 78.8 % de fase vítrea mostrada en *C* y *c*, donde se observa una morfología alargada o de huso completamente definida desde los extremos hacia el centro de la muestra, formando casi una monocapa en la superficie con tan solo 24 horas de incubación; así mismo, se observa que es la aleación la que permite buena adherencia dado que en su superficie no se detecta la presencia de defectos que pudieran servir como puntos de anclaje indicando que es citocompatible. Un comportamiento similar fue observado en la cinta con 79.8 % de fase vítrea como se muestra en *D* y *d* donde se evidencia una mayor concentración celular, incluso formando casi una monocapa en la superficie de la muestra, que para el tiempo de incubación presenta un crecimiento relativamente abundante; esta misma característica se observa en la cinta con 82.6 % de fase vítrea mostrada en *E* y *e*, sin embargo, en este caso, se observa que hay menos células en la superficie de la muestra, la cual igualmente aparece totalmente lisa y libre de defectos.

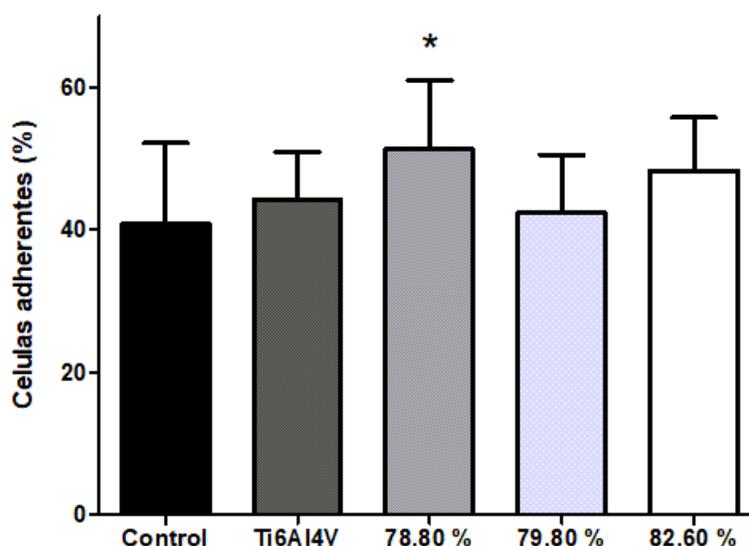


**Figura 4.40** Micrografías de adhesión celular en el material. Micrografías representativas de células hDPSC que se tiñeron con violeta cristal después de 24 horas de incubación como se indica. *A* y *a*, Control, células en la placa de cultivo sin material. *B* y *b*, Ti6Al4V, células incubadas con Ti6Al4V comercial. *C* y *c*, 78.8 %, células incubadas con cinta 78.8 % de fase vítrea. *D* y *d*, 79.8 %, células incubadas con cinta 79.8 % de fase vítrea. *E* y *e*, 82.6 %, células incubadas con cinta 82.6 % de fase vítrea. Microfotografías de tres experimentos independientes. Se tomaron cinco fotografías de cada experimento.

La biocompatibilidad de un material está directamente relacionada con la respuesta celular en contacto con la superficie del implante. La adhesión, diseminación y proliferación celular en la superficie del implante son eventos necesarios para la diferenciación del tejido óseo antes de la formación del tejido óseo [65]. A partir de un análisis de imagen en las micrografías, se obtuvo una cuantificación promedio de la densidad celular adherente para toda la placa de cultivo, el control Ti6Al4V y las diferentes cintas de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ , cuyos valores se indican en la Tabla 4.9; a partir de la cual se grafica el resultado obtenido como se muestra en la Figura 4.41.

**Tabla 4.9** Cuantificación promedio de la densidad celular adherente con células hDPSC.

<b>Aleación</b>	<b>Cinta con 78.8 % fase vítrea</b>	<b>Cinta con 79.8 % fase vítrea</b>	<b>Cinta con 82.6 % fase vítrea</b>	<b>Placa de cultivo</b>
<b>Ti6Al4V</b>	<b>39.02 %</b>	<b>49.11 %</b>	<b>44.90 %</b>	<b>82.15 %</b>



**Figura 4.41** Cuantificación de la adherencia celular. Los datos muestran el porcentaje de células adherentes cuantificadas mediante procesamiento de imágenes. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (n = 3) por triplicado. \* Significativamente diferente del control (prueba t de Student; P <0,05).

#### 4.7 Ensayo de viabilidad y proliferación celular in vitro

Los BMGs basados en Zr exhiben naturalmente una respuesta de no toxicidad debido a la formación de una capa de óxido en su superficie; por tal motivo, se optó por evaluar la citotoxicidad utilizando linfocitos T mediante un ensayo CCK-8, ya que este tipo de células tiene propiedades de crecimiento en suspensión, por lo que, aunque las cintas de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  tienen una fracción de fase cristalina, se consideró para este estudio no utilizar células con propiedades adherentes de crecimiento para obtener resultados independientes de las propiedades adherentes de las cintas.

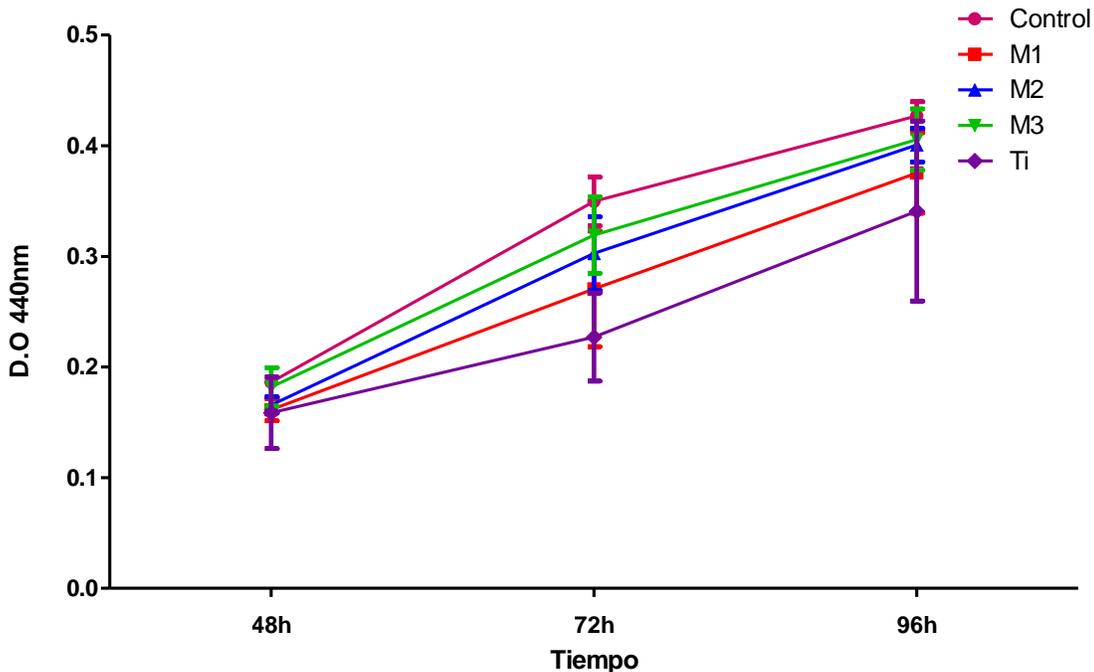
El ensayo CCK-8 permite realizar ensayos colorimétricos sensibles para determinar el número de células viables. WST-8 se reduce por deshidrogenasas en las células para dar un producto amarillo (formazán), soluble en el medio de cultivo. La cantidad de colorante formazán generada por la actividad de las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional al número de células vivas. La sensibilidad de detección de CCK-8 es mayor que la de otras sales de tetrazolio como MTT, XTT, MTS o WST-1 [86].

Se realizó una prueba preliminar comenzando con 50.000 células T por pozo utilizando una placa de 24 pozos (COSTAR, tapa de fondo plano de fijación ultrabaja con superficie de poliestireno no pirogénico); se utilizaron células T como control positivo y el medio de cultivo como control negativo. La Tabla 4.10 resume la media y la desviación estándar de 3 réplicas para cada muestra.

**Tabla 4.10** Medias y desviaciones estándar de las muestras utilizadas para la prueba de citotoxicidad.

Cinta de aleación	$\bar{X}$ (g)	SD (g)
$Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$		
78.8 % Fase vítrea	0.01160	0.00559
79.8 % Fase vítrea	0.00686	0.00049
82.6 % Fase vítrea	0.01723	0.00067
Ti6Al4V (Control)	0.23469	0.06265

En la Figura 4.42 se muestra el gráfico resultante de la prueba preliminar, donde, el eje X corresponde al tiempo de incubación y el eje Y a la densidad óptica (absorbancia a 440nm), que es directamente proporcional a la proliferación celular. Se observa que el comportamiento de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  es similar al control y presenta un aumento en la proliferación celular.



**Figura 4.42** Grafica de ensayo preliminar CCK-8 de proliferación celular durante 96 horas.

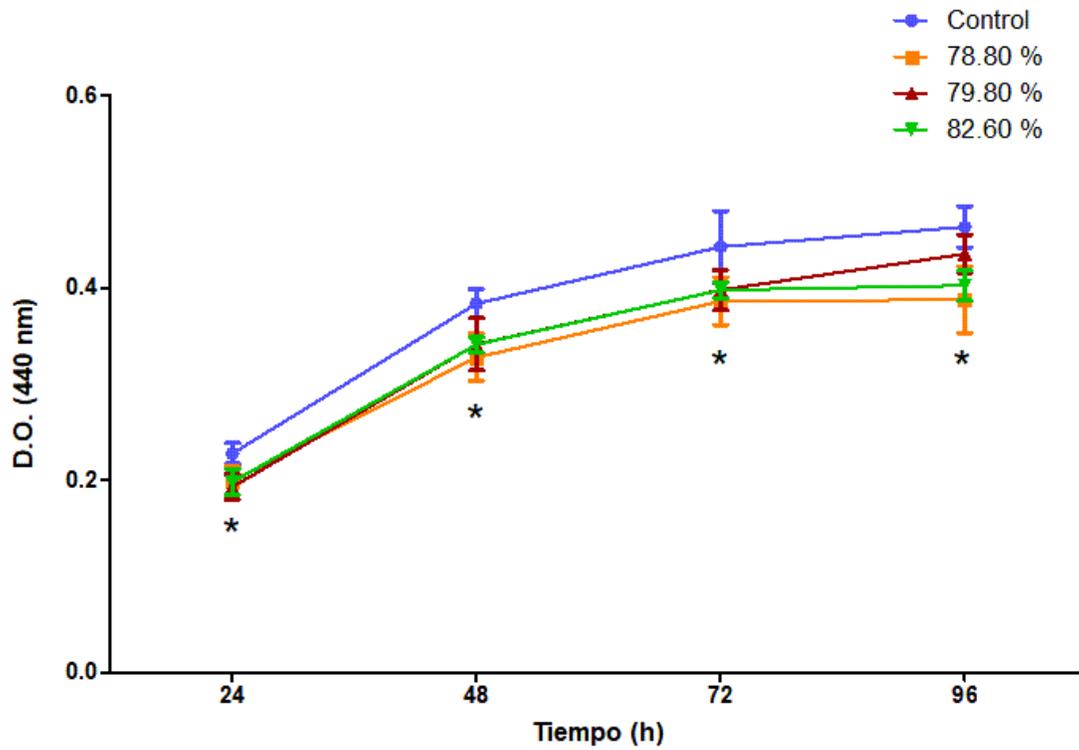
En esta prueba también se utilizó un control de Ti6Al4V el cual presenta en todos los casos menor proliferación respecto a la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  mostrando menor viabilidad. Como se mencionó anteriormente se ha reportado que las aleaciones vítreas base Zr son de naturaleza bioinerte a diferencia de las aleaciones de Ti que presentan una alta biocompatibilidad, sin embargo, en esta prueba se observa que las muestras de Ti6Al4V presentan una menor proliferación de células T resultando en una menor densidad óptica que la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ . El medio se mantuvo constante con valores al mínimo indicando que no ocurrió ningún comportamiento indeseado durante la prueba.

A partir de la prueba preliminar se lograron determinar los parámetros para una prueba posterior en la que se utilizaron 40.000 células T por pozo utilizando una placa de 24 pozos (COSTAR, tapa de fondo plano de fijación ultrabaja con superficie de poliestireno no pirogénico); se utilizaron células T como control positivo y el medio de cultivo como control negativo. La Tabla 4.11 resume la media y la desviación estándar de 6 réplicas para cada muestra de la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .

**Tabla 4.11** Medias y desviaciones estándar de las muestras utilizadas para la prueba de citotoxicidad.

<b>Cinta de aleación</b>	<b><math>\bar{X}</math> (g)</b>	<b>SD (g)</b>
<b>Zr<sub>58</sub>Co<sub>21</sub>Al<sub>9</sub>Ag<sub>12</sub></b>		
<b>78.8 % Fase vítrea</b>	0.03371	0.01019
<b>79.8 % Fase vítrea</b>	0.00862	0.00101
<b>82.6 % Fase vítrea</b>	0.01710	0.00074

El ensayo de proliferación se realizó utilizando seis réplicas para cada muestra. La Figura 4.43 muestra un gráfico donde el eje X corresponde al tiempo considerado y el eje Y a la densidad óptica (absorbancia a 440 nm); esto es directamente proporcional a la proliferación celular. Se observa que el comportamiento de la aleación Zr<sub>58</sub>Co<sub>21</sub>Al<sub>9</sub>Ag<sub>12</sub> es similar al control y muestra un aumento en la proliferación, esto como se esperaba ya que el tiempo de duplicación de las células utilizadas es de 24 horas, este comportamiento indica que las muestras no son tóxicas, permitiendo a las células proliferar a su ritmo regular. Las muestras de cintas con 78.8 % y 79.8 % de fase vítrea presentaron una densidad óptica menor a las 96 horas que la cinta con 82.6 % de fase vítrea.



**Figura 4.43** Ensayo de proliferación celular CCK-8. Los datos muestran la densidad óptica (D.O.) que fue proporcional a las células viables después de la incubación durante 24, 48, 72 y 96 h. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estandar ( $n = 3$ ). \* Significativamente diferente del control (prueba *pos hoc* de Bonferroni;  $P < 0,05$ ). Todos los grupos experimentales fueron estadísticamente significativos del control, excepto el grupo del 79.8% a las 96 h.

## CAPITULO V DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización estructural

#### 5.1.1 Difracción de rayos X (DRX)

Respecto a las cintas coladas los resultados indican que la disminución en el diámetro del crisol da como resultado una menor precipitación de fases cristalinas. Por lo tanto, se concluye que el diámetro de muestra crítico para la formación de la fase vítrea se encuentra entre 0.8 y 0.9 mm.

Se sabe que se puede producir un compuesto vítreo/cristalino cuando la velocidad de enfriamiento no es suficiente para la amorfización completa o la cantidad de impureza es demasiado alta. Desafortunadamente, el oxígeno disuelto también es un contaminante indeseable [74]. El aumento de la velocidad del disco muestra una menor precipitación de fase cristalina, de modo que la velocidad más adecuada para formación de fase vítrea en el presente sistema es de 10 m/s.

Las fases precipitadas podrían detectarse basándose en análisis de SEM y XRD. La fracción de fase cristalina fluctuó de 21.2 % a 17.4 %, La cual dependió de la velocidad de enfriamiento y del diámetro de la boquilla que permite un mayor o menor flujo de metal líquido, promoviendo la cristalización; el grado más alto de fase vítrea obtenido es 82.6 % con una velocidad tangencial del disco de enfriamiento de 10 m/s.

Una vez realizada la inmersión en SBF, las superficies de las cintas fueron nuevamente analizadas por difracción de rayos X para verificar las fases cristalinas. Utilizando la tarjeta (JCPDS No. 99-100-2294) de apatita  $\text{Ca}_5\text{P}_3\text{O}_{13}\text{H}_{2.82}$  se confirma la formación de apatita sobre la superficie de las cintas para todos los tiempos de inmersión en SBF en las tres cintas analizadas. Se sabe que un material capaz de formar apatita en su superficie en SBF puede unirse al hueso vivo a través de la capa de apatita formada en su superficie en el cuerpo vivo, siempre que el material no contenga ninguna sustancia que induzca reacciones tóxicas o de anticuerpos [79].

Se ha reportado que las superficies de los BMG basados en Zr son típicamente bioinertes, lo que implica una falta de unión directa entre el tejido y el implante hecho a partir de dichos materiales. Para aplicaciones tales como implantes ortopédicos, es altamente benéfico impartir bioactividad en los BMG para facilitar la unión biológica con los tejidos óseos. Un enfoque para resolver este problema es hacer un recubrimiento bioactivo en la superficie del metal [87, 88]. Los resultados

de difracción de rayos X muestran formación espontánea de la apatita ósea en SBF indicando que las cintas tiene un comportamiento bioactivo y no muestran del todo el comportamiento bioinerte típico de los sistemas de BMG basados en Zr.

Sin embargo, de acuerdo a ASTM G31-72, en muchos casos, la tasa de corrosión se establece por ganancia en lugar de pérdida de masa. Esto es, debido a que el producto de corrosión en metales reactivos como el caso de Zr es un óxido coherente que desafía la eliminación por medios químicos o mecánicos ordinarios [76]. Se ha reportado que los BMG basados en Zr poseen una capa pasiva de óxido natural ( $ZrO_2$ ), por lo que generalmente muestran una buena resistencia a la corrosión [84, 89]. La capa de  $ZrO_2$ , puede atraer los iones de calcio y fósforo en SBF, debido a un área superficial específica más alta y, en consecuencia, acelerar el proceso de deposición de apatita en la superficie de  $ZrO_2$  [77]. Liu y colaboradores [47] describen el proceso de corrosión de un BMG de  $Zr_{60.14}Cu_{22.31}Fe_{4.85}Al_{9.7}Ag_3$  cuando se pone en inmersión en solución SBF, los metales activos de Zr, Al, Fe, Cu en el BMG puede disolverse en la solución por disolución anódica, ocasionando la existencia de iones metálicos en la interfaz sólido-líquido. Estos iones metálicos reaccionan con el oxígeno disuelto en SBF para formar una capa de óxido de metal como una película pasiva depositada en la superficie de BMG. De manera que la formación de la capa de  $ZrO_2$  resulta benéfica en la bioactividad de las cintas.

En términos generales, la bioactividad del vidrio está estrictamente correlacionada con la tasa de crecimiento de hidroxiapatita en su superficie, tanto in vitro como in vivo. Aunque se ha demostrado que algunos materiales se unen al hueso sin formar una capa superficial similar a la apatita in vitro (resultados falsos negativos), la evaluación de la bioactividad in vitro se considera una prueba clave que debe realizarse siguiendo las recomendaciones estándar [85]. También se identificó la presencia de Ca y P, que podrían favorecer la precipitación de fosfatos, acelerando el proceso de deposición de apatita en la superficie [83].

### ***5.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)***

La composición química de las cintas no presentó una pérdida considerable de los elementos de aleación, como se muestra en la Tabla 4.2, de manera que considerando la sensibilidad que presentan los vidrios metálicos a diferentes factores entre ellos presencia de impurezas o parámetros de proceso [90], la precipitación de la fase cristalina se atribuye a una posible oxidación de los elementos puros relacionada con la naturaleza oxifílica del Zr y Al.

Una vez realizada la prueba de inmersión, en la Figura 6 se observa que la cinta con 78.8 % de fase vítrea mantiene una superficie lisa y libre de defectos, lo que indica que no hubo un efecto de corrosión, tanto en la parte central como en los bordes que al haber sido cortadas de una misma cinta se podría dar el caso de generar un punto de corrosión al interrumpir su continuidad, así como lo mencionan Sun y col. [48] la falta de homogeneidad dentro de la aleación BMG fundida podría conducir a imperfecciones localizadas en la película pasiva de la superficie de aleación y dar como resultado la posterior liberación localizada de iones. Además, se ha reportado que las películas pasivas que contienen  $ZrO_2$  se forman después de la anodización en un amplio rango de valores de pH, son muy estables en solución acuosa y generalmente muestran una buena resistencia a la corrosión [89, 91].

Se sabe que este tipo de aleaciones base Zr tienden a formar de manera natural una capa pasiva de óxido de  $ZrO_2$  [41, 84, 89] y que son susceptibles a la presencia de cloruros induciendo picadura y una disolución selectiva de la matriz vítrea, esta disolución selectiva se iniciará preferentemente a partir de los defectos en las superficies de la muestra, tales como las interfaces entre la matriz vítrea y las dendritas cristalinas [91], sobre la capa de  $ZrO_2$  interrumpiendo su continuidad, permitiendo la acumulación de iones cloruro, así como los cristales alargados observados en los análisis por EDS en los que se detectó la presencia de Cl y Na sin embargo la morfología de la superficie siempre era la misma, es decir los cristales alargados crecían a partir de las zonas más oscuras donde se está dando la acumulación de iones cloruro detectados al realizar un análisis químico; con el tiempo la capa pasiva de  $ZrO_2$  se estabiliza nuevamente; sin embargo, a partir de su interrupción y al continuar siendo expuesta la cinta al SBF comienza a atraer iones de calcio y fósforo dando lugar a la formación de apatita en la superficie de  $ZrO_2$ , debido a un área superficial específica más alta como lo mencionan Liu y colaboradores [77]. También se ha reportado que los vidrios metálicos base Zr son de naturaleza bioinerte [47, 87, 88] y no pueden formar un enlace bioactivo con el hueso vivo si se implantan en un sitio óseo, probablemente esta es la razón de que se localicen solamente pequeños dominios y no una estructura continua a lo largo de la superficie de las cintas debido a que su composición no es del todo vítrea.

La presencia de fases cristalinas puede ralentizar significativamente la velocidad de formación de la capa de hidroxiapatita sobre la superficie del vidrio; si la fracción cristalina está por debajo del 60 %, la hidroxiapatita se forma en menos de 20 h en la superficie del vidrio [85]. Como se puede observar en los resultados al ser la superficie completamente lisa, continua y libre de defectos, podría ser la razón de que la formación de apatita muestre indicios solamente. Además, se cree que una estructura porosa es benéfica para la migración celular, la adhesión y el crecimiento hacia dentro del nuevo tejido óseo cuando el implante se usa clínicamente [77]. Se han investigado algunos tratamientos superficiales, para hacer un recubrimiento bioactivo en la superficie del metal, como la pulverización de plasma, la deposición de vapor electroforética y química, la deposición de sol-gel y la de oxidación de microarco (MAO) de materiales biometálicos tradicionales. Entre estos métodos, MAO parece ser superior a los demás debido a la simplicidad de procesamiento y la fácil producción de capas bioactivas altamente porosas y adherentes. Utilizando esta técnica, se ha informado recientemente para un sistema de BMG base Zr que las capas de óxido porosas, rugosas y bien adheridas que incorporan algo de Ca y P se sintetizaron usando la técnica MAO en un electrolito que contiene Ca y P. Las capas de óxido exhibieron una biocompatibilidad mejorada con respecto a la BMG en colada [87, 88].

Usualmente, la bioactividad de un vidrio está estrictamente correlacionada con la velocidad de crecimiento de la capa de hidroxiapatita en su superficie, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo se ha demostrado que algunos materiales se unen al hueso sin formar una capa superficial similar a la apatita *in vitro* (resultados falsos negativos), la evaluación de la bioactividad *in vitro* se considera habitualmente una prueba clave que debe realizarse de acuerdo con las recomendaciones estándar [85]. Por lo que a pesar de que se observan indicios de formación de hidroxiapatita en la superficie de las cintas, ésta no se dio formando una capa continua debido a la naturaleza del sistema de superficie bioinerte, es decir de primera generación. Sin embargo, el sistema cumple con el requisito fundamental de bioactividad, no ocasionar ningún daño al huésped.

### **5.1.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

En las tres cintas se observó la presencia de  $ZrO_2$  y  $Al_2O_3$  de la fase cristalina detectada previamente por XRD. Se ha reportado que los BMG basadas en Zr poseen una capa pasiva de óxido natural ( $ZrO_2$ ), asociada con una excelente biocompatibilidad y resistencia a la corrosión en el entorno fisiológico [65, 92]. De manera que, es de esperar que este tipo de óxidos se formen en la superficie de las cintas considerando la naturaleza oxifílica de los elementos Zr y Al de la aleación.

## **5.2 Caracterización térmica**

### **5.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

El valor de  $\Delta T_x$  es diferente para diferentes vidrios y generalmente se toma como una indicación de la estabilidad térmica del vidrio producido. En BMGs, este rango de temperatura suele ser amplio y se han informado valores de más de 120 K; el más alto registrado hasta la fecha es 131 K en el BMG  $Pd_{43}Cu_{27}Ni_{10}P_{20}$ . En el caso de cintas vítreas delgadas de solidificación rápida y formadores de vidrio marginales, el valor de  $\Delta T_x$  es muy pequeño si se observa [93], como en este caso, para las cintas de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$ .

De acuerdo a Figueroa y col. [75], cuanto menor sea el subenfriamiento requerido, menor es la fuerza motriz para la cristalización y el tiempo permisible para que cualquier nucleante crezca y forme cristales ( $T_{rg}$  no tiene en cuenta la cinética de crecimiento de nucleación o factores extrínsecos como la nucleación heterogénea). Por lo tanto, cuanto más cerca esté el punto de congelación de una aleación a  $T_g$ , mejor será el GFA; es decir, debería ser mayor para una aleación eutéctica o casi eutéctica. Por lo tanto, para que una aleación tenga alguna posibilidad de formar un sólido vítreo, debe tener valores pequeños de  $T_l - T_g$ , que es la magnitud del subenfriamiento requerido para formar un sólido vítreo y evitar la cristalización.

Hua y col. [58] demostraron por medio de radiación de sincrotrón de alta energía por difracción de rayos X que al agregar Ag en la aleación Zr-Al-Co, los átomos de Ag formaban principalmente enlaces con átomos de Zr debido a la interacción del par Zr-Ag, que es muy atractivo, mientras que los enlaces Ag-Al y Co-Ag rara vez se pueden formar en la estructura; por lo tanto, hay un cambio notable en la estructura atómica localizada atribuido a la necesidad de un

empaquetamiento denso eficiente y a la afinidad química entre los átomos componentes causada por la adición de Ag.

Las tres reglas empíricas de Inoue que se utilizan comúnmente para explicar la mejora de la capacidad de formación de vidrio (GFA) por sustitución elemental. Primero, se trata del aumento en el número de componentes que es la clave para mejorar el GFA basado en el "principio de confusión" que establece que cuantos más elementos intervienen, menor es la probabilidad de que la aleación pueda seleccionar estructuras cristalinas viables, y es mayor la posibilidad de formación de vidrio. Además, Liu y col. [28] señaló que es importante introducir interacciones repulsivas entre átomos pequeños para favorecer la formación del vidrio, de lo contrario los átomos pequeños se difunden rápidamente, lo que da como resultado una baja temperatura de transición vítrea. Posteriormente, un desajuste de tamaño atómico ( $> 12\%$ ) y un calor de mezcla negativo significativo aumentan la densidad del empaquetamiento aleatorio local así como el GFA.

En la aleación Zr-Co-Al-Ag, los radios atómicos de los elementos componentes son Zr 0.16 nm, Co 0.125 nm, Al 0.143 nm y Ag, 0.145 nm, respectivamente; de modo que las relaciones de tamaño atómico son 1.28 para Zr/Co, 1,12 para Zr/Al, 1.10 para Zr/Ag, 1.16 para Ag/Co y 1.01 para Ag/Al. Por lo tanto, esta combinación de tamaños atómicos puede producir una estructura local empaquetada de manera eficiente, asociada con baja energía interna y alta viscosidad del líquido [5].

Además, este criterio también se cumple en la presente aleación porque los calores de mezcla para los pares Zr-Al, Zr-Co, Zr-Ag, Al-Co y Ag-Al son -44, -41, -20, -19 , -4 kJ/mol, respectivamente. Estos grandes valores negativos de calor de mezcla mejoran las interacciones entre los componentes y promueven el ordenamiento químico de corto alcance en líquidos, mejoran la eficiencia de la densidad de empaquetamiento aleatorio local y restringen la difusión de átomos a largo alcance [94]. Si bien la aleación presenta evidencias de una buena GFA, es importante identificar los parámetros óptimos de colada, como el diseño del crisol, la velocidad del disco de enfriamiento, la velocidad de fusión, entre otros, para obtener cintas completamente vítreas; considerando que la velocidad de enfriamiento es función tanto de la composición de la aleación como de los parámetros de colada utilizados.

## 5.4 Nanoindentación

Mecánicamente, la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  exhibió mayor dureza debido a su configuración atómica compacta y la presencia de elementos Zr y Al altamente oxifílicos en las cintas, produciendo óxidos de  $ZrO_2$  y  $Al_2O_3$  en la superficie. Estos óxidos metálicos tienen una dureza mucho mayor que la de la aleación base Zr, lo que contribuye a su excelente resistencia al desgaste [41]. Por otro lado, la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  presentó el módulo de Young de 42 GPa; este resultado es relativamente cercano al informado por Qiu y col. [30] para un BMG  $Zr_{60}Cu_{22.5}Pd_5Al_{7.5}Nb_5$ , que es aproximadamente un 50 % menor que el de TiAl6V4. Estos resultados son favorables para la aplicación propuesta, ya que un módulo elástico más bajo aliviará el efecto de protección contra la tensión entre el implante y los huesos humanos que normalmente tienen un módulo de Young promedio de 10-30 GPa característica importante para los implantes metálicos. Según la ley de Wolff, un dispositivo protésico con menor rigidez mejoraría las condiciones de carga del hueso circundante, evitando el adelgazamiento cortical u osteoporosis, mejorando la longevidad del implante [95].

## 5.5 Análisis de bioactividad

### 5.5.1 Ensayo de inmersión en fluido corporal simulado (SBF)

Los elementos de aleación y la microestructura influyen principalmente en la resistencia a la corrosión de las aleaciones. Debido a la formación de una película pasiva, enriquecida con  $Al_2O_3$  en soluciones corrosivas, el Ag es el elemento de aleación más eficaz para aumentar la resistencia a la corrosión [96]. Se ha sugerido que la adición de Ag aumenta drásticamente la cantidad de  $Al_2O_3$  en comparación con BMG sin Ag. Teniendo en cuenta que las principales características del  $Al_2O_3$  son la estructura compacta, densa y estable que ofrece una excelente protección más que otros óxidos, la Ag favorece la formación de una superficie protectora con una excelente estabilidad química [68].

También se detectó carbonato-hidroxiapatita, que es el objetivo de la prueba de inmersión. Se identificó la presencia de algunos fosfatos y óxidos de aluminio, que pueden provenir de la reacción de las cintas de aleación. Esto se atribuyó al hecho de que la capa de óxido de aluminio no era lo suficientemente gruesa, sufriendo corrosión por picaduras, en presencia de cloruros.

Este resultado indica que la superficie de las cintas no es lo suficientemente óptima para inducir la formación de apatita, aunque no es del todo bioinerte, considerando que contienen una fracción de fase cristalina. La presencia de óxidos tanto de aluminio como de circonio no permite la adhesión de fosfatos en la superficie de las cintas de manera constante para inducir la formación de una capa de apatita.

## **5.6 Liberación de iones metálicos**

El Zr existe en el cuerpo sólo 1000 ppb; en promedio, no juega un papel biológico natural en los seres humanos. La ingesta diaria de Zr es de aproximadamente 50.000 ppb. La exposición a corto plazo al polvo de circonio puede irritar y la inhalación de compuestos de circonio puede causar granulomas en la piel y los pulmones [97]. La concentración promedio medida de iones Zr durante 28 días de inmersión fue de 10.254 ppm (10,254 ppb). Esto se atribuyó principalmente al efecto de los iones cloruro en la solución que preferiblemente se absorbe por defectos químicos y físicos en la superficie de las cintas, especialmente en las interfaces vítreas de la fase cristalina-matriz. Se cree que las películas pasivas son muy susceptibles al ataque de los iones cloruro, ya que están muy distorsionadas en estas interfaces, lo que conduce a la disolución selectiva de la fase vítrea [91]. El Zr es un metal no tóxico debido a la falta de unión con biomoléculas, mostrando una buena biocompatibilidad [64]. El Al está relacionado con neurotoxicidad y demencia senil del tipo Alzheimer, solo en dosis muy altas, los iones Al pueden mostrar citotoxicidad cuando la concentración es superior a 900 ppb [98]. En este estudio, la concentración diaria promedio de iones de Al durante 28 días de inmersión fue de 0.407 ppm (407 ppb), menor que la concentración del oligoelemento en el cuerpo humano [99]. La plata es muy tóxica para organismos inferiores, por ejemplo: bacterias, virus, algas y hongos, pero no causa una alta toxicidad para los humanos. La plata no tiene funciones biológicas conocidas y sus posibles efectos en la salud son motivo de controversia [100, 101]; aunque el metal en sí mismo causa pocos problemas, las sales de plata irritan la piel y las membranas mucosas. No hay datos sobre la abundancia de Ag en el cuerpo humano [98]. La concentración promedio de iones Ag durante 28 días de inmersión fue de 0.099 ppm (99 ppb). El cobalto es un oligoelemento que se encuentra principalmente en la maduración de los glóbulos rojos humanos como componente de la vitamina B12 (cianocobalamina). Sin embargo, puede causar graves efectos adversos para la salud a altos niveles de exposición. En este estudio, no se detectó liberación de iones de Co para

ninguna de las cintas evaluadas, lo que es un efecto positivo para usos biomédicos, ya que se sabe que el Co es citotóxico; estudios in vivo demostraron que podría provocar daños en el ADN de las células de la mucosa oral [102]; su concentración dentro del cuerpo humano es de 20 ppb [98].

Los iones liberados de la aleación son principalmente Zr y están dentro del umbral aceptable en el cuerpo humano. Es importante observar que no ocurrió liberación de Co al ser un elemento bastante tóxico para el cuerpo humano, indicando que su presencia en la composición de las cintas se mantiene estable probablemente debido a su doble estructura FCC-HCP que le confiere resistencia; asimismo, la Ag y el Al se mantienen en valores bajos que son tolerables para el cuerpo humano, demostrando que las cintas presentan un comportamiento estable en cuanto a liberación de iones bajo inmersión en SBF. Sin embargo, la liberación iónica a largo plazo de los implantes BMG, como implantes dentales [103, 104], tornillos óseos [105], entre otros, en el cuerpo humano, sería un fenómeno dinámicamente estable, por lo que se requieren más estudios in vivo [106].

### **5.7 Ensayo de adherencia celular**

En la Figura 4.40 se observa que las células están adheridas, sin embargo las muestras de aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  presentan claramente una mayor concentración celular en comparación con la aleación comercial Ti6Al4V aunque se sabe que es un material con excelente biocompatibilidad [6, 107], las cuales fueron contabilizadas y se representan en la Figura 4.41 donde se identifica que existe una diferencia estadística significativa para la cinta con 78.8 % de fase vítrea, que tiene una adherencia superior. Como se puede observar en la Figura 4.43, a pesar de que las muestras presentan menor proliferación celular en comparación con el control, tienen un comportamiento bastante cercano entre ellas; esto puede deberse a que las células requieren un tiempo de adaptación cuando entran en contacto con la aleación.

Este comportamiento indica que la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  tiene alta adherencia y permite la proliferación celular, por lo tanto, buena biocompatibilidad por sí misma sin verse favorecida por la presencia de defectos superficiales, aunque se ha reportado que para los BMGs basadas en Zr, por su naturaleza bioinerte no pueden formar un enlace bioactivo con el hueso vivo después de que se implantan en sitios óseos [87]. De modo que típicamente, se requieren modificaciones superficiales para preparar un recubrimiento bioactivo en la superficie del BMG [108-110].

Liu y col. [87] modificaron la superficie de BMGs basados en Zr mediante el uso de la técnica de oxidación de microarco. Formando una capa de óxido porosa y rugosa que contenía principalmente  $ZrO_2$  tetragonal y  $SiO_2$  vítreo que incorporaba algo de Ca y P. Asimismo, Huang y col. [88] modificaron la superficie de un BMG basado en Zr empleando la técnica de implantación iónica de baja energía de iones Ar y Ca, lo que resultó en modificaciones simultáneas en la estructura atómica, la nanodureza, la química de la superficie y la adherencia celular. Por otro lado, Li y col. [102] fabricaron por anodización una capa de nanotubos de Ti altamente ordenada sobre la superficie de una BMG  $Zr_{56}Al_{16}Co_{28}$  demostrando una mejora en la bioactividad.

Por lo que el resultado obtenido en el presente trabajo se atribuye a que la porción de fase cristalina presente en las cintas está influyendo directamente en la respuesta bioactiva sin necesidad de modificar su superficie; propiamente, se observa un cambio de comportamiento en cuanto a la adherencia en composiciones de fase vítrea cercanas al 80%, indicando que cuanto mayor de 79 % sea se obtiene una respuesta menos favorable en la densidad celular adherente, efecto similar observado por Baino y col.[85] respecto a la presencia de fases cristalinas que pueden ralentizar significativamente la velocidad de formación de una capa de hidroxiapatita (HA) sobre la superficie del vidrio. Considerando la ausencia de defectos superficiales sobre las cintas es posible deducir que la alta adherencia del material se debe únicamente a la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  ya que incluso la respuesta de la cinta que presentó la menor densidad de adherencia celular es comparable con la muestra de control Ti6Al4V.

### **5.8 Ensayo de viabilidad y proliferación celular in vitro**

El comportamiento observado en los resultados se atribuye a la presencia de una mayor proporción de fase vítrea, la cual, al tener menor presencia de fases cristalinas, ofrece una superficie más adecuada debido a la falta de interacción al ser mayormente bioinerte, permitiendo la proliferación celular. El medio se mantuvo constante con valores al mínimo, lo que indica que no se produjo ningún comportamiento no deseado durante la prueba.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Li y col. [64] que evaluó la biocompatibilidad del vidrio metálico  $Zr_{61}Ti_2Cu_{25}Al_{12}$  utilizando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) mediante evaluación morfológica celular por microscopía electrónica de barrido (MEB) junto con su viabilidad celular a través de ensayos CCK-8, demostrando que presenta

biocompatibilidad tan buena como la del Ti comercialmente puro a corto plazo, razón por la cual se pudiera proponer como un buen candidato para implantes dentales. En otra investigación, Li y col. [65] evaluaron la biocompatibilidad del vidrio metálico  $Zr_{61}Ti_2Cu_{25}Al_{12}$  usando tres cintas de líneas celulares, fibroblastos L929, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células MG63 similares a osteoblastos; obteniendo una respuesta celular comparable al Ti y sus aleaciones, sugiriendo una buena biocompatibilidad del BMG asociada a la formación de una capa de óxido de circonio en la superficie y buena resistencia a la corrosión en el ambiente fisiológico. Por otro lado, Liu y col. [111] estudiaron la biocompatibilidad de tres BMG a base de Zr libres de Ni, obteniendo citotoxicidad y viabilidad celular comparables a la aleación Ti6Al4V. Del mismo modo, Guan y col. [43] reportaron que para un vidrio metálico ZrAlCoNb con diferentes contenidos de Nb, la viabilidad celular mejora con el aumento del contenido de Nb.

## CAPITULO VI CONCLUSIONES

La aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  solamente tenía una capacidad parcial de formación de vidrio; sin embargo, es importante identificar los parámetros óptimos de colada para obtener cintas completamente vítreas.

La fracción de fase cristalina en las cintas parece ejercer un comportamiento favorable con respecto a los resultados obtenidos a través de la caracterización, mostrando buena biocompatibilidad; a partir del ensayo de inmersión en SBF, se observó que prevalece la naturaleza bioinerte de la superficie de las cintas a pesar de tener una fracción de fases cristalinas, que permiten áreas donde la atracción de elementos puede inducir que ocurra la formación de apatita.

Es fundamental señalar que la liberación de iones muestra que todos los elementos encontrados no superan los niveles que representan toxicidad para el cuerpo humano, resultado crítico especialmente en el caso de Al y Co presentes en la aleación.

La aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  no presenta citotoxicidad y permite la proliferación de linfocitos T, demostrando buena biocompatibilidad para su uso potencial en aplicaciones biomédicas ya que cumple con el requisito fundamental de biocompatibilidad, no ocasionar ningún daño al huésped. En este sentido, los resultados son consistentes en que la aleación  $Zr_{58}Co_{21}Al_9Ag_{12}$  tiene propiedades de alta adherencia celular, citocompatibilidad y proliferación celular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] LIU Y H, WANG G, WANG R J, ZHAO D Q, PAN M X and WANG W H. Super Plastic Bulk Metallic Glasses at Room Temperature. *Science*. 315(5817), 1385-1388. 2007. [10.1126/science.1136726](https://doi.org/10.1126/science.1136726).
- [2] YAVARI A R, LEWANDOWSKI J and ECKERT J. Mechanical properties of bulk metallic glasses. *Mrs Bulletin*. 32(8), 635-638. 2007. <https://doi.org/10.1557/mrs2007.125>.
- [3] WU Y, WANG H, WU H H, ZHANG Z Y, HUI X D, CHEN G L, MA D, WANG X L and LU Z P. Formation of Cu–Zr–Al bulk metallic glass composites with improved tensile properties. *Acta Materialia*. 59(8), 2928-2936. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2011.01.029>.
- [4] ECKERT J, DAS J, PAULY S and DUHAMEL C. Mechanical properties of bulk metallic glasses and composites. *Journal of Materials Research*. 22(2), 285-301. 2007. DOI: 10.1557/jmr.2007.0050.
- [5] ZHANG W, ZHANG Q, QIN C and INOUE A. Synthesis and properties of Cu–Zr–Ag–Al glassy alloys with high glass-forming ability. *Materials Science and Engineering: B*. 148(1), 92-96. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2007.09.064>.
- [6] IBRAHIM M Z, SARHAN A A D, YUSUF F and HAMDY M. Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. *Journal of Alloys and Compounds*. 714(636-667). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.04.231>.
- [7] PIMIENTO S B, R J I B and V I A F. *Vidrios Metálicos*. EAE: 2011.
- [8] SURYANARAYANA C and INOUE A. *Bulk Metallic Glasses*. CRC Press: 2011.
- [9] KALPAKJIAN S and SCHMID S R. *Manufactura, ingeniería y tecnología*. Pearson Educación: 2002.
- [10] COLUMBRÍ F J M. *Materiales y procesos avanzados: materiales de alta tecnología*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas: 1993.
- [11] MILLER M K and LIAW P. *Bulk Metallic Glasses: An Overview*. Springer US: 2007.
- [12] PETRZHNIK M, MOLOKANOV V and LEVASHOV E. On conditions of bulk and surface glass formation of metallic alloys. *Journal of Alloys and Compounds*. 707(68-72). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.12.293>.
- [13] MOYA J A. *Vidrios Metálicos y Aleaciones Nanocristalinas: Nuevos Materiales de Estructura Avanzada*. Cuadernos de Facultad. 4), 2009.
- [14] TELFORD M. The case for bulk metallic glass. *Materials Today*. 7(3), 36-43. 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00124-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00124-5).
- [15] MARTA L, LAVORATO G, BEREJNOI C, BERNAL C and MOYA J. *Vidrios Metálicos Masivos*. Cuadernos de Facultad. 5(2010).
- [16] DONG B-S, ZHOU S-X, LI D-R, LU C-W, GUO F, NI X-J and LU Z-C. A new criterion for predicting glass forming ability of bulk metallic glasses and some critical discussions. *Progress in Natural Science: Materials International*. 21(2), 164-172. 2011. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0071\(12\)60051-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0071(12)60051-3).
- [17] UMETSU R Y, TU R and GOTO T. Thermal and Electrical Transport Properties of Zr-Based Bulk Metallic Glassy Alloys with High Glass-Forming Ability. *MATERIALS TRANSACTIONS*. 53(10), 1721-1725. 2012. [10.2320/matertrans.M2012163](https://doi.org/10.2320/matertrans.M2012163).
- [18] WANG W-H, DONG C and SHEK C. Bulk metallic glasses. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 44(2-3), 45-89. 2004.
- [19] ELKAN S. *Los vidrios metálicos y su aplicación en la aeronáutica*. Ingeniería Técnica Aeronáutica, Universitat Politècnica de Catalunya, 2009.
- [20] KAMAL M and MOHAMMAD U S. *A Review: Chill-Block Melt Spin Technique, Theories & Applications*. Bentham Science Publishers: 2013.
- [21] RUSSEW K and STOJANOVA L. *Glassy Metals*. Springer Berlin Heidelberg: 2016.

- [22] PRAISNER T J, CHEN J S J and TSENG A A. An experimental study of process behavior in planar flow melt spinning. *Metallurgical and Materials Transactions B*. 26(1), 1199-1208. 1995. 10.1007/bf02654005.
- [23] SOWJANYA M and KISHEN KUMAR REDDY T. Cooling wheel features and amorphous ribbon formation during planar flow melt spinning process. *Journal of Materials Processing Technology*. 214(9), 1861-1870. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2014.04.004>.
- [24] JECH R W, MOORE T J, GLASGOW T K and ORTH N W. Rapid Solidification Via Melt Spinning: Equipment and Techniques. *JOM*. 36(4), 41-45. 1984. 10.1007/bf03338425.
- [25] TREXLER M M and THADHANI N N. Mechanical properties of bulk metallic glasses. *Progress in Materials Science*. 55(8), 759-839. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2010.04.002>.
- [26] DOI M, SUGIYAMA K, TONO T and IMURA T. Proceedings of the Fourth International Conference on Rapidly Quenched Metals. 1349. 1982.
- [27] SCHUH C A, HUFNAGEL T C and RAMAMURTY U. Mechanical behavior of amorphous alloys. *Acta Materialia*. 55(12), 4067-4109. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2007.01.052>.
- [28] LIU Z, CHAN K C and LIU L. Enhanced glass forming ability and plasticity of a Ni-free Zr-based bulk metallic glass. *Journal of Alloys and Compounds*. 487(1), 152-156. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.08.030>.
- [29] SCHROERS J, KUMAR G, HODGES T M, CHAN S and KYRIAKIDES T R. Bulk metallic glasses for biomedical applications. *JOM*. 61(9), 21-29. 2009. 10.1007/s11837-009-0128-1.
- [30] QIU C L, CHEN Q, LIU L, CHAN K C, ZHOU J X, CHEN P P and ZHANG S M. A novel Ni-free Zr-based bulk metallic glass with enhanced plasticity and good biocompatibility. *Scripta Materialia*. 55(7), 605-608. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2006.06.018>.
- [31] QIN F, YOSHIMURA M, WANG X, ZHU S, KAWASHIMA A, ASAMI K and INOUE A. Corrosion Behavior of a Ti-Based Bulk Metallic Glass and Its Crystalline Alloys. *Materials transactions*. 48(7), 1855-1858. 2007. 10.2320/matertrans.MJ200713.
- [32] OAK J-J, LOUZGUINE-LUZGIN D V and INOUE A. Fabrication of Ni-free Ti-based bulk-metallic glassy alloy having potential for application as biomaterial, and investigation of its mechanical properties, corrosion, and crystallization behavior. *Journal of Materials Research*. 22(5), 1346-1353. 2007. DOI: 10.1557/jmr.2007.0154.
- [33] WANG Y B, LI H F, CHENG Y, WEI S C and ZHENG Y F. Corrosion performances of a Nickel-free Fe-based bulk metallic glass in simulated body fluids. *Electrochemistry Communications*. 11(11), 2187-2190. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.09.027>.
- [34] LI S, WEI Q, LI Q, JIANG B, CHEN Y and SUN Y. Development of Fe-based bulk metallic glasses as potential biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*. 52(235-241). 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.041>.
- [35] GU X, ZHENG Y, ZHONG S, XI T, WANG J and WANG W. Corrosion of, and cellular responses to Mg-Zn-Ca bulk metallic glasses. *Biomaterials*. 31(6), 1093-1103. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.015>.
- [36] ZBERG B, UGGOWITZER P J and LÖFFLER J F. MgZnCa glasses without clinically observable hydrogen evolution for biodegradable implants. *Nature Materials*. 8(887). 2009. 10.1038/nmat2542.
- [37] ZHANG J and ZHAO Y. Formation of zirconium metallic glass. *Nature*. 430(6997), 332-335. 2004. [http://www.nature.com/nature/journal/v430/n6997/supinfo/nature02715\\_S1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v430/n6997/supinfo/nature02715_S1.html).
- [38] HUA N, ZHENG Z, FANG H, YE X, LIN C, LI G, WANG W, CHEN W and ZHANG T. Dry and lubricated tribological behavior of a Ni- and Cu-free Zr-based bulk metallic glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 426(Supplement C), 63-71. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.06.026>.

- [39] CHU J-H, LEE J, CHANG C-C, CHAN Y-C, LIOU M-L, LEE J-W, JANG J S-C and DUH J-G. Antimicrobial characteristics in Cu-containing Zr-based thin film metallic glass. *Surface and Coatings Technology*. 259(87-93). 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.05.019>.
- [40] LI H F and ZHENG Y F. Recent advances in bulk metallic glasses for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 36(1-20). 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.047>.
- [41] HUA N, CHEN W, WANG W, LU H, YE X, LI G, LIN C and HUANG X. Tribological behavior of a Ni-free Zr-based bulk metallic glass with potential for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 66(Supplement C), 268-277. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.078>.
- [42] WANG Y, ZHENG Y, WEI S and LI M. In vitro study on Zr-based bulk metallic glasses as potential biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 96(1), 34-46. 2011. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31725>.
- [43] GUAN B, SHI X, DAN Z, XIE G, NIINOMI M and QIN F. Corrosion behavior, mechanical properties and cell cytotoxicity of Zr-based bulk metallic glasses. *Intermetallics*. 72(69-75). 2016. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2016.02.001>.
- [44] BUZZI S, JIN K, UGGOWITZER P J, TOSATTI S, GERBER I and LÖFFLER J F. Cytotoxicity of Zr-based bulk metallic glasses. *Intermetallics*. 14(7), 729-734. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2005.11.003>.
- [45] HUANG H-H, SUN Y-S, WU C-P, LIU C-F, LIAW P K and KAI W. Corrosion resistance and biocompatibility of Ni-free Zr-based bulk metallic glass for biomedical applications. *Intermetallics*. 30(139-143). 2012. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2012.03.015>.
- [46] HUA N, LIAO Z, CHEN W, HUANG Y and ZHANG T. Effects of noble elements on the glass-forming ability, mechanical property, electrochemical behavior and tribocorrosion resistance of Ni- and Cu-free Zr-Al-Co bulk metallic glass. *Journal of Alloys and Compounds*. 725(Supplement C), 403-414. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.07.167>.
- [47] LIU Y, WANG Y-M, PANG H-F, ZHAO Q and LIU L. A Ni-free ZrCuFeAlAg bulk metallic glass with potential for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 9(6), 7043-7053. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.019>.
- [48] SUN Y-S, ZHANG W, KAI W, LIAW P K and HUANG H-H. Evaluation of Ni-free Zr–Cu–Fe–Al bulk metallic glass for biomedical implant applications. *Journal of Alloys and Compounds*. 586(S539-S543). 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.01.028>.
- [49] ZHANG Y, ZHOU M, ZHAO X and MA L. Co substituted Zr-Cu-Al-Ni metallic glasses with enhanced glass-forming ability and high plasticity. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 473(Supplement C), 120-124. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.08.001>.
- [50] YOKOYAMA Y, FUJITA K, YAVARI A R and INOUE A. Malleable hypoeutectic Zr–Ni–Cu–Al bulk glassy alloys with tensile plastic elongation at room temperature. *Philosophical Magazine Letters*. 89(5), 322-334. 2009. 10.1080/09500830902873575.
- [51] PAN J, CHAN K C, CHEN Q and LIU L. Enhanced plasticity by introducing icosahedral medium-range order in ZrCuNiAl metallic glass. *Intermetallics*. 24(79-83). 2012. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2012.01.006>.
- [52] JASSIM A K and HAMMOOD A S. Single Roll Melt Spinning Technique Applied as a Sustainable Forming Process to Produce Very Thin Ribbons of 5052 and 5083 Al-Mg Alloys Directly from Liquid State. *Procedia CIRP*. 40(133-137). 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procir.2016.01.079>.
- [53] NEAMȚU B V, CHICINAȘ H F, ABABEI G, GABOR M, MARINCA T F, LUPU N and CHICINAȘ I. A comparative study of the Fe-based amorphous alloy prepared by mechanical alloying and rapid quenching. *Journal of Alloys and Compounds*. 703(19-25). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.01.359>.

- [54] LI W, BEI H and GAO Y. Effects of geometric factors and shear band patterns on notch sensitivity in bulk metallic glasses. *Intermetallics*. 79(12-19). 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intermet.2016.09.001>.
- [55] JIANG M Q, WILDE G and DAI L H. Shear band dilatation in amorphous alloys. *Scripta Materialia*. 127(54-57). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2016.08.038>.
- [56] TORRES R and VERDUZCO J A. Optimal Parameters to Obtain Ultra-High-Strength Fe-Based Amorphous Alloy Wires. *Materials and Manufacturing Processes*. 18(1), 79-92. 2003. 10.1081/amp-120017590.
- [57] DÉO L P, MENDES M A B, COSTA A M S, CAMPOS NETO N D and DE OLIVEIRA M F. Applying a new criterion to predict glass forming alloys in the Zr–Ni–Cu ternary system. *Journal of Alloys and Compounds*. 553(212-215). 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2012.11.123>.
- [58] HUA N and ZHANG T. Glass-forming ability, crystallization kinetics, mechanical property, and corrosion behavior of Zr–Al–Ni–Ag glassy alloys. *Journal of Alloys and Compounds*. 602(339-345). 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.03.015>.
- [59] WANG P-C, LEE J-W, YANG Y-C and LOU B-S. Effects of silicon contents on the characteristics of Zr–Ti–Si–W thin film metallic glasses. *Thin Solid Films*. 618(28-35). 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2016.03.043>.
- [60] DENG Y-L, LEE J-W, LOU B-S, DUH J-G, CHU J P and JANG J S-C. The fabrication and property evaluation of Zr–Ti–B–Si thin film metallic glass materials. *Surface and Coatings Technology*. 259(115-122). 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.03.026>.
- [61] ZEMAN P, ZÍTEK M, ZUZJAKOVÁ Š and ČERSTVÝ R. Amorphous Zr-Cu thin-film alloys with metallic glass behavior. *Journal of Alloys and Compounds*. 696(1298-1306). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.12.098>.
- [62] LOU B-S, YANG Y-C, LEE J-W and CHEN L-T. Biocompatibility and mechanical property evaluation of Zr-Ti-Fe based ternary thin film metallic glasses. *Surface and Coatings Technology*. 320(512-519). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.11.039>.
- [63] LI T H, WONG P C, CHANG S F, TSAI P H, JANG J S C and HUANG J C. Biocompatibility study on Ni-free Ti-based and Zr-based bulk metallic glasses. *Materials Science and Engineering: C*. 75(1-6). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.006>.
- [64] LI J and AI H-J. The responses of endothelial cells to Zr<sub>61</sub>Ti<sub>2</sub>Cu<sub>25</sub>Al<sub>12</sub> metallic glass in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering: C*. 40(189-196). 2014. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.051>.
- [65] LI J, SHI L-L, ZHU Z-D, HE Q, AI H-J and XU J. Zr<sub>61</sub>Ti<sub>2</sub>Cu<sub>25</sub>Al<sub>12</sub> metallic glass for potential use in dental implants: Biocompatibility assessment by in vitro cellular responses. *Materials Science and Engineering: C*. 33(4), 2113-2121. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.033>.
- [66] OAK J-J and INOUE A. Attempt to develop Ti-based amorphous alloys for biomaterials. *Materials Science and Engineering: A*. 449(220-224). 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msea.2006.02.307>.
- [67] NAGASE T, KINOSHITA K, NAKANO T and UMAKOSHI Y. Fabrication of Ti-Zr binary metallic wire by arc-melt-type melt-extraction method. *Materials transactions*. 50(4), 872-878. 2009.
- [68] SUN Y, HUANG Y, FAN H, WANG Y, NING Z, LIU F, FENG D, JIN X, SHEN J, SUN J and CHEN J J J. In vitro and in vivo biocompatibility of an Ag-bearing Zr-based bulk metallic glass for potential medical use. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 419(82-91). 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.03.039>.
- [69] GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY P G and SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(25), 13625-13630. 2000. 10.1073/pnas.240309797.

- [70] HUANG M, HILL R G and RAWLINSON S C F. Strontium (Sr) elicits odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs): A therapeutic role for Sr in dentine repair? *Acta Biomaterialia*. 38(201-211). 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.037>.
- [71] BIANCHI M, PISCIOTTA A, BERTONI L, BERNI M, GAMBARDELLA A, VISANI A, RUSSO A, DE POL A and CARNEVALE G. Osteogenic Differentiation of hDPSCs on Biogenic Bone Apatite Thin Films. *Stem Cells International*. 2017(3579283). 2017. 10.1155/2017/3579283.
- [72] XU B, YUAN F-Z, LIN L, YE J, FAN B-S, ZHANG J-Y, YANG M, JIANG D, JIANG W-B and WANG X. The higher inherent therapeutic potential of Biomaterial-based hDPSCs and hEnSCs for pancreas diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8(636). 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00636>.
- [73] CAI G, SUN K, WANG T, ZOU H, GU J, YUAN Y, LIU X, LIU Z and BIAN J. Mechanism and effects of Zearalenone on mouse T lymphocytes activation in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 162(208-217). 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.055>.
- [74] CZEL G, TOMOLYA K, SVEDA M, SYCHEVA A, KRISTALY F, ROOSZ A and JANOVSZKY D. Synthesis and characterization of Zr-based in situ crystal precipitated and liquid phase separated bulk metallic glass composite. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 458(Supplement C), 41-51. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2016.12.017>.
- [75] FIGUEROA I A, CARROLL, P.A., DAVIES, H.A. ET AL. (2 MORE AUTHORS). Preparation of Cu-based bulk metallic glasses by suction casting. SP07 Proceedings of the 5th Decennial International Conference on Solidification Processing. Department of Engineering Materials, University of Sheffield. , Sheffield. 479-482. 2007.
- [76] ASTM-G31-72. Standard Practice for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals. ASTM International. 2004.
- [77] LIU L, CHAN K C, YU Y and CHEN Q. Bio-activation of Ni-free Zr-based bulk metallic glass by surface modification. *Intermetallics*. 18(10), 1978-1982. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2010.02.039>.
- [78] ZHANG X, YUAN G, NIU J, FU P and DING W. Microstructure, mechanical properties, biocorrosion behavior, and cytotoxicity of as-extruded Mg–Nd–Zn–Zr alloy with different extrusion ratios. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 9(153-162). 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.002>.
- [79] KOKUBO T and TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 27(15), 2907-2915. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [80] GARCÍA CONTRERAS RENE A T L S, ARENAS ARROCENA MA. CONCEPCIÓN, NUÑEZ ANITA ROSA ELVIRA. Enseñanza practica del aislamiento, cultivo y caracterización de celulas madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII), Área de Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, UNAM., Mexico, Leon, Gto. 2019.
- [81] FRANKEN N A, RODERMOND H M, STAP J, HAVEMAN J and VAN BREE C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 1(5), 2315-2319. 2006.
- [82] ZEMAN P, ZÍTEK M, ZUZJAKOVÁ Š and ČERSTVÝ R. Amorphous Zr-Cu thin-film alloys with metallic glass behavior. *Journal of Alloys and Compounds*. 696(Supplement C), 1298-1306. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.12.098>.
- [83] KIM H-M, HIMENO T, KOKUBO T and NAKAMURA T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials*. 26(21), 4366-4373. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.022>.
- [84] ZHAO G-H, AUNE R E, MAO H and ESPALLARGAS N. Degradation of Zr-based bulk metallic glasses used in load-bearing implants: A tribocorrosion appraisal. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 60(56-67). 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.12.024>.

- [85] BAINO F. Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine. *Ceramics International*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.05.180>.
- [86] Cell Counting Kit-8. Website: [www.dojindo.com](http://www.dojindo.com) (last accessed 6th July 2019).
- [87] LIU L, LIU Z, CHAN K C, LUO H H, CAI Q Z and ZHANG S M. Surface modification and biocompatibility of Ni-free Zr-based bulk metallic glass. *Scripta Materialia*. 58(3), 231-234. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2007.09.040>.
- [88] HUANG L, ZHU C, MUNTELE C I, ZHANG T, LIAW P K and HE W. Surface engineering of a Zr-based bulk metallic glass with low energy Ar- or Ca-ion implantation. *Materials Science and Engineering: C*. 47(248-255). 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.009>.
- [89] WANG Y, ZHENG Y, WEI S and LI M. In vitro study on Zr-based bulk metallic glasses as potential biomaterials. 2011.
- [90] BŁYSKUN P, MAJ P, KOWALCZYK M, LATUCH J and KULIK T. Relation of various GFA indicators to the critical diameter of Zr-based BMGs. *Journal of Alloys and Compounds*. 625(Supplement C), 13-17. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.11.112>.
- [91] TIAN H F, QIAO J W, YANG H J, WANG Y S, LIAW P K and LAN A D. The corrosion behavior of in-situ Zr-based metallic glass matrix composites in different corrosive media. *Applied Surface Science*. 363(37-43). 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.11.243>.
- [92] WANG Y, ZHENG Y, WEI S and LI M. In vitro study on Zr-based bulk metallic glasses as potential biomaterials. 96(34-46). 2011. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31725>.
- [93] SURYANARAYANA C and INOUE A. *Bulk Metallic Glasses*, Second Edition. CRC Press: 2017.
- [94] INOUE A. Stabilization of metallic supercooled liquid and bulk amorphous alloys. *Acta Materialia*. 48(1), 279-306. 2000. [https://doi.org/10.1016/S1359-6454\(99\)00300-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(99)00300-6).
- [95] RUFF C, HOLT B and TRINKAUS E. Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*. 129(4), 484-498. 2006. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20371>.
- [96] ZHANG C, LI N, PAN J, GUO S F, ZHANG M and LIU L. Enhancement of glass-forming ability and bio-corrosion resistance of Zr–Co–Al bulk metallic glasses by the addition of Ag. *Journal of Alloys and Compounds*. 504(S163-S167). 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2010.02.078>.
- [97] MCCLINTON L and SCHUBERT J. The toxicity of some zirconium and thorium salts in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 94(1), 1-6. 1948.
- [98] WebElements, <https://www.webelements.com> (last accessed 7th January 2019) [en linea].
- [99] SORENSON J R, CAMPBELL I R, TEPPER L B and LINGG R D. Aluminum in the environment and human health. *Environmental Health Perspectives*. 8(3-95). 1974. <https://doi.org/10.1289/ehp.7483>.
- [100] CALL D J, POLKINGHORNE C N, MARKEE T P, BROOKE L T, GEIGER D L, GORSUCH J W and ROBILLARD K A. Toxicity of silver in water and sediment to the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 25(7), 1802-1808. 2006. <https://doi.org/10.1897/05-319R.1>.
- [101] GORSUCH J and KLAINE S. Toxicity and fate of silver in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 17(4), 537-538. 1998. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170403>.
- [102] LI X, XU H, JIN Y and ZHANG T. Fabrication of highly ordered nanotube layer on Zr-based bulk metallic glass for biomedical uses. *Materials Letters*. 200(63-66). 2017. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.04.095>.
- [103] MOHEDANO M, MATYKINA E, ARRABAL R, PARDO A and MERINO M C. Metal release from ceramic coatings for dental implants. *Dental Materials*. 30(3), e28-e40. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.12.011>.

- [104] MORAIS L S, SERRA G G, MULLER C A, ANDRADE L R, PALERMO E F A, ELIAS C N and MEYERS M. Titanium alloy mini-implants for orthodontic anchorage: Immediate loading and metal ion release. *Acta Biomaterialia*. 3(3), 331-339. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.10.010>.
- [105] HANAWA T. Metal ion release from metal implants. *Materials Science and Engineering: C*. 24(6), 745-752. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2004.08.018>.
- [106] QIU C, LIU L, SUN M and ZHANG S. The effect of Nb addition on mechanical properties, corrosion behavior, and metal-ion release of ZrAlCuNi bulk metallic glasses in artificial body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 75(4), 950-956. 2005. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30502>.
- [107] HUA N, HUANG L, WANG J, CAO Y, HE W, PANG S and ZHANG T. Corrosion behavior and in vitro biocompatibility of Zr–Al–Co–Ag bulk metallic glasses: An experimental case study. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 358(12), 1599-1604. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2012.04.022>.
- [108] YU C-C, CHU J P, LEE C-M, DIYATMIKA W, CHANG M H, JENG J-Y and YOKOYAMA Y. Bending property enhancements of Zr<sub>55</sub>Cu<sub>30</sub>Al<sub>10</sub>Ni<sub>5</sub> bulk metallic glass: Effects of various surface modifications. *Materials Science and Engineering: A*. 633(69-75). 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2015.03.016>.
- [109] NIEH T G, YANG Y, LU J and LIU C T. Effect of surface modifications on shear banding and plasticity in metallic glasses: An overview. *Progress in Natural Science: Materials International*. 22(5), 355-363. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2012.09.006>.
- [110] BLANQUER A, HYNOWSKA A, NOGUÉS C, IBÁÑEZ E, SORT J, BARÓ M D, ÖZKALE B, PANÉ S, PELLICER E and BARRIOS L. Effect of surface modifications of Ti<sub>40</sub>Zr<sub>10</sub>Cu<sub>38</sub>Pd<sub>12</sub> bulk metallic glass and Ti-6Al-4V alloy on human osteoblasts in vitro biocompatibility. *Plos one*. 11(5), e0156644. 2016.
- [111] LIU L, QIU C L, HUANG C Y, YU Y, HUANG H and ZHANG S M. Biocompatibility of Ni-free Zr-based bulk metallic glasses. *Intermetallics*. 17(4), 235-240. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2008.07.022>.