



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES
ELECTROACTIVOS PARA SOPORTE DE CRECIMIENTO NEURONAL**

Ana Milena Cruz Rodríguez

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Ciencia de Materiales

Directora: Prof. Nieves Casañ Pastor

Tutor: Dr. Josep Peral

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS



JULIO DE 2010



Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Campus de la UAB
08193 Bellaterra (Barcelona)

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Química
08193 Bellaterra (Barcelona)

Nieves Casañ Pastor,
Profesora de Investigación del CSIC en el
Institut de Ciència de Materials de Barcelona (CSIC)

Certifica:

Que **Ana Milena Cruz Rodríguez**, Ingeniera Física, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título “Obtención y Caracterización de Materiales Electroactivos para Soporte de Crecimiento Neuronal”, el cual se presenta en esta memoria para optar al grado de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Bellaterra, julio de 2010

A mi madre, mi esposo y mis hermanos

“Para alcanzar el éxito no es necesario hacer cosas extraordinarias. Hay que hacer cosas ordinarias, extraordinariamente bien”

(Anónimo)

AGRADECIMIENTOS

Al culminar este trabajo de investigación me gustaría dar un especial agradecimiento a:

Mi familia conformada por mi esposo José Eduardo, mi madre Mery y mis hermanos Juan Manuel, Ximena y Adriana, que estando cerca o lejos siempre me han dado su apoyo y cariño, son una parte muy importante de mi vida y sin ellos no hubiera logrado ser lo que soy y cumplir todas las metas que me he propuesto.

Mi directora en este trabajo la Dra. Nieves Casañ Pastor por haberme abierto las puertas del Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona por todo su apoyo y por haberme guiado en muchos aspectos en los inicios de mi carrera profesional y científica.

El “Equipo BIO”, Javi, Nina, Carme y Libertad, por ser un apoyo constante en el desarrollo de mi trabajo compartiendo sus conocimientos y experiencias y por entrar junto conmigo en un mundo nuevo que nos ha permitido aprender cosas que nunca imaginamos.

El grupo de Química del Estado Sólido y demás personas del ICMAB y del CIN2: Rosa, Amparo, Pedro, Judith, Francesc, Ana Bea, Costana, Corina, David, Fred, Gerard, Judith, Jullieth, Belencita, Ana López, Nerea, Sebastián, Alexandre, Zakaria, Ángela, Aura, Irene, Omar que junto con las personas que pasaron por nuestro laboratorio o el instituto hicieron la vida de cada uno más amable y convirtieron el despacho 3.16 en el centro de reuniones y área de esparcimiento preferida.

El Dr. Ángel Pérez del Pino, el Dr. Narcís Mestre, y el técnico José Amable Bernabé del Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona por su gran ayuda y colaboración con las medidas e interpretación de datos obtenidos de las técnicas de AFM, Espectroscopía Raman y ATR.

El Dr. Jordi Fraxedas del Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología, por tener tanta paciencia con las mil y una preguntas sobre el XPS, por sentarse tantas veces conmigo a explicarme lo ya explicado y por ayudarme en la interpretación de los espectros de XPS.

Pilar Lozano (actualmente en la Unidad de Materiales en AIDICO/Valencia) y Guillermo Antorrena del Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de Aragón por la realización de las medidas de XPS de las muestras de IrO_x .

El Dr. Francesc Pi del Laboratorio de Óptica de la Universidad Autónoma de Barcelona por la evaporación térmica de los substratos de platino.

El Dr. Josep Basas, la Dr. Gloria Lacort, el Dr. Lorenzo Calvo y Eduard Carbonell de los Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona por la realización de las medidas de GIXRD, RRX, XPS y análisis químico.

La Dra. Gloria Subías de la Universidad de Zaragoza por su valiosa ayuda en la realización de las medidas de XAS en el ESRF, y por la interpretación y ajuste de los datos obtenidos.

Dr. Jorge Collazos, la Dr. Mónica Carvallo y la técnico Vanesa Padial del Neural Repair Laboratory (HNP-SESCAM) por la realización de los cultivos y pruebas biológicas con las muestras sintetizadas en este trabajo y por haberme abierto un espacio en Toledo en el cual me sentí como en casa, gracias Vane por tanta paciencia!

A todos esos amigos regados por el mundo y a mis grandes maestros, puedo darme el lujo de haber sido formada con los mejores no solo a nivel profesional sino también a nivel personal, todos han aportado su granito de arena a este gran proyecto de vida.

Me gustaría destacar que este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida del programa de Formación de Personal Investigador (BES-2006-11560) y de los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (MAT2005-07683, MAT2008-29316-E), del CSIC (PIF06-021) y de la Comisión Europea Programa FP6 NEST STREP (Contrato 028473).

RESUMEN

Algunos óxidos electroactivos pueden ser conductores iónicos mixtos (conductividad iónica-electrónica) con una química de oxido-reducción que involucra procesos con reacciones de intercalación/desintercalación en estructuras abiertas o con vacantes. Estos materiales pueden presentar propiedades físicas relacionadas con los cambios en los estados de oxidación de los elementos involucrados en la estructura de óxido. Algunos de estos óxidos muestran comportamientos biocompatibles, lo que los convierte en materiales ideales para ser usados como electrodos en sistemas biológicos si se combina esta biocompatibilidad con su electroactividad. En el presente trabajo de investigación han sido obtenidas capas finas de TiO_2 , IrO_x y un óxido mixto de los dos componentes anteriores para ser aplicados como sustratos para crecimiento neuronal. Una vez sintetizadas, las capas de los tres materiales en estudio fueron caracterizadas estructuralmente mediante GIXRD, Reflectometría de Rayos X, XPS, XAS, Espectroscopía Raman y ATR. La microestructura fue evaluada mediante las técnicas de AFM, SEM y la medida del ángulo de contacto. Posteriormente se realizó una caracterización electroquímica y una evaluación de las propiedades de transporte mediante CV, IS y ECQM y por último se evaluó el posible uso de estos materiales como sustratos para el crecimiento neuronal mediante cultivos de células neuronales obtenidas del córtex cerebral de embriones de rata E14 y E18 Wistar. Las capas de TiO_2 fueron obtenidas por sol – gel y depositadas por *spin coating* en sustratos de *Indium Tin Oxide* y cuarzo y se trataron térmicamente a temperaturas de 250°C, 350°C y 450°C en el caso de las muestras depositadas sobre ITO y 350°C, 450°C, 500°C y 600°C en el caso de las muestras depositadas sobre cuarzo. Los estudios de XPS revelan que TiO_2 obtenido a 450°C o a largos tiempos de tratamiento térmico contiene cantidades pequeñas, pero significativas en la superficie, de Na^+ proveniente del vidrio puede afectar algunas aplicaciones. Las muestras tratadas a 250°C y 350°C son amorfas mientras que las tratadas a 450°C presentaron una estructura anatasa con una

microestructura nanoestructurada y homogénea. Las capas de TiO_2 obtenidas fueron aislantes y no pasivan el paso de corriente de un substrato conductor y su ventana de acción electroquímica es de -0.7 V a 0.5 V . Los cultivos neuronales muestran que hay crecimiento neuronal sobre las capas obtenidas de TiO_2 aunque con inhibición del desarrollo de dendritas que parece estar motivado por la química del material más que por su microestructura. Las capas de IrO_x fueron obtenidas por deposición electroquímica a corriente constante ($35\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$) y a potencial dinámico (0.55V , $10\text{mV}/\text{s}$) con 17, 25, 50 y 100 ciclos. La estructura resultante fue amorfa o quasi-amorfa con una estructura local tipo rutilo que permite la inserción de H^+ o K^+ y con grados de homogeneidad variable. La caracterización electroquímica y eléctrica muestran que el IrO_x obtenido es un conductor electroiónico (mixto) con capacidad de sufrir cambios en el estado de oxidación del Ir, e intercalación simultánea de protones en forma hidratada, con facilidad. Los resultados obtenidos por ECQM muestran que el proceso de formación electroquímica del IrO_x consume $4.2\ \text{e}^-/\text{Ir}$ y por tanto involucra un proceso adicional a la oxidación del $\text{Ir}^{(\text{III})}$ precursor. Los cultivos celulares sobre IrO_x lo muestran como el mejor substrato probado con diferencias significativas con respecto al TiO_2 . El crecimiento de dendritas no parece estar inhibido ya que la supervivencia neural es muy alta, equivalente a la referencia. Las capas del óxido mixto $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ fueron obtenidas por *spin coating* en substratos de Pt/cuarzo partiendo de disoluciones de Ti (donde el Ti está en forma de isopropóxido) e Ir (donde el Ir está como cloruro). Las capas depositadas se trataron térmicamente a temperaturas de 600°C y 650°C . Los resultados de GIXRD muestran que las capas del óxido mixto son más cristalinas que los óxidos simples con tres fases presentes: TiO_2 anatasa y rutilo e IrO_x rutilo. Además diferencias en la intensidad de los picos con la variación del ángulo de incidencia hacen pensar que el material puede ser un compuesto estratificado con IrO_x localizado en mayor proporción en la superficie. Las capas presentan una microestructura homogénea menos rugosa y más hidrofílica que en el caso de los óxidos simples. Los cultivos neuronales muestran una buena adhesión de las neuronas a las capas del óxido mixto y es evidente que la supervivencia celular mejora incrementando la cantidad de iridio. Al evaluar los tres materiales en términos de supervivencia y desarrollo neuronal se puede afirmar que el iridio tiene un papel determinante en la aplicación de dichos materiales

como posibles sustratos para crecimiento celular y electroestimulación. Además las capas de IrO_x se muestran como la mejor opción para ser utilizadas como soporte neuronal.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	xi
ÍNDICE GENERAL	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABLAS	xxxiii
SÍMBOLOS, UNIDADES Y ACRÓNIMOS	xxxvii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Objetivo General	3
1.2 Biomateriales, Electroactividad y Crecimiento Neuronal	6
1.3 Reacciones Redox Biológicas y Materiales Biocompatibles: Óxidos ...	12
1.4 Óxidos Electroactivos	12
1.5 Actividad Redox en Materiales. Reacciones de Intercalación vs. Propiedades Electroactivas e Interfases	14
1.6 Objetivos Específicos	16
1.7 Referencias Bibliográficas	16
Capítulo 2. Técnicas Experimentales	21
2.1 Síntesis de las Muestras	23
2.1.1 Método Sol Gel	23
2.1.2 Spin Coating	24
2.1.3 Síntesis Electroquímica	26
2.1.3.1 Técnicas Electroquímicas de de Síntesis de Control Estático de	

Potencial o de Corriente	27
2.1.3.2 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Dinámico de Potencial: Voltametría Cíclica	27
2.2 Caracterización Estructural	30
2.2.1 Difracción de Rayos X de Ángulo Rasante (GIXRD)	30
2.2.2 Reflectometría de Rayos X	31
2.2.3 Análisis Termogravimétrico (ATG)	32
2.2.4 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	33
2.2.5 Análisis Químico	34
2.2.6 Espectroscopia Raman	35
2.2.7 Espectroscopia de Infrarrojo	35
2.2.8 Espectroscopia de Absorción de Rayos X (XAS)	35
2.3 Caracterización Microestructural	39
2.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	39
2.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	39
2.3.3 Ángulo de Contacto	39
2.3 Caracterización Eléctrica y Electroquímica	40
2.4.1 Microbalanza de Cuarzo Electroquímica (ECQM)	40
2.4.2 Espectroscopia de Impedancia Compleja Electroquímica (EIS)	41
2.4.3 Current Sensing AFM	41
2.5 Análisis Celular	42
2.5.1 Cultivos Celulares	42
2.5.2 Inmunocitoquímica y Cuantificación de las Células	42
2.5.3 Electroestimulación in Situ	44
2.6 Referencias Bibliográficas	46
Capítulo 3. Capas de TiO₂	47
3.1 Óxido de Titanio	49
3.2 Obtención de Capas Finas de TiO ₂	51
3.3 Análisis Estructural y Caracterización de la Superficie	53
3.4 Análisis Microestructural	62

3.5 Propiedades Electroquímicas y Eléctricas	69
3.6 Cultivos Neuronales	71
3.7 Conclusiones	76
3.8 Referencias Bibliográficas	77
Capítulo 4. Capas de IrO_x	81
4.1 Óxido de Iridio	83
4.2 Obtención de Capas Finas de IrO _x	86
4.3 Procesos de Oxidación	89
4.4 Análisis Estructural y de Superficie	94
4.5 Microestructura de la superficie	112
4.6 Comportamiento Electroquímico	114
4.7 Adhesión de Polilisina	119
4.8 Propiedades de Transporte	120
4.9 Cultivos Neuronales	126
4.9.1 Supervivencia Celular	126
4.9.2 Influencias de Campos Eléctricos	130
4.9.2.1 Efecto de la Reducción del Material ex Situ	130
4.9.2.2 Experimentos Preliminares de Electroestimulación in Situ	132
4.10 Conclusiones	136
4.11 Referencias Bibliográficas	137
Capítulo 5. Capas Mixtas de TiO₂ e IrO_x	139
5.1 Óxidos Mixtos de Iridio y Titanio	141
5.2 Obtención de Capas Finas de (Ir-Ti)O _x	143
5.3 Análisis Estructural	144
5.4 Análisis Microestructural	151
5.5 Propiedades Electroquímicas y Eléctricas	154
5.6 Cultivos Neuronales	161

5.7 Comparación de Materiales	164
5.8 Conclusiones	166
5.9 Referencias Bibliográficas	168
Capítulo 6. Conclusiones	171
APÉNDICE A. Divulgación y Proyección	177
A1. Presentación en Congresos y Reuniones	179
A2. Publicaciones	181
A3. Actividad Actual y Perspectivas	182

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<p>Figura 1.1 Crecimiento de neuronas <i>Xenopus</i> de la espina dorsal a través del cátodo in Vitro. A) y B) Primera y última imagen de una secuencia time-lapse de neuronas creciendo en ausencia de campo eléctrico. El tiempo transcurrido (min) se muestra en e la esquina inferior derecho. C) Imagen compuesta, en la cual los cuerpos de las células (punto central amarillo) de algunas neuronas han sido superpuestos para mostrar el camino del crecimiento neuronal hacia el exterior durante 5 horas (sin campo eléctrico). D) y E) Neuronas en presencia de un campo eléctrico de 150 mV/mm durante 3 horas, con el vector del campo eléctrico mostrado en D). Los conos de crecimiento comienzan a dirigirse al cátodo en cuestión de minutos y uno de los conos cruza la otra dendrita para migrar hacia el cátodo. F) Imagen compuesta de las células expuestas a un campo eléctrico de 150 mV/mm por 5 horas. Los caminos dendríticos se curvan dramáticamente hacia el cátodo y las dendritas se extienden más rápidamente en dirección del cátodo que del ánodo. Barras de escala: A) y B) 100 μm. C) y F) 25 μm</p>	4
<p>Figura 1.2 Partes de una neurona</p>	7
<p>Figura 1.3 Resonancia magnética de una lesión del una espina dorsal humana con epicentro en la vértebra C7, un año después de la lesión. Un quiste de aproximadamente 3cm dividido por una fibra reemplaza el tejido neural</p>	8

Figura 1.4 Transplante de células olfativas <i>ensheating</i> (azul) en la vértebra C7 de una rata donde hay una contusión EN la espina dorsal. Las células olfativas <i>ensheating</i> no promueven la regeneración de las vías corticoespinales (rojo), pero inducen un brote aberrante del axón (parte C)	10
Figura 2.1 Descripción esquemática del método sol gel	23
Figura 2.2 Etapas del proceso de spin coating	24
Figura 2.3 Esquema de deposición por Spin Coating	26
Figura 2.4 Esquema general de una Voltametría cíclica	28
Figura 2.5 Esquema de la síntesis electroquímica de las capas de óxido de iridio	29
Figura 2.6 Diagrama esquemático de un experimento de difracción de ángulo rasante	31
Figura 2.7 Esquema de la incidencia de rayos X sobre una muestra	36
Figura 2.8 Ejemplo de un espectro de absorción de Rayos X	37
Figura 2.9 Configuración utilizada en las medidas de XAS de muestras de IrO _x	38
Figura 2.10 A) Unión de las tensiones interfaciales de una superficie sólida en contacto con un líquido y B) Equipo utilizado en la medida del ángulo de contacto	40
Figura 2.11 Esquema de la configuración usada para la electroestimulación de células glia sembradas sobre capas IrO _x	45
Figura 2.12 Esquema de la configuración usada para la electroestimulación de	

neuronas corticales sembradas sobre capas de IrO_x	46
Figura 3.1 Diferentes estructuras del óxido de titanio	49
Figura 3.2 Diagrama de flujo para la obtención y caracterización de capas de TiO_2	51
Figura 3.3 Capas de TiO_2 obtenidas por spin coating	52
Figura 3.4 Curvas de reflectometría de rayos X de capas de TiO_2 tratadas a A) 250°C , B) 350°C y C) 450°C	53
Figura 3.5 Difractogramas de Rayos X de ángulo rasante de capas de TiO_2 tratadas a A) 250°C y 350°C durante 2 horas y B) 450°C durante 2 horas	54
Figura 3.6 Espectro XPS general para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas	56
Figura 3.7 Detalle del espectro XPS de los picos $2p_{1/2}$ y $2p_{3/2}$ del Ti^{+4} para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas	57
Figura 3.8 Detalle del espectro XPS del pico $\text{O}1s$ para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas	58
Figura 3.9 Detalle del espectro XPS de los picos C y CO_3^{2-} para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas	59
Figura 3.10 Espectro Raman de capas de TiO_2 sobre ITO tratadas a diferentes temperaturas	60
Figura 3.11 Espectros de ATR de capas de TiO_2 sobre ITO y cuarzo tratadas a	

diferentes temperaturas	61
Figura 3.12 Imágenes de AFM de los substratos utilizados para las muestras del sistema TiO ₂	62
Figura 3.13 Imágenes de AFM de capas de TiO ₂ sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas	63
Figura 3.14 Curva del factor de rugosidad RMS con respecto a la temperatura de tratamiento para capas de TiO ₂ sobre ITO y cuarzo	64
Figura 3.15 Curva de tamaño de grano con respecto a la temperatura de tratamiento para capas de TiO ₂ sobre ITO y cuarzo	65
Figura 3.16 Imágenes de la evolución del ángulo de contacto de una gota de agua sobre muestras con 1 capa de TiO ₂ sobre ITO tratadas a diferentes temperaturas	66
Figura 3.17 Curvas del ángulo de contacto con agua en función de la temperatura de tratamiento para capas de TiO ₂ sobre ITO A) Sin polilisina y B) Comparación con y sin polilisina	67
Figura 3.18 Curvas del ángulo de contacto con medio de cultivo en capas de TiO ₂ sobre ITO con y sin polilisina A) 1 capa y B) 2 capas	69
Figura 3.19 Voltametrías cíclicas (2mV/s) de tricapas de TiO ₂ tratadas a 250°C/2h, 350°C/2h, 450°C/2h y substratos de ITO en diferentes medios	70
Figura 3.20 Imágenes de microscopía óptica de cultivos celulares realizados sobre capas de TiO ₂ depositadas sobre ITO y tratadas a 250°C y 350°C durante 2 horas.....	72

Figura 3.21 A) Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad (25000 cel/cm ²) después de 4 días in Vitro (DIV) en capas de TiO ₂ tratadas térmicamente a 250°C, 350°C y 450°C 2 horas, B) Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad después de 4 DIV en tricapas de TiO ₂ tratadas a 350°C 12 y 24 horas y C) Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad después de 10 DIV en capas de TiO ₂ depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas térmicamente a 350°C y 450°C 2 horas	73
Figura 3.22 Procesos de crecimiento neuronal en cultivos de baja densidad (500 cel/cm ²) en capas de TiO ₂ y superficies de control. Los datos representan la diferencia media ± desviación estándar del error significativa a p<0.05 de: A) Longitud del axón primario, B) Longitud de las dendritas primarias y C. Número de dendritas primarias por célula	75
Figura 4.1 Estructura del IrO ₂	83
Figura 4.2 Diagrama de flujo para la obtención y caracterización del capas de IrO _x	86
Figura 4.3 Evolución de las disoluciones de iridio utilizadas para la síntesis electroquímica de las capas finas de IrO _x durante la etapa de envejecimiento	87
Figura 4.4 Voltametrías cíclicas de la síntesis electroquímica de capas de IrO _x A) y C) 50 ciclos. B) y D) 100 ciclos. (El primer ciclo es el de menor intensidad).....	88
Figura 4.5 A) Imagen de fractura de SEM de una capa de IrO _x obtenida electroquímicamente a potencial dinámico a 0.55V con una velocidad de 10 mV/s 50 ciclos y B) Vista desde arriba de capas de IrO _x obtenida electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V con una velocidad de 10 mV/s 50 ciclos) “as prepared” y reducida a -0.23V en K ₂ CO ₃ 18s.	89

Figura 4.6 Síntesis electroquímica de una capa de IrO _x A) Potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) B) Resultados de ECQM	90
Figura 4.7 Evolución por ECQM de la masa depositada en la síntesis para cada ciclo de una capa de IrO _x (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) A) En los primeros 6 ciclos y B) En pasos discretos de 10 ciclos	92
Figura 4.8 Voltametría cíclica de una disolución ácido oxálico (0.2 mmol) y K ₂ CO ₃ (1 mmol) (0.55V, 10mV/s, 1 ciclo)	93
Figura 4.9 Difractogramas de Rayos X de ángulo rasante de capas electrodepositadas por voltametría cíclica (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) con diferentes ángulos de incidencia A) Muestra “ <i>as prepared</i> ” B) “ <i>As prepared</i> ” (AP) y con diferentes tratamientos térmicos	95
Figura 4.10 Análisis Termogravimétrico de una muestra de IrO _x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) y separada físicamente del substrato para su análisis A) En aire y B) En atmósfera de Argón/Hidrógeno. La línea roja define las rampas realizadas para estabilizar al máximo la masa medida.....	96
Figura 4.11 Espectro XPS general de IrO ₂ comercial de la marca Sigma-Aldrich y capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ” y remojada 7 días en agua	97
Figura 4.12 Detalle del espectro XPS del pico de C 1s de una muestra de IrO ₂ comercial marca Sigma – Aldrich y capas de IrO _x electrodepositada sobre platino a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ”, calentada a 120°C 1 hora y calentada a 500°C 4 horas.....	99
Figura 4.13 Deconvoluciones del pico de C 1s de A) IrO ₂ comercial marca Sigma-Aldrich, B) Capa de IrO _x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) C) Capa de IrO _x electrodepositada a potencial dinámico	

(0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) sumergida en agua 7 días D) Capa de IrO_x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) calentada a 120°C 1h y E) Capa de IrO_x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) calentada a 500°C 4 horas 100

Figura 4.14 Detalle del espectro XPS del pico O1s de una muestra de IrO₂ comercial marca Sigma – Aldrich y capas de IrO_x electrodepositadas sobre platino a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “*as prepared*”, calentada a 120°C 1 hora y calentada a 500°C 4 horas 102

Figura 4.15 Deconvoluciones del pico de O 1s de A) IrO₂ comercial marca Sigma-Aldrich, B) Capa de IrO_x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) C) Capa de IrO_x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) sumergida en agua 7 días D) Capa de IrO_x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) calentada a 120°C 1h y E) Capa de IrO_x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) calentada a 500°C 4 horas 103

Figura 4.16 Detalle del espectro XPS de los picos Ir 4f_{7/2} e Ir4f_{5/2} de una muestra de IrO₂ comercial marca Sigma-Aldrich y una capa de IrO_x electrodepositada sobre platino a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “*as prepared*” y remojada 7 días en agua..... 106

Figura 4.17 Espectros XANES de IrO₂ comercial marca Sigma-Aldrich, capas de IrO_x depositadas electroquímicamente a potencial dinámico sobre platino-soda lime (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “*as prepared*” y reducidas en diferentes medios..... 107

Figura 4.18 A) Gráficos de $k\chi(k)$ vs. k y B) Correspondientes transformadas de Fourier para IrO₂ comercial marca sigma-aldrich y capas de IrO_x depositadas electroquímicamente a potencial dinámico sobre platino-soda lime (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “*as prepared*” y reducidas en fosfato 0.1M pH7 a -0.23 V 109

.....	
Figura 4.19 Difractograma de Rayos X del IrO ₂ comercial marca Sigma-Aldrich.....	110
Figura 4.20 Imágenes de AFM de capas de IrO _x electrodepositadas A) En modo galvanostático (35 μA/cm ²), B) Modo dinámico 0.55V, 2 mV/s, 17 ciclos, C) Modo dinámico 0.55V, 10mV/s, 50 ciclos y C) Modo dinámico 0.55V, 10mV/s, 100 ciclos. El error estimado de los valores de rugosidad es de ~10%.....	113
Figura 4.21 Valores de ángulo de contacto en agua para capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ” y cubiertas con polilisina.....	114
Figura 4.22 Voltametrías cíclicas (2mV/s) de capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) en fosfato pH 7 y medio de cultivo	115
Figura 4.23 Respuesta en corriente bajo un potencial DC en capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) a - 0.23V y -0.52V en K ₂ CO ₃ 0.01M	116
Figura 4.24 Imágenes de AFM y valores de rugosidad de capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ” y reducidas en K ₂ CO ₃ pH 11 durante 18 s	117
Figura 4.25 Medidas de ángulo de contacto para capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ” y reducidas en K ₂ CO ₃ pH 11 durante 18 s A) En agua y B) En medio de cultivo.....	118
Figura 4.26 Medidas de ECQM para una capa de IrO _x electrodepositada a	

potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) sumergida en una solución de polilisina	120
Figura 4.27 Imágenes de AFM en modo current sensing y sus respectivas curvas I-V al aplicar un potencial bias de 0.05V a una capa de IrO _x depositada electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos).....	121
Figura 4.28 Diagrama de Nyquist de una solución de NaCl 0.1M	122
Figura 4.29 Diagrama de Nyquist de capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ” y con diferentes grados de reducción, además de un substrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida (NaCl 0.1M)	123
Figura 4.30 Diagrama de Nyquist de una capa de IrO _x electrodepositada a potencial dinámico (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos) y reducida a -0.52V en K ₂ CO ₃ pH 11 durante 18s	124
Figura 4.31 Circuito equivalente y esquema del comportamiento electroquímico de capas de IrO _x durante una medida de EIS	125
Figura 4.32 Imágenes de microscopía de fluorescencia de neuronas del córtex cerebral de rata sembradas a 25.000 cel/cm ² y cultivadas 4 días en capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s) A) y C) Tinción inmunocitoquímica Tau. B) y D) Tinción Hoescht de los núcleos correspondientes a las células en A) y C).....	127
Figura 4.33 Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad (25000 cel/cm ²) después de 4 días in vitro (DIV) en capas de IrO _x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s) a 25, 50 y 100 ciclos.....	127

Figura 4.34 Supervivencia neuronal en cultivos de baja densidad (500 cel/cm²) después de 4 días in vitro (DIV) en capas de IrO_x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) en función de la etapa de desarrollo neuronal..... 128

Figura 4.35 Procesos de crecimiento neuronal en cultivos de baja densidad (500 cel/cm²) en capas de IrO_x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) y superficies de control. Los datos representan la diferencia media ± desviación estándar del error significativa a p<0.05 de: A) y B) Número de dendritas primarias por célula, C) y D) Longitud de las dendritas primarias y E) Longitud del axón primario 129

Figura 4.36 Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad (25000 cel/cm²) después de 4 días in vitro (DIV) en capas de IrO_x electrodepositadas a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) y reducidas en diferentes medios y potenciales A) Durante 2 min y B) Durante 18s..... 131

Figura 4.37 Fotos de microscopía óptica en modo contraste de fase de neuronas corticales cultivadas a 4 DIV sobre capas de IrO_x depositadas electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) después de ser electroestimuladas a un potencial de -0.2V 10min..... 133

Figura 4.38 Fotos de microscopía óptica en modo contraste de fase de neuronas corticales cultivadas a 4 DIV sobre capas de IrO_x depositadas electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) después de ser electroestimuladas a un potencial de -0.2V 10min..... 134

Figura 4.39 Imágenes de Video Time Lapse de neuronas corticales cultivadas sobre capas de IrO_x depositadas electroquímicamente a potencial dinámico

(0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) y vidrio soda lime después de ser electroestimuladas mediante 5 pulsos a -1V con intervalos de 60s a 0V entre cada pulso	135
Figura 5.1 Diagrama de flujo para la obtención y caracterización de capas de (Ir-Ti)O _x	143
Figura 5.2 Capas de (Ir-Ti)O _x obtenidas por spin coating (600°C 6 horas) sobre Pt-cuarzo con diferentes relaciones Ir/Ti y diferentes número de capas	144
Figura 5.3 Difractogramas de Rayos X de ángulo rasante de capas de (Ir-Ti)O _x con una proporción Ir/Ti de 1:9, tratadas a diferentes temperaturas y tiempos. El ángulo de incidencia es de 0.6°	145
Figura 5.4 Difractogramas de Rayos X de ángulo rasante de una capa de (Ir-Ti)O _x con una proporción Ir/Ti de 1:9, tratada a 600°C durante 6 horas variando el ángulo de incidencia desde 0.3° hasta 0.075°	146
Figura 5.5 Espectro XPS general para capas de (Ir-Ti)O _x con una proporción Ir/Ti de 1:9, depositadas sobre platino-cuarzo y tratadas a diferentes temperaturas	147
Figura 5.6 A) Comparación de detalle del espectro XPS del pico Ti2p para capas de: TiO ₂ depositada por spin coating sobre cuarzo (tratada térmicamente a 450°C 2 horas, 1 capa) y (Ir-Ti)O _x depositada por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa). B) Comparación del detalle del espectro XPS del pico Ir 4f para capas de: IrO _x depositada electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos) y (Ir-Ti)O _x depositada por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa)	149
Figura 5.7 A) Comparación del detalle del espectro XPS del pico O1s para	

capas de: IrO_x depositada electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos), TiO_2 depositada por spin coating sobre cuarzo (tratada térmicamente a 450°C 2 horas, 1capa) y $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ depositada por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa). 150

Figura 5.8 Comparación del detalle del espectro XPS del pico C1s para capas de: IrO_x depositada electroquímicamente a potencial dinámico (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos), TiO_2 depositada por spin coating sobre cuarzo (tratada térmicamente a 450°C 2 horas, 1capa) y $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ depositada por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa). 151

Figura 5.9 Imágenes de SEM de capas de $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 1:9 tratadas térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa) A) Monocapas y B) Tricapas 152

Figura 5.10 Imágenes de AFM de capas de $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ con una proporción Ir/Ti de 1:9, depositadas sobre platino-cuarzo y tratadas a diferentes temperaturas 153

Figura 5.11 Medidas de ángulo de contacto (con agua y medio de cultivo) para capas de $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo tratadas térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa y cubiertas con polilisina A) y B) Relación Ir 1:9Ti C) y D) Relación Ir 2:9 Ti 154

Figura 5.12 Voltametrías cíclicas a 2mV/s de capas de $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo tratadas térmicamente a 600°C 6 horas con diferentes medios electrolíticos A) Relación Ir1:9Ti 1 capa, B) Relación Ir1:9Ti 3 capas, C) Relación Ir2:9Ti 1 capa y C) Relación Ir2:9Ti 3 capas 155

Figura 5.13 Voltametría cíclica a 2mV/s en tampón fosfato 0.1M pH 7 de un substrato de Pt-cuarzo 156

- Figura 5.14 Detalle de la voltametría cíclica en fosfato pH 7 a 2 mV/s de capas de (Ir-Ti)O_x obtenidas por spin coating tratadas térmicamente a 600°C/6 horas con diferente número de capas y concentraciones de Ir 157
- Figura 5.15 Diagrama de Nyquist para un substrato de platino sobre cuarzo y capas de (Ir-Ti)O_x depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo tratadas a diferentes tiempos y temperaturas 158
- Figura 5.16 Diagrama de Nyquist para un substrato de platino sobre cuarzo y capas de (Ir-Ti)O_x depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo tratada térmicamente a 600°C 6 horas con diferentes relaciones Ir/Ti y diferente número de capas depositadas..... 159
- Figura 5.17 Diagrama de Nyquist de una capa de de (Ir-Ti)O_x depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa 160
- Figura 5.18 Imágenes de microscopía de fluorescencia de neuronas del córtex cerebral de rata sembradas a 25.000 cel/cm² y cultivadas 4 días en capas de (Ir-Ti)O_x depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo tratadas térmicamente a 600°C 6 horas en 1 y 3 capas y diferentes proporciones Ir/Ti..... 162
- Figura 5.19 Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad (25000 cel/cm²) después de 4 días in vitro (DIV) en capas de (Ir-Ti)O_x depositadas por spin coating sobre Pt-cuarzo A) Proporción Ir/Ti de 1:9 1 capa, tratadas térmicamente a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento y B) Tratadas térmicamente a 600°C 6 horas con diferente proporción Ir/Ti y diferente número de capas..... 163
- Figura 5.20 Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad (25000 cel/cm²) después de 4 días in Vitro (DIV) en capas de: TiO₂ depositada por spin coating sobre ITO (tratada térmicamente a 350°C 2 horas, 1 capa), IrO_x

depositada electroquímicamente sobre Pt- soda lime (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos), y (Ir-Ti)O_x depositada por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 2:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 3 capas) 164

Figura 5.21 Espectros XPS para capas de: IrO_x electrodepositada electroquímicamente (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos), TiO₂ depositada por spin coating sobre cuarzo (tratada térmicamente a 450°C 2 horas, 1 capa)y (Ir-Ti)O_x depositada por spin coating sobre Pt-cuarzo (proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa) cubiertas con polilisina 165

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 2.1 Etapas de desarrollo de neuronas del hipocampo	44
Tabla 3.1 Espesor de las capas de TiO ₂ obtenidos por reflectometría de rayos X para muestras tratadas a diferentes temperaturas	52
Tabla 3.2 Valores de energía para los picos observados en el espectro XPS general de capas de TiO ₂ depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas. SL es una abreviatura del vidrio soda lime. El error estimado es de $\approx 3\%$	55
Tabla 4.1 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de el IrO ₂ comercial marca Sigma – Aldrich y para capas de IrO _x depositadas electroquímicamente por voltametría cíclica (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) sometidas a diferentes tratamientos	97
Tabla 4.2 Resultados del análisis químico de una capa de IrO _x obtenida electroquímicamente a potencial dinámico(0.55V, 10mV/s, 50 ciclos) sumergida en agua Mili-Q durante 7 días y el correspondiente análisis químico del líquido del remojo	98
Tabla 4.3 Resultado del la deconvolución y asignación de picos de la señal del C 1s para una muestra de IrO ₂ comercial marca Sigma-Aldrich y capas de IrO _x electrodepositada sobre platino por voltametría cíclica (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ”, calentada a 120°C 1 hora y calentada a 500°C 4 horas	101

Tabla 4.4 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s de una muestra de IrO ₂ comercial marca Sigma-Aldrich y capas de IrO _x electrodepositada sobre platino por voltametría cíclica (0.55V, 10 mV/s, 50 ciclos) “ <i>as prepared</i> ”, calentada a 120°C 1 hora y calentada a 500°C 4 horas	104
Tabla 4.5 Parámetros estructurales derivados del análisis de los EXAFS de la primera capa Ir-O usando la estructura tipo rutilo. El factor de escala S ₀ ² se fijó a 0.72. N es el número de coordinación, σ es el factor de Debye Waller y E la energía del haz. Red = reducida	110
Tabla 4.6 Valores del incremento de masa registrado mediante una ECQM acoplada a un potenciostato durante el proceso de reducción de capas de IrO _x (50 ciclos) a diferentes potenciales	119
Tabla 4.7 Valores de la carga utilizada en la reducción de las muestras presentadas en los histogramas de supervivencia de la Figura 4.36. El % de supervivencia se ha calculado con respecto a la supervivencia de la muestra “ <i>as prepared</i> ” (0.55V, 10MV/s, 50 ciclos)	132
Tabla 5.1 Valores de concentración atómica (%) proveniente de la cuantificación de los espectros XPS capas de (Ir-Ti)O _x , depositadas sobre platino-cuarzo y tratadas a diferentes temperaturas con una proporción Ir/Ti de 1:9. M representa la suma de % del Ti e Ir	148
Tabla 5.2 Posiciones de los picos de la voltametría cíclica (2mV/s en fosfato pH 7) de una capa de (Ir-Ti)O _x obtenida por spin coating tratada térmicamente a 600°C/6 horas con diferente número de capas y concentraciones de Ir	156
Tabla 5.3 Valores de porcentaje de concentración atómica proveniente de la cuantificación de los espectros XPS capas de: IrO _x depositada	

electroquímicamente (0.55V, 10mV/s, 50 ciclos), TiO₂ depositada por spin coating sobre cuarzo (tratada térmicamente a 350°C 2 horas, 1 capa) y (Ir-Ti)O_x depositada por spin coating sobre cuarzo-Pt (proporción Ir/Ti de 1:9 tratada térmicamente a 600°C 6 horas 1 capa 166

SÍMBOLOS, UNIDADES Y ACRÓNIMOS

A	Amperios
Å	Amstrongs
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
Ag	Plata
ATR	Modo de Refelctancia Total Atenuada
Ba	Bario
Bar	Bar (unidad de presión)
C	Carbono
C	Columbios
C	Capacidad
Ca	Calcio
CE	Comunidad Europea
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cu	Cobre
CV	Voltimetría cíclica
$\chi(k)$	Señal EXAFS
d	Orbital molecular
d	Grosor
DIV	Días in Vitro
δ	Número de electrones
E	Energía
E	Potencial
ECQM	Microbalanza de cuarzo Electroquímica

EIS	Espectroscopia de Impedancia Compleja Electroquímica
E _o	Energía inicial
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
E14	Embriones con 14 días de gestación
E18	Embriones con 18 días de gestación
EXAFS	Estructura fina del espectro de absorción de rayos X extendida
FPVI	Programa Marco de la Comunidad Europea
FWHM	Ancho máximo a la altura media
FT	Transformada de Fourier
g	Gramos
Ge	Germanio
GIXRD	Difracción de Rayos X de Ángulo Rasante
γ	Tensión superficial
γ_{SL}	Tensión superficial sólido-líquido
γ_{SV}	Tensión superficial sólido-vapor
γ_{LV}	Tensión superficial líquido-vapor
H	Hidrógeno
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HNP	Hospital Nacional de Parapléjicos
Hz	Hertz
I	Corriente
I	Intensidad
ICP	Plasma de Inducción
I _o	Intensidad incidente
Ir	Iridio
ITO	Indium Tin Oxide
K	Potasio
K	Grados Kelvin
K	Capa electrónica
L	Capa electrónica

l	Litro
Li	Litio
L_{α}	Línea de Fluorescencia
λ	Longitud de Onda
M	Metal
M	Molaridad
M	Capa electrónica
m	Metro
m	Masa
Δm	Cambio de masa
MIINC	Ministerio de Innovación y Ciencia
min	Minutos
Mn	Manganeso
MS	Espectroscopia de Masas
μ	Coefficiente de absorción lineal
N	Nitrógeno
N	Modulo de cizalladura
N	Número de coordinación
N	Newtons
N	Número de puntos de la medida en una imagen de AFM
Na	Sodio
N_i	Número de especies involucradas
NEXAFS	Estructura fina del espectro de absorción de rayos X cerca al borde
ν	Frecuencia
ν_0	Frecuencia inicial
$\Delta \nu$	Cambio de frecuencia
O	Oxígeno
OiPr	Isopropóxido
p	Orbital molecular

PBS	Tampón Fosfato Salino
PEDOT	Poly(3,4-ethylenedioxythiopheno)
PLL	Polilisina
PN	Plan Nacional
Pt	Platino
Q	Carga
θ	Ángulo de contacto
θ_m	Ángulo de incidencia
θ_c	Ángulo crítico
R	Distancia de enlace promedio
RMS	Factor de rugosidad
r_q	Densidad del cuarzo
R_s	Resistencia del electrolito
R_{TC}	Resistencia a la transferencia de carga
Ru	Rutenio
ρ	Densidad
s	Segundo
s	Orbital molecular
S	Superficie del electrodo
SESCAM	Servicio de Salud de Castilla la Mancha
Si	Silicio
SL	Soda Lime
σ	Factor de Debye Waller
T	Temperatura
T_c	Temperatura crítica
TGA	Análisis Termogavimétrico
Ti	Titanio
Torr	Equivalente a mmHg
UHV	Ultra Alto Vacío
V	Voltios

x	Espesor
XAS	Espectroscopia de Absorción de Rayos X
XANES	Estructura del espectro de absorción de rayos X cerca al borde
XPS	Espectroscopia Fotónica de Rayos X
Y	Ítrio
z_i	Altura del punto (x_i, y_i) tomado de una imagen de AFM

Capítulo 1

Introducción

En este capítulo se realiza una introducción del trabajo contenido en este documento de tesis doctoral.

El capítulo comienza exponiendo el objetivo general del trabajo y la base sobre la que se apoyan.

Luego se realiza una descripción de los óxidos electroactivos, grupo al que pertenecen los materiales estudiados en este trabajo. Se exponen sus características, propiedades electroactivas, reacciones de intercalación redox y su relación con sistemas biológicos.

A continuación se establece una relación entre biomateriales, electroactividad y crecimiento neuronal donde además se mencionan los inconvenientes en la regeneración espontánea de lesiones del sistema nervioso central. Además se hace mención a las reacciones redox biológicas y su relación sobre materiales biocompatibles.

Por último se enumeran los diferentes objetivos específicos.

1.1 Objetivo General

El objetivo global de este trabajo es el desarrollo de sustratos para crecimiento neuronal basados en óxidos activos electroquímica o eléctricamente. Para ello su puesta en forma de capas finas sobre sustratos conductores, en una configuración transparente facilita el desarrollo de cultivos celulares sin fijación y por tanto un estudio in situ de su efecto en las células. Este objetivo general se centrará en óxidos de titanio, iridio y los óxidos mixtos que se desarrollen de ambos y la relación de sus propiedades fisicoquímicas con su posible aplicación como sustratos para el crecimiento neuronal.

En sí mismo el trabajo constituye un humilde inicio que contiene una perspectiva a largo plazo: la posibilidad de que los materiales electroactivos y su modulación en términos de potencial superficial o de aplicación de campos eléctricos utilizándolos como electrodos pudiera favorecer el crecimiento neuronal o el direccionamiento de este para reparar lesiones medulares.

Desde hace dos siglos, se sabe de la existencia de campos eléctricos constantes en el espacio extracelular en plantas y animales, así como la existencia de “potenciales de acción” dinámicos que constituyen la base de la comunicación celular. De hecho, esta información se ha utilizado en el registro de señales (electrocardiogramas) o en estimulación (marcapasos). La bioelectricidad es un fenómeno pues conocido, y el crecimiento, la migración y la división celular ocurren en presencia de dichos campos eléctricos y gradientes iónicos, en los que un potencial concreto está presente durante horas o días.

Por tanto las células integran señales químicas y eléctricas en su desarrollo, y al igual que existen factores de crecimiento químico pueden existir factores eléctricos.

Con base a ello, se han llegado a realizar experimentos que muestran que la aplicación de campos eléctricos en un medio de crecimiento neuronal de células xenopus en ranas, induce el crecimiento axonal hacia el cátodo cuando los electrodos se sitúan alejados de las células (Figura 1.1) [1]. Que ello funcione en neuronas de mamífero no está claro, ni que lo haga cuando el material en sí es el sustrato del crecimiento neuronal.

El trabajo de McCaig [2] muestra la influencia de la existencia de un gradiente de campo eléctrico en el medio de cultivo celular, al mantener los electrodos fuera del medio mediante el uso de puentes salinos en celdas electroquímicas de 3 compartimientos.

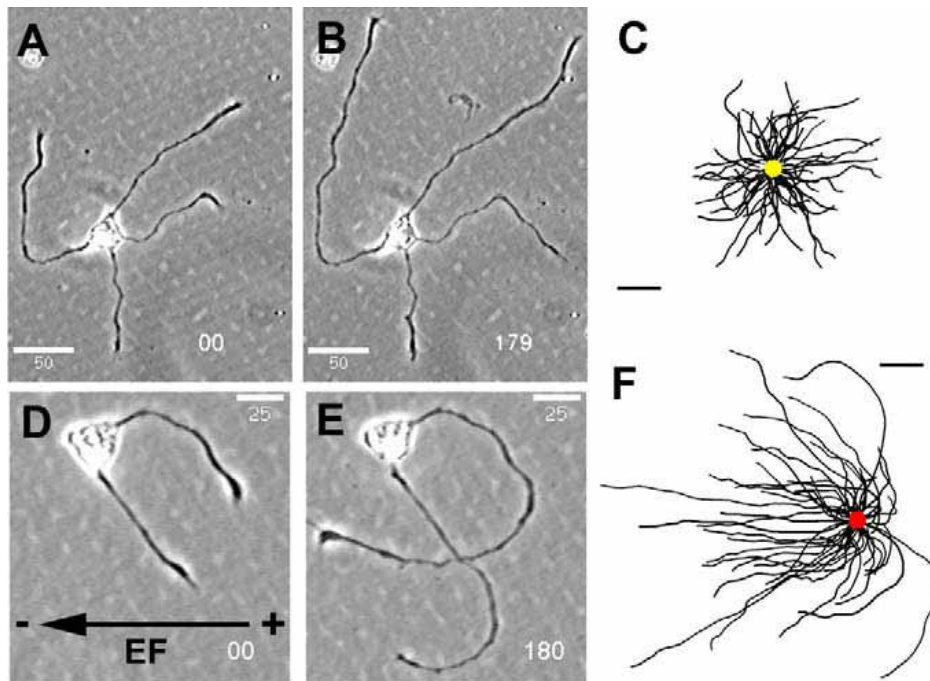


Figura 1.1 Crecimiento de neuronas *Xenopus* de la espina dorsal a través del cátodo *in Vitro*. A) y B) Primera y última imagen de una secuencia *time-lapse* de neuronas creciendo en ausencia de campo eléctrico. El tiempo transcurrido (min) se muestra en e la esquina inferior derecho. C) Imagen compuesta, en la cual los cuerpos de las células (punto central amarillo) de algunas neuronas han sido superpuestos para mostrar el camino del crecimiento neuronal hacia el exterior durante 5 horas (sin campo eléctrico). D) y E) Neuronas en presencia de un campo eléctrico de 150 mV/mm durante 3 horas, con el vector del campo eléctrico mostrado en D). Los conos de crecimiento comienzan a dirigirse al cátodo en cuestión de minutos y uno de los conos cruza la otra dendrita para migrar hacia el cátodo. F) Imagen compuesta de las células expuestas a un campo eléctrico de 150 mV/mm por 5 horas. Los caminos dendríticos se curvan dramáticamente hacia el cátodo y las dendritas se extienden más rápidamente en dirección del cátodo que del ánodo. Barras de escala: A) y B) 100 μm . C) y F) 25 μm [1].

Los mecanismos que se proponen para explicar la influencia que tiene el campo eléctrico están relacionados tanto con los mecanismos de intercalación de Ca^{2+} , como con otros efectos de gradiente iónico. Sin embargo la naturaleza “eléctrica” de las conexiones neuronales, los gradientes de campo eléctrico a través de membranas sanas o dañadas así como el tamaño micro o nanoestructurado de las

propias células hacen prever una influencia del material más compleja. Incluso en esos experimentos iniciales, el papel que juega la adhesión celular al material puede ser determinante, así como la microestructura de este [2].

Aunque no se ha conocido hasta el momento la interacción que se establece entre el material y el medio celular, o las células, el uso de materiales electroactivos en los casos biocompatibles, podría crear campos eléctricos locales de tal vez, menor intensidad que los utilizados en algunos trabajos [1] y por ello minimizar los posibles efectos secundarios tanto en estimulación funcional como en inducción del desarrollo, de darse este.

Si los materiales elegidos presentan además de su actividad como electrodos, reacciones propias de intercalación en presencia de campos eléctricos, estas pueden servir de alternativa a las reacciones que usualmente ocurren en la superficie de metales nobles como el Pt o las aleaciones Pt/Ir por ejemplo, como la formación de radicales libres que se llega a dar en electrodos de electroestimulación por la oxidación del agua o reducción del O₂ disuelto. Por tanto la elección de los posibles materiales a estudiar como prótesis neuronal debe tener en cuenta aspectos como:

- Electroactividad en un medio iónico
- Biocompatibilidad
- Existencia de una ventana de potencial amplia en la que no ocurran reacciones que den lugar a productos tóxicos como la generación de radicales libres
- El material debe permitir la adhesión y proliferación de células en su superficie, sin toxicidad, presentar propiedades estables a largo plazo, y cuando el estímulo eléctrico sea aplicado continuar siendo compatible sin producir daño a las células o retracción de las dendritas.

Los materiales implantados hasta ahora en el sistema nervioso como electrodos, han contribuido al tratamiento de trastornos neurológicos como el Parkinson o el dolor neuropático mediante la aplicación de pulsos cortos (μ s). Los más habituales han sido Pt y sus aleaciones con iridio. Sin embargo los factores de compatibilidad y el balance de eficacia/seguridad en la transferencia de carga en la interfase electrodo-tejido todavía limitan su uso. Los pacientes desarrollan

tolerancia al tratamiento debido a que la inflamación y fibrosis alrededor del electrodo aumentan la impedancia y se requiere finalmente eliminar el implante. También se ha propuesto el uso de estimulación mediante el uso de corriente directa para el tratamiento del daño en la médula espinal pero hasta ahora el efecto terapéutico está limitado por la aparición de productos citotóxicos en las reacciones catódicas y anódicas, cuando se usa Pt y otros electrodos inertes.

En el caso de estimulación se ha llegado a estudiar el IrO_2 con el mayor éxito en términos de capacidad de carga que puede ser transferida y por tanto de la capacidad de aplicar pulsos mayores [3], y más recientemente de modo simultáneo al trabajo de esta tesis se han probado en primera instancia polímeros conductores como polipirrol o PEDOT [4,5].

De modo original, el trabajo realizado basado en varios proyectos del grupo de investigación (CE, FPVI y PN-MICINN) se planeó con base a dos tipos de materiales: óxidos activos como el IrO_x y polímeros conductores biocompatibles. Esta tesis aborda el primer caso, el de óxidos electroactivos como sustratos de crecimiento neuronal, comenzando por el más exitoso en electroestimulación, el IrO_x , y el más conocido por su biocompatibilidad, el TiO_2 , así como los posibles óxidos mixtos de la combinación de estos.

1.2 Biomateriales, Electroactividad y Crecimiento Neuronal

El cerebro esta formado por millones de células llamadas neuronas. Estas neuronas se pueden describir esquemáticamente como procesadores de información con un canal de entrada de información (dendritas), un órgano de cómputo (soma) y un canal de salida de información (axón) como se muestra en la Figura 1.2.

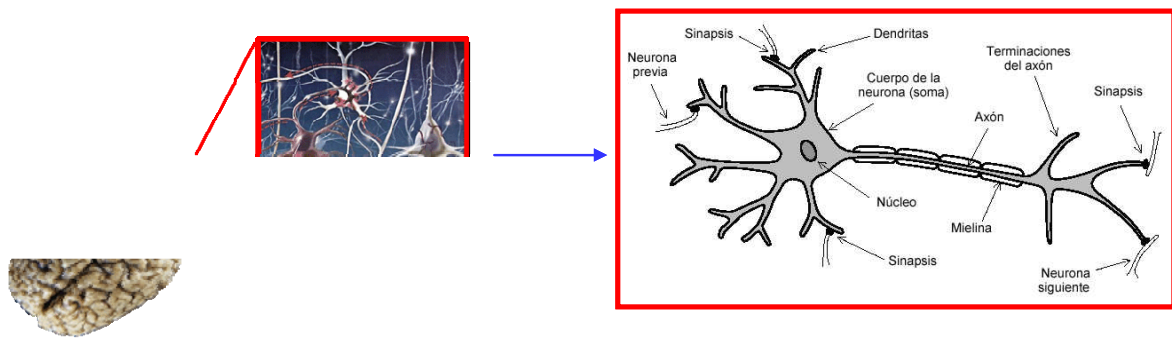


Figura 1.2 Partes de una neurona.

Los traumas, tumores, infecciones y enfermedades vasculares y degenerativas pueden perjudicar las neuronas, las células glia y los vasos sanguíneos en el sistema nervioso central. En estos casos la neurona muere o los axones son dañados, interrumpiendo la transmisión de la información. En los mamíferos adultos estos daños en el sistema nervioso central desencadenan una serie compleja de eventos que termina con la cicatrización de los tejidos sin la restauración de las funciones normales.

Hoy en día se concentran muchos esfuerzos en la reparación del sistema nervioso central o en estimular la regeneración del axón por medio de transplantes celulares, factores neurotróficos y enzimas o anticuerpos que neutralizan los inhibidores del crecimiento de las dendritas [6]. Sin embargo, algunos problemas asociados con las lesiones en el sistema nervioso central deben ser resueltos antes de que estos enfoques puedan tener éxito.

Las lesiones del sistema nervioso central en humanos asociadas a traumas o isquemias están en un rango entre 1 cm y 10 cm [7,8] o incluso más de 10 cm. Además se forman cavidades llenas de fluido extracelular como resultado de la pérdida de la estructura del tejido, la fagocitosis o muerte de las células (Figura 1.3) y de la extirpación quirúrgica de cicatrices fibróticas mesenquimales [9,10].



Figura 1.3 Resonancia magnética de una lesión de una espina dorsal humana con epicentro en la vértebra C7, un año después de la lesión. Un quiste de aproximadamente 3cm dividido por una fibra reemplaza el tejido neural. (Foto cedida por el Laboratorio de Reparación Neuronal del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo – España)

La extirpación de tumores y muchas otras enfermedades neurológicas también causan la formación de cavidades y cicatrices en el tejido. Estas pueden convertirse en una barrera mecánica para el crecimiento axonal y la migración celular e interferir con las señales espaciales que podrían ayudar a la reparación.

Otro impedimento adicional importante para una exitosa regeneración es el proceso conocido como Schwannosis, una proliferación intra y extra celular aberrante de células Schwann, sin regeneración de las vías interrumpidas por la lesión. La Schwannosis ocurre espontáneamente en más de la mitad de los casos de lesiones en la médula espinal en humanos, y además no hay recuperación de las funciones normales [10-12]. Por el contrario, se incrementa la producción de proteoglicanos que pueden obstaculizar la regeneración axonal [13] y potencialmente contribuir al dolor y la hipertonía muscular o espasticidad creando un efecto de masa que debe ser evitado [10,11].

La Schwannosis es un claro indicador de que no todas las respuestas de crecimiento glial o axonal permiten la reparación del sistema nervioso central. Desafortunadamente, muchas terapias experimentales para lesiones en la médula espinal inducen respuestas comparables con la Schwannosis que son

malinterpretadas como reparaciones de las lesiones sólo debido al número de células y dendritas vistas dentro de las cavidades. El uso de métodos inapropiados para evaluar la recuperación funcional complica aún más el análisis de este tipo de intervenciones.

Los axones dañados en el sistema nervioso periférico adulto son capaces de crecer grandes distancias mientras que las fibras del sistema nervioso central no. La expresión de genes neuronales asociados al crecimiento y la migración de las células Schwan al lugar de la lesión le confiere esta capacidad al sistema nervioso periférico adulto. En consecuencia, muchos estudios han abordado el tema de la reparación del sistema nervioso central mediante el uso de transplantes de células Schwan, inyectadas o sembradas en canales sintéticos que se implantan en el lugar de la lesión [6]. Esta aproximación ha producido los mejores resultados en el crecimiento de fibras nerviosas en ratas. Sin embargo, el número de axones regenerados aún es muy bajo (menos del 1% del valor normal) [13], aún cuando el transplante es complementado con la administración de neurotrofinas.

Por otro lado, la respuesta de crecimiento se restringe a un tipo particular de neuronas, y la mayor parte de las fibras de crecimiento son colaterales de axones vecinos y no están asociadas a la recuperación funcional. Las células olfativas *ensheating* (palabra que viene a significar “envainadoras”) son las primeras en haber sido estudiadas como células Schwan [14,15] habiéndose observado efectos pro-regenerativos después de su transplante en modelos de roedores. Sin embargo, dichos resultados no han sido confirmados [16,17]. En algunas investigaciones se han inyectado células *ensheating* en contusiones de la médula espinal en ratas que se parecen mucho a las lesiones humanas en relación con el patrón de daño neuronal y la formación de cavidades [18,19]. A pesar del tamaño relativamente pequeño de las lesiones experimentales (alrededor de 3 mm), los transplantes de células olfativas *ensheating* no promueven la regeneración de vías interrumpidas pero si inducen brotes patológicos de axones adicionales (Figura 1.4) similares a los observados en la Schwannosis [10-12].

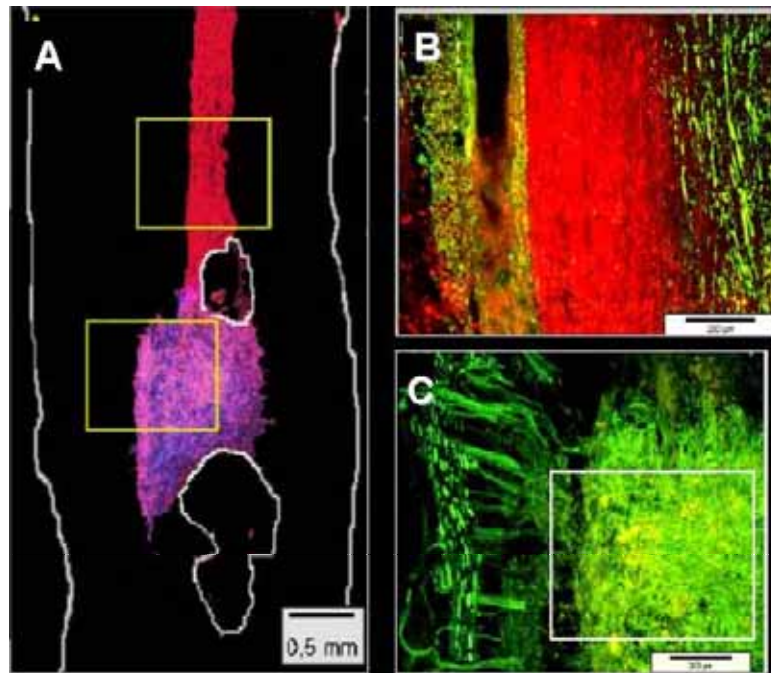


Figura 1.4 Transplante de células olfativas ensheating (azul) en la vértebra C7 de una rata donde hay una contusión en la espina dorsal. Las células olfativas ensheating no promueven la regeneración de las vías corticoespinales (rojo), pero inducen un brote aberrante del axón (parte C) [30]

Aunque la siembra con células inyectadas por si sola no tiene éxito en la reparación de lesiones, hay pacientes con lesiones en la espina dorsal en todo el mundo que están siendo tratados con inyecciones de diversos tipos de células. Tal estrategia origina barreras adicionales a la regeneración y exponen al paciente a riesgos quirúrgicos innecesarios.

Los tejidos del sistema nervioso, y en general las células, desarrollan campos eléctricos que mantienen gradientes iónicos en contra del equilibrio termodinámico y que se usan en la transmisión de señales nerviosas. Estos campos son claramente observados en la forma de potenciales de membrana. Por otro lado la presencia de heridas origina gradientes de campo eléctrico adicionales que ayudan en el proceso de curación de heridas favoreciendo el mecanismo de cierre de membranas [19]. Esto indujo a la investigación de campos eléctricos externos que puedan ayudar a esa curación, minimizando los efectos secundarios de la formación de cicatrices. Por esta razón, la próxima generación de biomateriales además de dar un soporte estructural debe estar programada para interactuar con

los tejidos a través de su actividad eléctrica o electroquímica. Para este propósito es necesario que los materiales conductores soporten la existencia de campos sin calentamiento excesivo y pérdida de energía, y que puedan llevar procesos eléctricos y electroquímicos a las cercanías del tejido biológico sin reacciones químicas secundarias. A través de ellos sería posible introducir estímulos a los tejidos para regular la adherencia, crecimiento, migración, supervivencia y diferenciación celular. La aplicación de potenciales ha sido probada para actuar en algunos tejidos *in vitro*. Los ejemplos mas conocidos son los efectos en el sistema nervioso [20], huesos y cartílagos [21], el epitelio de la córnea [22] y células del tejido endotelial [23].

Los implantes en el sistema nervioso usados han sido hasta el presente sobre todo sensores y electrodos de estimulación. Esta línea de investigación ha permitido la fabricación de electrodos efectivos en el tratamiento de desordenes neurológicos humanos incluyendo el Parkinson [24]. Sin embargo, aún hay problemas que limitan el uso de electrodos implantables, casi siempre relacionados con la biocompatibilidad del material [25] o con la eficacia de la transferencia de carga entre el material y el tejido [26]. Estos factores evidencian la necesidad de desarrollar nuevos materiales con mejores propiedades electroquímicas [27].

El platino, las aleaciones de platino/iridio y los óxidos de iridio IrO_x han sido ensayados y usados para este propósito. Por otro lado, el titanio metálico ha sido usado para implantes estructurales. En este caso se sabe que el titanio forma capas de TiO_2 que pasivan el metal y contribuyen de gran manera a la biocompatibilidad siendo al tiempo un notable neutralizador de radicales de oxígeno. Mientras que el IrO_x es conductor, el TiO_2 estequiométrico en cualquiera de sus formas es aislante. Sin embargo, estudios realizados en el contexto de este trabajo, han demostrado que el TiO_2 soporta el crecimiento y asegura la supervivencia de células neuronales, en las fases amorfas de rutilo y anatasa [28,29]. El dopaje redox de este óxido que indujera conductividad, podría permitir su uso como electrodo en celdas electroquímicas que podrían promover la influencia en la dirección y velocidad de crecimiento así como la ramificación de las dendritas de las neuronas. Un dopaje ideal podría ser con un metal precioso como el iridio, de reconocida biocompatibilidad, debido a que el IrO_x es conductor,

y cristaliza en una estructura similar a la TiO_2 . En este trabajo se aborda la obtención del óxido $\text{Ir}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_2$ que podría reunir lo mejor de los óxidos individuales a menor coste.

De entre los materiales biocompatibles a elegir como objeto de estudio, habría factores que pueden permitir un mayor rango de acción y que están relacionados con la conductividad electrónica y mixta; la capacidad de transferencia de carga que permite aplicar campos eléctricos en un mayor rango de potencial/corriente, sin dañar el tejido con productos secundarios; y con cambios estructurales mínimos o apropiados al medio biológico.

1.3 Reacciones Redox Biológicas y Materiales Biocompatibles: Óxidos

Las reacciones redox ocurren en un gran número de procesos bioquímicos necesarios para el soporte de la vida. Existen otros que sin embargo pueden inducir daños celulares notables y que se regulan de modo natural con un equilibrio de antioxidantes cuyo balance es regulado precisamente para mantener funciones vitales [30]. Entre ellos los radicales de oxígeno, nitrógeno y super óxidos (O_2^-), óxido nítrico (NO^\cdot), hidroxilos (OH^\cdot), peroxinitritos (OONO^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), se forman de un modo natural pero también como parte de la reacción inflamatoria existente con un material implantado. Uno de los mayores desafíos es mejorar la biocompatibilidad del material usado evitando la citotoxicidad o reacciones inflamatorias asociadas. La inflamación causa la magnificación de los tejidos y el encapsulamiento del implante con cápsulas fibrosas que limitan sus funciones y que pueden complicar su extracción final. Las células cerca del implante están comprometidas directamente por fibrosis o por la carencia de oxígeno derivada de ella. En este sentido, el titanio es conocido por su excelente biocompatibilidad [31] y aunque el mecanismo exacto para esto no está claro, por su acción anti-radical, su uso se extiende a varios tipos de prótesis.

1.4 Óxidos Electroactivos

Los materiales electroactivos, entendidos como tal, son los capaces de dar una respuesta eléctrica a una acción física externa específica. En los últimos años, los

óxidos electroactivos han atraído el interés de la comunidad científica debido al amplio abanico de posibilidades tecnológicas que poseen [32]. Como ejemplos de estas posibles aplicaciones podríamos destacar la piezoelectricidad [33], los sistemas de almacenamiento de energía [34] (baterías, pilas de combustible, supercapacitores etc.) o los sensores y catalizadores [35-37].

Algunos de estos óxidos electroactivos son conductores mixtos (conductividad iónica-electrónica) y permiten una química de oxido-reducción acompañada de procesos de intercalación/desintercalación en estructuras abiertas o con vacantes.

Otro aspecto importante es que además estos materiales pueden presentar otras propiedades físicas relacionadas con los cambios en los estados de oxidación de los elementos involucrados en la estructura de óxido. Un ejemplo notable de esto sería la aparición de superconductividad en los óxidos de cobre o el electrocromismo [38,39].

Se sabe que algunos de estos óxidos muestran comportamientos biocompatibles, lo que los convierte en materiales ideales para ser usados como electrodos en sistemas biológicos si se combina esta biocompatibilidad con su electroactividad. Así dichos óxidos pueden funcionar como electrodos de electroestimulación funcional (ya en uso el IrO_x) con mayor capacitancia y menos problemas secundarios al inyectar corriente eléctrica [39]. El presente trabajo estudia un aspecto más: la influencia que sus propiedades electroactivas puedan tener en el crecimiento celular y axonal y en la diferenciación y adhesión de neuronas; así este trabajo está enmarcado en el uso de materiales electroactivos para su uso en el crecimiento de células neurológicas y la fabricación de un “andamiaje” que sirva de soporte en las zonas de lesión.

Debido a sus conocidas propiedades como neutralizador de radicales se ha incluido en el estudio el TiO_2 que en su forma más estable no es conductor, pero del que se espera obtener un óxido mixto con iridio que reúna las mejores propiedades de ambos.

1.5 Actividad Redox en Materiales. Reacciones de Intercalación vs. Propiedades Electroactivas e Interfases

Muchos de los dispositivos que se usan hoy en día involucran materiales electroactivos que exhiben conductividad iónica, electrónica o mixta. Algunos ejemplos notables son las baterías de los teléfonos móviles, los ordenadores o los dispositivos de marcapasos. Otros ejemplos serían las pilas de combustible, los sensores electroquímicos como los de glucosa, las ventanas inteligentes que cambian de color cuando se inducen cambios redox en sus electrodos mediante la aplicación de una corriente o voltaje controlados, o los dispositivos fotoelectroquímicos en celdas solares. En general, estas aplicaciones están basadas en cambios en el estado de oxidación de los elementos del material con intercalación simultánea o desintercalación de iones sin cambios estructurales sustanciales. Es importante remarcar que el proceso electroquímico subyacente comienza siempre en la superficie del material y por lo tanto no solo es importante el material en su forma masiva (bulk) sino que también la composición superficial y la micro y nanoestructura son fundamentales. En el caso de los biomateriales, la superficie cobra doble importancia con respecto a la interacción material-célula siendo la interfase la que permitirá la adhesión celular y la transmisión de impulsos eléctricos y efectos electroquímicos.

El primer ejemplo de electroactividad basada en reacciones de intercalación fue observado en el grafito y por ello este ha sido ampliamente utilizado en dispositivos electroquímicos. Éste puede presentar reacciones de reducción y oxidación con intercalación o desintercalación de cationes o aniones.

Los óxidos, y entre ellos los óxidos en forma de capa fina han presentado algunos ejemplos de intercalación impresionantes, casi siempre catiónica. La más usual es la intercalación de Li^+ que permite el uso de baterías de litio en aplicaciones diarias, en el LiCoO_2 o en el $\text{Li}_3\text{Mn}_2\text{O}_4$. Por ejemplo los cupratos superconductores han demostrado tener, además de nuevas propiedades físicas, una facilidad substancial de intercalar y desintercalar oxígeno en la estructura, durante procesos redox que dependen de la temperatura y la presión de oxígeno y que pueden ser favorecidos electroquímicamente a temperatura ambiente. Muchas

veces la variación de la estequiometría del oxígeno es pequeña aunque su efecto en la modificación de sus propiedades físicas (superconductividad o la modulación de su temperatura crítica, T_c) es notable [40].

Se han reportado trabajos en algunos aspectos relacionados: la estequiometría del oxígeno en el La_2CuO_4 puede ser controlada en un medio acuoso, orgánico o en nitratos fundidos (150°C y superior) de modo que la intercalación de 0.14 átomos de oxígeno por fórmula unidad induce superconductividad a una T_c de 45 K [41-43]. La familia equivalente de manganeso cambia su momento magnético más de un 400% a temperatura ambiente por el mismo procedimiento. El $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ y el La_2NiO_4 responden de manera similar. Esta intercalación de oxígeno puede ser fácilmente seguida con una micro balanza de cuarzo electroquímica acoplada a experimentos electroquímicos que muestran que este procedimiento es reversible, y que en presencia de agua ocurre simultáneamente con la formación de O_2 . El ejemplo mas reciente involucra un mayor grado de intercalación de oxígeno que eventualmente lleva a una transición de fase en estado sólido a temperatura ambiente. Así, algunos óxidos de cobre-plata recientemente descubiertos, responden a esa reacción incluso en la forma de suspensiones y a la transformación del tipo $\text{Ag}_2\text{Cu}_2\text{O}_3 + \text{O}^{\delta-} \rightarrow \text{Ag}_2\text{Cu}_2\text{O}_4 + \delta e^-$ por la oxidación electroquímica en medios alcalinos [44-48].

La electroactividad así descrita acompañada de cambios en el estado de oxidación puede resultar en cambios de propiedades físicas como en el caso de superconductores de T_c alta o ser aplicada en dispositivos de energía, pero también puede servir de base en sistemas biológicos para inducir cambios en tejidos vivos favoreciendo cambios en el medio biológico y su campo intrínseco. Ello modificaría la regeneración axonal o el crecimiento neuronal, a través de la interacción del medio con los campos eléctricos, con cambios de las propiedades de la superficie, o en su microestructura, modificando el entorno y en su caso favoreciendo el crecimiento y la regeneración de lesiones [2] sin generar reacciones tóxicas o formación de radicales.

1.6 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos son:

- Obtener materiales biocompatibles basados en TiO_2 en forma de capas sobre substratos de ITO y cuarzo.
- Obtener capas de IrO_x electroquímicamente y estudiar su proceso de síntesis y su grado de dopaje/oxidación, en función del potencial.
- Combinar los óxidos de titanio e iridio en un compuesto mixto que reúna las propiedades electroquímicas y biocompatibles de los óxidos de partida.
- Caracterizar las propiedades estructurales, químicas y electroquímicas de estos 3 tipos de materiales tanto en seco como inmersos en soluciones fisiológicas.
- Estudiar la interacción de células neuronales con estos biomateriales.
- Utilizar la información generada de la caracterización de las diferentes propiedades y de la interacción célula/biomaterial con el fin de optimizar la capacidad como soporte para el crecimiento neuronal de estos materiales.
- Evaluar en una primera aproximación su uso como electrodo en presencia de células neuronales.

1.7 Referencias Bibliográficas

1. McCAIG C.D; SONG B. and RAJNICEK A.M. *J. of Cell Sci.* v. 122, p. 4267-42.76, 2005.
2. MCCAIG, D. et al. *Physiol. Rev.* v. 85, p. 943-978, 2005.
3. SLAVCHEVA E. et al. *J. Electrochem. Soc.* v. 151, n. 7, p. E226-E237, 2004.
4. SONG, H.K. et al. *Biomaterials.* v. 27, p. 473-484, 2006.
5. RICHARDSON-BURNS, S.M. et al. *Biomaterials.* v. 28, p. 1539-1552, 2007.
6. TUSZYNSKI and KORDOWER. *CNS Regeneration, Basic Science and Clinical Advances.* Academic Press, San Diego-USA, 1999.
7. MILHORAT T.H. et al. *J Neurosurg* v. 82, p. 802–812, 1995 .

8. TUSZYNSKI M.H. et al. *J Neurotrauma*, v. 16, p. 523–531, 1999.
9. BUNGE R. et al. *Adv Neuro.l* v. 72, p. 305–315, 1997.
10. NORENBORG M.D. et al. *J Neurotrauma*. v. 21, p. 429-440, 2004.
11. BRUCE J.H. et al. *J Neurotrauma*. v. 17, p. 781-788, 2000.
12. HUGHES J.T. and BROWNELL B. *J Neurol Neurosurg Psychiat.* v. 26, p. 528-534, 1963.
13. BUNGE M.B. *Prog Brain Res*. v. 137, p. 275-282, 2002.
14. LI Y. et al. *Science*. v. 277, p. 2000-2002, 1997
15. RAMÓN-CUETO et al. *Neuron*. v. 25, p. 425–435, 2000.
16. COLLAZOS-CASTRO J.E. et al. (2005) *J Neurosurg Spine*. v. 3, p. 308-317, 2005.
17. FOUAD K. et al. (2005) *J Neurosci*. v. 25, p. 1169 –1178, 2005.
18. COLLAZOS-CASTRO J.E. et al. *J Neurotrauma*. v. 22, n. 5, p. 544-558, 2005.
19. KONONENKO, N.I; MEDINA, I; DUDEK, F.E. *Neuroscience* v. 129, n. 1, p. 85-92, 2004.
20. REJNICEK, A.M; SMITH, L.E; McCAIG, C.D. *Mol. Biol. Cell*. v. 13, p. 1849, 2002.
21. CIOMBOR, D.M; AARON, R.K. *J. Cell. Biochem*. v. 52, n. 1, p. 37-41, 1993.
22. SONG, B. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America* v. 99, n. 21, p. 13577-13582, 2002.
23. LI, X.F; KOLEGA, J. *J. Vasc. Res*. v. 39, n. 5, p. 391-404, 2002.
24. RICKLE, A. et al. *Neuroreport* v. 15, n. 5, p. 955-959, 2004.
25. MOSS J. et al. *Brain* v. 127, n. 12, p. 2755-2763, 2004.
26. MCCREERY, D.B. et al. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* v. 37, n. 10, p. 996-1001, 1990.
27. WEILAND J.D; ANDERSON D.J. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* v. 47, n. 7, p. 911-918, 2000.

28. COLLAZOS-CASTRO J.E. et al. *Thin Solid Films*. v. 518, p. 160-170, 2009
29. CARVALLO-VILA M. *J Biomed Mater Res A*. v. 90, n. 1, p. 94-105, 2009.
30. NYSKA, A; KOHEN, R. *Toxicol. Pathol.* v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.
31. PERIZZOLO D; LACEFIELD W.R; BRUNETTE D.M. *J. Biomed. Mater. Res.* v. 56, n. 4, p. 494-503, 2001.
32. KULESA, P. J; VOROOTYNTSEV, M.A. *Electrochim. Acta* v. 46, n. 26 and 27, p. 3939-3939, 2001
33. GALASSI, C. et al. *Piezoelectric Materials: Advances in Science, Technology and Applications*. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000.
34. LIU, M.L; VISCO, S.J; DEJONGHE, L.C. *J. Electrochem. Soc.* v. 138, n. 7, p. 1891-1895, 1991.
35. LACHINOV, A.N; ZHEREEBOV, A.Y; KORNILOV, V.M. *Sens. Actuators A-Phys.* v. 53, p. 319-324, 1996.
36. TAJA, S; SANKRAPAPAVINASAM, S; AHMED, M.F. *J. Appl. Polym. Sci.* v. 77, n. 1, p. 112-115, 2000.
37. KONDO, J. *Prog. Theor. Phys.* v. 29, n. 1, p. 1-19, 1963.
38. BUSSMANN-HOLDER, A; MICNAS, R. *J. Supercond.* v. 15, n. 5, p. 321-325, 2002.
39. SCHMITH, C. et al. *Conducting Polymers and Polymer Electrolytes from: Biology to Photovoltaic ACS Symposium Series* v. 832, p. 154-165, 2003.
40. VANDERAH, T.A. *Chemistry of Superconductor Materials*. New Jersey-USA, Noyes Publications, 1992.
41. CASAÑ-PASTOR, N. et al. *Physica C* v. 216, p. 478, 1993.
42. ONDOÑO-CASTILLO, S. et al. *Physica C* v. 235, p. 563-564, 1994.
43. MICHEL, C; AMIGÓ, R; CASAÑ-PASTOR, N. *Chem. Mater.* v. 11, n. 2, p. 195-197, 1999.
44. MUÑOZ-ROJAS, D. et al. *Electrochem. Comm.* v. 2, n. 9, p. 684-689, 2002.

-
45. TEJADA-ROSALES, E.M. et al. *Inorg. Chem.* v. 41, n. 25, p. 6604-6613, 2002.
 46. MUÑOZ-ROJAS, D. et al. *Cryst. Eng.* v. 5, p. 459-467, 2002.
 47. MUÑOZ-ROJAS, D. et al. *J. Solid State Chem.* v. 178, p. 295-305, 2005.
 48. MUÑOZ-ROJAS, D. et al. *J. Phys. Chem. B* v. 109, n. 13, p. 6193-6203, 2005.

Capítulo 2

Técnicas Experimentales

En este capítulo se explican los principios de las técnicas experimentales utilizadas para la síntesis y caracterización de los materiales estudiados en este trabajo de tesis. También son explicadas las condiciones y equipos de medida utilizados en cada una de ellas.

El capítulo está dividido en diferentes secciones según la función de la técnica empleada. Primero se enuncian las técnicas utilizadas en la síntesis, seguidas de las técnicas de caracterización estructural. Después se nombran las técnicas relacionadas con la microestructura de las capas y luego las que permiten el estudio de las propiedades electroquímicas del material. Por último se describen los protocolos de los cultivos celulares utilizados así como también los de inmunocitoquímica y cuantificación de la supervivencia de las células usando las capas obtenidas como sustrato.

2.1 Síntesis de las Muestras

2.1.1 Método Sol Gel

El método sol gel es una ruta química que permite fabricar materiales amorfos y policristalinos con características especiales de forma relativamente sencilla. La técnica parte de una disolución química que por hidrólisis produce un sol que gelifica. Los precursores comúnmente usados son alcóxidos o haluros metálicos que experimentan reacciones de hidrólisis y policondensación para formar el coloide en presencia de humedad. Luego el sol evoluciona hacia la formación de una red inorgánica que contiene una fase líquida llamada gel (Figura 2.1).

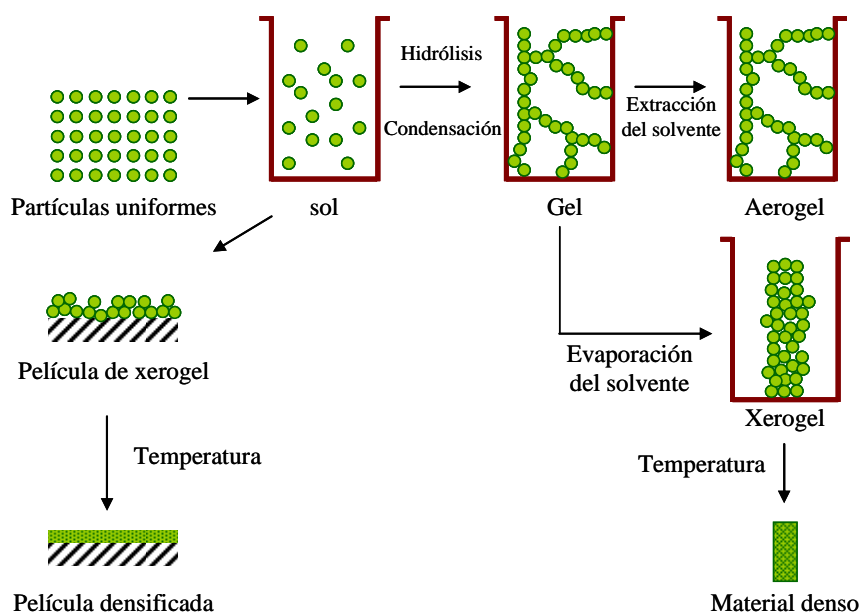


Figura 2.1 Descripción esquemática del método sol gel.

Cuando el producto de la hidrólisis es un óxido, la formación de este implica la conexión de los metales mediante puentes oxo (M-O-M) o hidroxilo (M-OH-M), lo que a su vez genera polímeros metal-oxo o metal-hidroxilo en disolución. El tratamiento térmico posterior permite eliminar la fase líquida del gel, completar la descomposición del precursor y formar el óxido.

Uno de los aspectos tecnológicos más importantes del proceso sol - gel es que antes de la gelificación, el sol puede ser utilizado para la obtención de capas finas utilizando técnicas comunes como el *dip coating*, el *spin coating* o el *spray coating*. Comparando con otras técnicas convencionales de obtención de capas finas, tales como *chemical vapor deposition*, evaporación térmica o *sputtering*, el método sol gel requiere menos equipamiento y por lo tanto los gastos son menores. Sin embargo, la principal ventaja de este método sobre otros métodos convencionales está en un mayor control de la microestructura de la película depositada, es decir, control en el volumen, porosidad y área superficial, entre otras, en función de los precursores utilizados y de la velocidad del proceso de gelificación y reacción [1].

2.1.2 Spin Coating

El *spin coating* es una técnica utilizada para la deposición de capas finas sobre substratos planos. Principalmente consiste en que una disolución es depositada en el centro de un substrato que esta girando a alta velocidad a fin de distribuir el fluido uniformemente por fuerzas centrífugas. La técnica puede ser dividida en 4 partes [1]: deposición, *spin up*, *spin off* y evaporación (Figura 2.2).

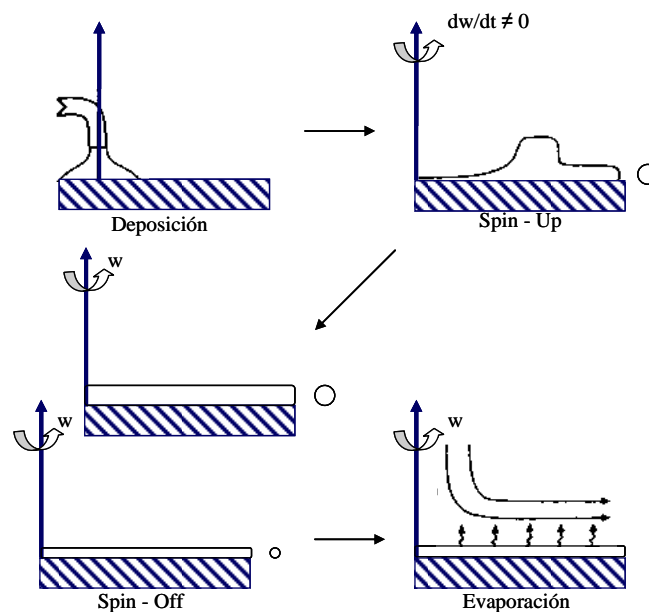


Figura 2.2 Etapas del proceso de spin coating.

Durante la etapa de deposición, el líquido es dispensado sobre la superficie. En la etapa de *spin-up* el líquido fluye radialmente hacia fuera, dirigido por la fuerza centrífuga. Luego el exceso de líquido fluye hacia los bordes en forma de gotas en la etapa de *spin off*. Como el espesor de la película va disminuyendo, la velocidad a la cual el líquido es removido durante el *spin off* decae. Así mismo, debido al aumento simultáneo de la concentración de componentes no volátiles la viscosidad del líquido aumenta lo que también disminuye su velocidad. En la última etapa el líquido se evapora siguiendo un mecanismo primario de disminución del grosor de la película.

Una de las ventajas de esta técnica es que la película formada por el líquido tiende a ser uniforme durante la etapa de *spin off*, y una vez que ha alcanzado la uniformidad tiende a permanecer, de modo que la viscosidad no es dependiente de la fricción y por tanto no varía sobre el sustrato [1]. Este equilibrio de fuerzas se refuerza durante el proceso debido al balance entre la fuerza centrífuga, que dirige el flujo radialmente hacia fuera, y la fuerza de fricción que actúa radialmente hacia adentro [1].

Las muestras del sistema de TiO_2 descritas en esta tesis fueron obtenidas por el método sol-gel. Como material de partida se utilizó el isopropóxido de titanio (99.9% $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ Aldrich 0.7 M) estabilizado en acetilacetona (99.9% Aldrich 1.4 M) que da lugar a la formación de un quelato de $\text{Ti}^{(\text{IV})}$. La formación del quelato se manifestó con el cambio de color de la disolución inicialmente transparente a un amarillo pálido y la liberación de calor. Finalmente la disolución fue diluida en 25.5 ml de etanol hasta concentraciones de titanio de 0.4 M.

A continuación, dicha disolución fue filtrada utilizando filtros de teflón de $0.2\mu\text{m}$ de poro (Filtro PTFE Nalgene) para eliminar posibles partículas en suspensión generadas en la hidrólisis. La disolución filtrada se depositó en cantidades de 0.5 ml sobre sustratos de soda lime, 60 mm x 25 mm (Solems), recubiertos con ITO (Indium Tin Oxide, espesor 300 nm) mediante la técnica de *spin coating* (Spin Processor WS-400B-6NPP-LITE/8K de Laurell Technologies Corporation) con una velocidad de rotación del sustrato de 3000 rpm (Figura 2.3). Una vez depositada la disolución, las películas fueron sometidas a tratamientos de 250°C , 350°C y 450°C durante 2 horas. Con el objetivo de aumentar el grosor de la

película el procedimiento fue repetido hasta 3 veces. Para estudiar el efecto del sustrato sobre la microestructura obtenida y evaluar tratamientos térmicos más fuertes se realizó el mismo proceso con sustratos de cuarzo (74 mm x 25 mm de VWR International) y las muestras fueron sometidas además a tratamientos térmicos hasta temperaturas más elevadas (350°C 450°C, 500°C y 600°C durante 2 horas). El uso de sustratos de cuarzo permitió evaluar aspectos adicionales de la capa final obtenida como se verá en el capítulo 3.

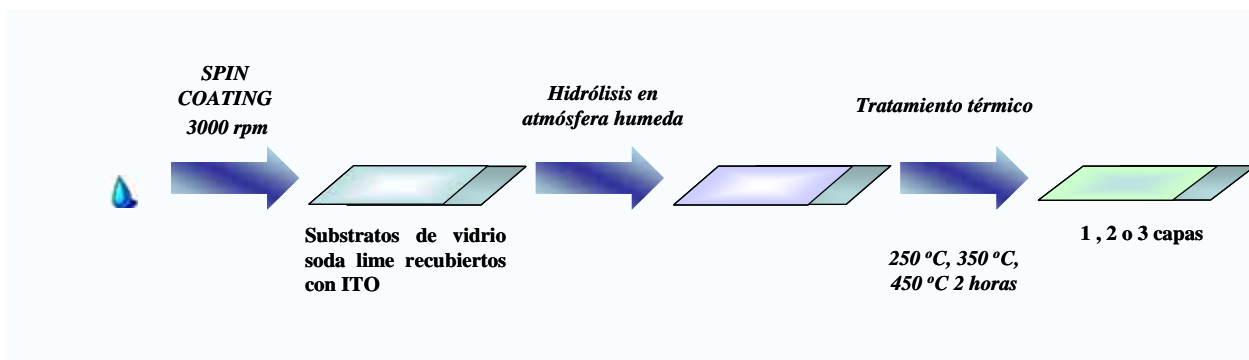


Figura 2.3 Esquema de deposición por Spin Coating.

2.1.3 Síntesis Electroquímica

La aplicación de métodos electroquímicos permite realizar procesos de síntesis con condiciones de potencial o corriente controladas que facilitan el control de las fases obtenidas y a su vez el control de la microestructura y de la homogeneidad de los recubrimientos. Los métodos electroquímicos se distinguen por su alta sensibilidad y selectividad, y otras ventajas de tipo tecnológico como utilizar la energía eléctrica como reactivo “limpio”, trabajar en condiciones de operación ambientales (temperatura y presión) y regenerar ciertos agentes oxidantes y reductores en electrosíntesis por vía directa entre otros. Además permite el uso de sustratos de cualquier geometría permitiendo el depósito del recubrimiento incluso en formas tradicionalmente no accesibles.

En el presente trabajo se mostrarán las técnicas que han sido utilizadas para la síntesis de óxidos (IrO_x) y para procesos de caracterización de la reacción de síntesis y del dopaje posterior del óxido una vez obtenido como recubrimiento.

2.1.3.1 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Estático de Potencial de Electrodo o de Corriente.

En general los procesos de síntesis se realizan a A) potencial de electrodo constante, lo que permite impedir reacciones adicionales que ocurren a otros potenciales, o B) a corriente constante, en casos donde no hay otras interferencias y se pretende obtener una velocidad constante de formación de un producto, como en el caso de la electrocristalización/electrodeposición. Adicionalmente, el uso de potenciales pulsados, o de barridos de potencial aporta un método alternativo de control de la microestructura, adhesión etc. La electrodeposición es una de las técnicas mas utilizadas actualmente para la preparación de IrO_x .

2.1.3.2 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Dinámico de Potencial: Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica (CV) es un tipo de voltametría que utiliza tres electrodos (electrodo de trabajo, contra-electrodo y electrodo de referencia) sumergidos en una disolución sin agitación, de modo que la corriente medida es limitada por la difusión del analito en la superficie del electrodo en caso de que éste esté disuelto. En esta técnica, el potencial del electrodo parte del reposo y es elevado a un potencial más negativo (o más positivo) a una cierta velocidad hasta alcanzar el valor deseado y después es llevado al potencial de reposo nuevamente. Cuando se produce un proceso de transferencia de carga entre el conductor eléctrico y el iónico a un potencial determinado, como por ejemplo la reducción, la corriente aumenta hasta un valor máximo pero después decae generando una onda ya que la concentración del analito se agota cerca de la superficie del electrodo. Al barrer en el sentido contrario se alcanza el potencial de oxidación del producto formado en la reacción de reducción produciendo una corriente de polaridad inversa. Esta onda tiene una forma similar a la de reducción si el proceso es reversible (Figura 2.4). La existencia de reacciones secundarias para el producto, o de reorganización estructural en un sólido formado puede hacer aparecer nuevas ondas o dar lugar a una ausencia en el barrido de retorno.

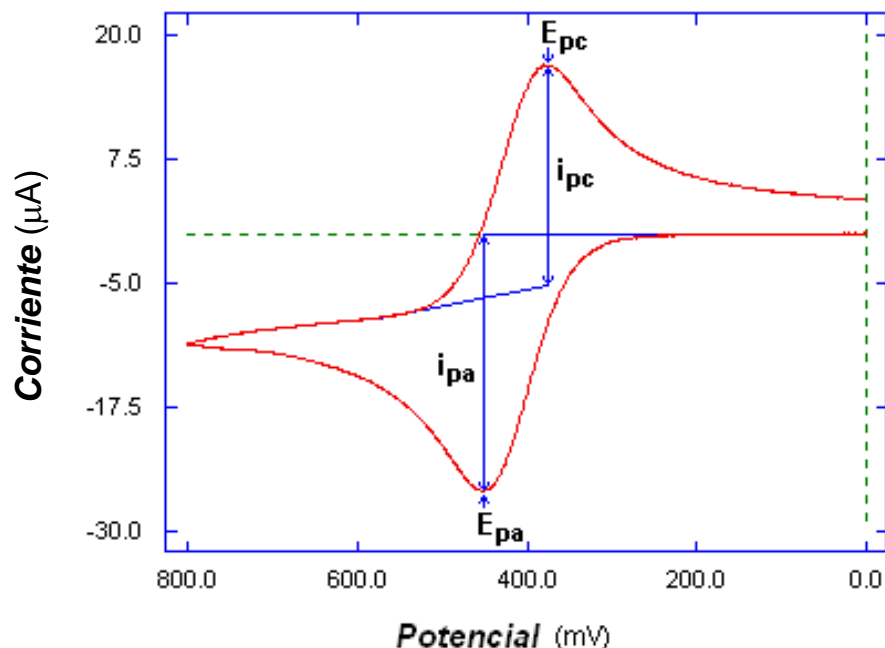


Figura 2.4 Esquema general de una voltametría cíclica.

Una técnica de barrido similar, puede ser utilizada en un proceso de síntesis equivalente a un barrido de potencial dinámico cuando las condiciones de cristalización a potencial o corriente constantes no son óptimas [2], por ejemplo en un proceso de deposición.

El óxido de iridio se ha obtenido tradicionalmente mediante procesos a corriente constante, que en general son los preferidos cuando existe un proceso de cristalización único y no interfieren otros procesos químicos [3]. Sin embargo, los experimentos realizados en este trabajo muestran una rugosidad notable del depósito final por lo que se abordó la síntesis mediante un barrido de potencial entre el potencial de reposo y el potencial al que se observa el máximo de la onda de oxidación. Esto permite mejorar la microestructura final mediante la homogenización de zonas de mal crecimiento.

Las muestras de óxido de iridio fueron obtenidas por electrodeposición a corriente constante según el método propuesto por M.A. Petit et al. [3] y mediante barridos de potencial cíclicos (CV). Se partió de una disolución de $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mmol) disuelta en 30 ml de agua. Después se añadió ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol) y carbonato de potasio anhidro (K_2CO_3 5 mmol) hasta alcanzar un

pH de 10; la disolución tomó un color verde pálido durante la neutralización. El volumen fue ajustado entonces a 50 ml y la disolución fue mantenida a 37 °C durante 4 días. Después de este periodo la disolución se tornó azul y fue estabilizada a 4 °C hasta su utilización en la síntesis. El cambio de color está relacionado con un cambio en la coordinación y/o en el estado de oxidación del iridio.

Dicha disolución fue utilizada para la deposición de IrO_x mediante electrólisis a corriente constante ($35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) y a potencial dinámico (CV) (Figura 2.5), utilizando un hilo y una placa de platino como electrodo de referencia y contra-electrodo respectivamente (el Pt usado como pseudo referencia es equivalente a Ag/AgCl). El substrato (electrodo de trabajo) fue una pieza transparente de vidrio soda lime (76 mm x 25 mm de AFORA) recubierto con 5 nm de titanio y 12 nm de platino. La deposición del titanio y del platino de los estratos se realizó por evaporación térmica en el laboratorio de Óptica de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las dimensiones del contra-electrodo de platino fueron iguales a las del electrodo de trabajo.

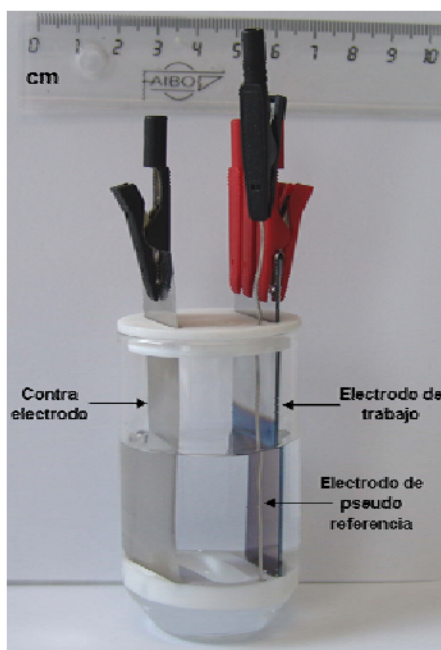


Figura 2.5 Esquema de la síntesis electroquímica de las capas de óxido de iridio.

El barrido de potencial fue realizado desde el potencial de circuito abierto ($\approx 0.0V$) hasta $0.55 V$ vs. Pt, con velocidades de 2, 10 y 50 mV/s. Con el fin de obtener muestras de diferentes grosores la voltametrías cíclicas fueron de 50 y 100 ciclos. Las capas óptimas fueron obtenidas a 10 mV/s con 50 ciclos. Tras la deposición las capas fueron lavadas abundantemente con agua Milli-Q.

Para asegurar la máxima homogeneidad del campo eléctrico creado, el contra electrodo de Pt se colocó siempre equidistante (1.5 cm) del de trabajo, a cualquier altura mediante 2 piezas de teflón diseñadas a tal efecto.

Una vez obtenidos los depósitos, se realizaron voltametrías en un rango de voltaje de $-1V$ a $1V$ vs. Pt, en diferentes medios tanto para el sistema IrO_x como para el de TiO_2 y el óxido mixto con el fin de evaluar los potenciales de reducción y oxidación en cada sistema.

Las voltametrías cíclicas fueron realizada mediante un potenciostato/galvanostato VMP3 de Bio-logic Science Instruments a una velocidad de 2 mV/s.

2.2 Caracterización Estructural

2.2.1 Difracción de Rayos X de ángulo Rasante (GIXRD)

La difracción de rayos X en polvo fue utilizada para la identificación de fases cristalinas en los depósitos obtenidos. La difracción de rayos X no es una técnica originalmente dirigida al estudio de superficies, sin embargo, las nuevas tecnologías han creado fuentes de rayos X de alta intensidad, dando la posibilidad de obtener información de la superficie observando las desviaciones de la dispersión del material en *bulk* y atribuyéndolas a la superficie, ya que una pequeña parte de la difracción de una fuente de rayos X sobre un material en *bulk* es debida a la superficie.

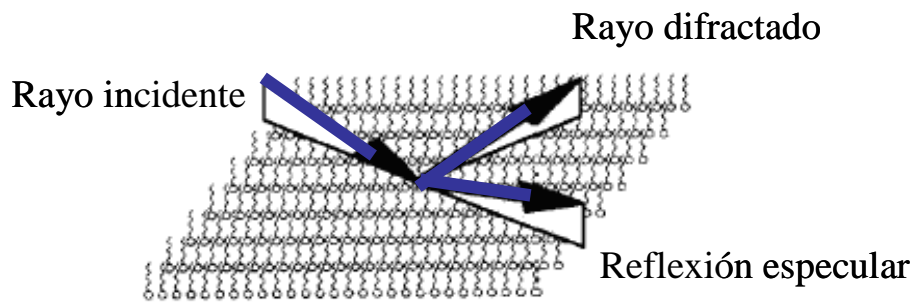


Figura 2.6 Diagrama esquemático de un experimento de difracción de ángulo rasante.

En este trabajo se utilizó configuración de ángulo rasante, (Figura 2.6), para obtener información sobre la estructura cristalina de las capas. Esta configuración es de superficie selectiva, es decir que evita en gran parte la dispersión del sustrato donde está depositada la película y no requiere un sustrato transparente a los rayos X. Esta técnica esta basada en el hecho de que para muchos materiales el índice de refracción es ligeramente menor que 1. Por lo tanto, es posible obtener la reflexión total de la superficie si el ángulo de incidencia es lo suficientemente pequeño (típicamente de 1 – 25 miliradianes o 0.05 a 1.5° dependiendo de la densidad electrónica del sustrato y de la energía de la fuente de rayos X). En esta configuración el sustrato no es completamente invisible a los rayos X, pero este solamente es penetrado por una onda evanescente que se dispersa en su interior. Es posible incrementar el área superficial irradiada reduciendo el ángulo incidente, produciendo que la onda evanescente se disperse hacia fuera muy rápido.

Tanto las películas de óxido de titanio como las de óxido de iridio y el óxido mixto fueron analizadas por difracción de rayos X de ángulo rasante en los servicios científico técnicos de la Universitat de Barcelona. Fueron utilizados ángulos de incidencia de 0.3° y 0.5° en un difractómetro Siemens D5000, equipado con una fuente paralela con un paso de 0.05° y radiación Cu K alpha ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$).

2.2.2 Reflectometría de Rayos X

Muchas de las aplicaciones de los materiales sintetizados en capas finas requieren espesores específicos ya que muchas de las propiedades son dependientes de este parámetro. La alta precisión en la determinación de los

espesores de las capas es un parámetro crucial en las nuevas tecnologías por lo que existen diferentes técnicas dependiendo del material en estudio. La reflectometría de rayos X es una técnica no destructiva que determina espesores entre 2-200 nm con una precisión de aproximadamente 1-3 Å. La técnica consiste en el barrido de una fuente de rayos X reflejada sobre la superficie de la muestra a ángulos muy pequeños. La fuente monocromática de longitud de onda λ irradia la muestra a un ángulo bajo ω y la intensidad que se refleja en un ángulo 2θ es registrada por un detector. La reflexión en la superficie y en las interfases es debida a la diferencia en la densidad electrónica de las diferentes capas, a las que corresponden diferentes índices de refracción (en ángulos superiores a un ángulo crítico θ_c hay reflexión total externa y la reflexión ocurre tanto encima como debajo de la superficie). La interferencia entre estos dos rayos reflejados produce franjas de interferencia que no dependen de la frecuencia como en el caso de la microscopía óptica, pero si son dependientes del ángulo de incidencia. La diferencia de camino medio entre la onda incidente y la reflejada es un múltiplo entero de la longitud de onda incidente y está dada por:

$$m\lambda = 2d\sqrt{(\theta_m^2 - \theta_c^2)} \quad (2.1)$$

donde d es grosor de la capa, θ_m es el ángulo de incidencia, θ_c es el ángulo crítico y λ es la longitud de onda del haz.

Esta técnica fue empleada en este trabajo para determinar el grosor de las capas finas de IrO_x y TiO_2 con las mismas condiciones experimentales descritas en la GIXRD.

2.2.3 Análisis Termogravimétrico (ATG)

Con el objetivo de evaluar la pérdida de peso de las capas de IrO_x electrodepositadas se realizaron medidas de termogravimetría. Las medidas fueron realizadas en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona mediante un equipo de análisis térmico NETZSCH STA 449 F1 Jupiter[®]. En el caso de las medidas en aire fue realizado un Plateau inicial a 30°C durante 1 hora, después se

subió con una velocidad de 2°C/min hasta una temperatura de 300°C que se mantuvo durante 1 hora. También fueron realizadas medidas en atmósfera de Ar/H₂ (5%) con el mismo Plateau inicial a 30°C y la misma velocidad de calentamiento. En este caso se realizaron 3 rampas, una 100°C, 300°C y una última a 600°C de 1 hora cada una.

2.2.4 Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Mediante la técnica de XPS es posible realizar la identificación de los elementos que componen la superficie de la muestra. Se puede también evaluar la composición cuantitativa de estos (20-30 Å de espesor). Las líneas espectrales de XPS son identificadas por el nivel de energía del cual el electrón es expulsado o arrancado (1s, 2s, 2p, etc.).

Las muestras fueron analizadas por XPS en tres equipos diferentes. Las muestras de TiO₂ fueron analizadas en su mayoría en el Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2) con un analizador semiesférico SPECS EA10P a temperatura ambiente usando una fuente monocromática de radiación Al K α (1486.6 eV) como fuente de excitación a una presión de 10⁻⁹ mBar. Las muestras de IrO_x e (Ir-Ti)O_x fueron analizadas en el Instituto de Nanociencia de Aragón con un equipo marca Kratos Analytical modelo AXIS Ultra DLD equipado con una fuente de rayos X de aluminio monocromático (Al K alpha: 1486.6 eV) con potencia máxima de 15 kV x 15 mA y una presión en cámara de análisis de 2x10⁻⁹ Torr . Algunas muestras de los tres materiales expuestos en este trabajo fueron analizadas en los servicios científico técnicos de la Universitat de Barcelona con un PHI 5500 Multitechnique System (Physical Electronics) con una fuente de rayos X monocromática (Al K alpha: 1486.6 eV) perpendicular al eje del analizador y calibrada usando la línea 3d_{5/2} de la Ag con un ancho máximo a la altura media (FWHM) de 0.8 eV. Todas las medidas fueron realizadas en una cámara de presión de ultra alto vacío (UHV) entre 5x10⁻⁹ Torr y 2x10⁻⁸ Torr. En todos los equipos fue diseñado un protocolo específico para cada tipo de muestra dependiendo de los elementos presentes. Las energías fueron determinadas con un error de ± 0.3 eV. Las cuantificaciones de las señales de los espectros generales de XPS así como las deconvoluciones y los ajustes de los espectros detallados del C

1s y del O 1s fueron realizados por medio del programa MULTIPAK. En el caso de los ajustes, los picos fueron deconvolucionados mediante combinaciones de Gaussianas-Lorentzianas en diferentes proporciones.

2.2.5 Análisis Químico

Con el objetivo de complementar la información obtenida de los espectros de XPS se realizó un análisis químico de las muestras. Los experimentos fueron realizados en los servicios científico técnicos de la Universitat de Barcelona mediante la técnica de Plasma de Inducción acoplada con Espectroscopia de Masas (ICP-MS) en un equipo Perkin Elmer ELAN 6000, en condiciones estándar. Las medidas fueron calibradas con 5 patrones preparados con HCl 1% utilizando el rodio como patrón interno.

En el caso de las capas de TiO_2 las muestras fueron sumergidas en 12 ml de agua Milli-Q durante 1, 3 y 30 días. El líquido resultante del remojo fue estabilizado en HCl 0.1M y llevado a análisis. En el caso de las capas de IrO_x se analizaron 4 tipos de disoluciones:

- Disolución 1: La capa de IrO_x fue sumergida en agua durante 7 días en 12 ml de agua Milli-Q. Luego los 12 ml del agua del remojo fueron estabilizados en HCl 1M y llevados a análisis.
- Disolución 2: La capa de IrO_x fue sumergida durante 7 días en 20 ml de HCl 0.1M. Luego los 20 ml del remojo fueron estabilizados en HCl 1M y llevado a análisis.

El análisis de las dos primeras disoluciones nos dará el contenido en metales que se disuelven.

- Disolución 3: La capa de IrO_x sumergida en agua para obtener la disolución 1 fue disuelta en 20 ml de agua regia después del remojo. La disolución resultante fue estabilizada en HCl 1M y llevada a análisis.
- Disolución 4: La capa de IrO_x sumergida en HCl para obtener la disolución 2 fue disuelta en 20 ml de agua regia después del remojo. La disolución resultante fue estabilizada en HCl 1M y llevada a análisis.

El análisis de la disolución 3 y 4 nos dará el contenido en metales de la muestra después de la inmersión en agua.

2.2.6 Espectroscopia Raman

Las medidas de Micro-Raman de las capas de TiO_2 fueron realizadas en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona/UAB a temperatura ambiente usando una línea de 5145 \AA de un láser de argón con un espectrómetro Jovin-Yvon T-64000 Raman equipado con un microscopio Olympus con un detector de nitrógeno superenfriado CCD. Los espectros raman fueron registrados con una geometría retrodispersada. El spot del láser sobre las muestras fue de $\sim 2 \mu\text{m}$ de diámetro. La cristalinidad de las muestras, así como su conductividad afectan la observación del espectro Raman. En el primer caso la falta de coherencia de la red puede impedir ver la señal vibracional. Mientras que en el segundo caso la relajación inducida por mecanismos de conducción electrónica (por ejemplo de tipo polarónico) ensancha las bandas Raman hasta el punto de poder hacerlas invisibles [4].

2.2.7 Espectroscopia de Infrarrojo

Las medidas de infrarrojo fueron realizadas en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona en Modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR) mediante un espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer HART con un accesorio ZeSe flat plate de 60° . La fuerza absoluta de las medidas fue de aproximadamente 135.

2.2.8 Espectroscopia de Absorción de Rayos X (XAS)

Cuando los rayos X inciden en una muestra el campo eléctrico proveniente de la radiación electromagnética interactúa con los electrones en un átomo. Esta radiación será dispersada por dichos electrones, o absorbida de tal manera que los electrones serán excitados (Figura 2.7).



Figura 2.7 Esquema de la incidencia de rayos X sobre una muestra.

Si el haz monocromático de intensidad I_0 atraviesa una muestra de espesor x la intensidad transmitida está definida por la expresión:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \mu x \quad (2.2)$$

donde μ es el coeficiente de absorción lineal que depende del tipo de átomos y ρ la densidad del material. A ciertas energías donde la absorción aumenta drásticamente se genera un borde de absorción. El borde de absorción ocurre cuando la energía de un fotón incidente es suficiente para excitar un electrón central del átomo absorbente a un estado continuo, i.e. produce un fotoelectrón. Así, las energías de la radiación absorbida de estos bordes corresponden a las energías de enlace de los electrones en las capas K, L, M etc. de los elementos absorbentes. Los bordes de absorción son nombrados en el orden creciente de energía K, L_I, L_{II}, L_{III}, M_I ... correspondiendo a la energía de un electrón de los orbitales 1s (²S_{1/2}) 2s (²S_{1/2}) 2p (²P_{1/2}) 2p (²P_{3/2}) 3s (²S_{1/2}) ... respectivamente.

Cuando el fotoelectrón deja el átomo absorbente, su onda es retrodispersada por los átomos vecinos.

Un espectro de absorción de rayos X se divide en 4 secciones (Figura 2.8):

1. Pre – borde ($E < E_0$).
2. Estructura del espectro de absorción de rayos X cerca al borde (XANES) donde la energía de la fuente de rayos X incidente es $E = E_0 \pm 10 \text{ eV}$.

3. Estructura fina del espectro de absorción de rayos X cerca al borde (NEXAFS), en la región entre 10 eV y 50 eV por encima del borde.
4. Estructura fina del espectro de absorción de rayos X extendida (EXAFS) la cual empieza aproximadamente en 50 eV y continúa por encima de 1000 eV alejado del borde.

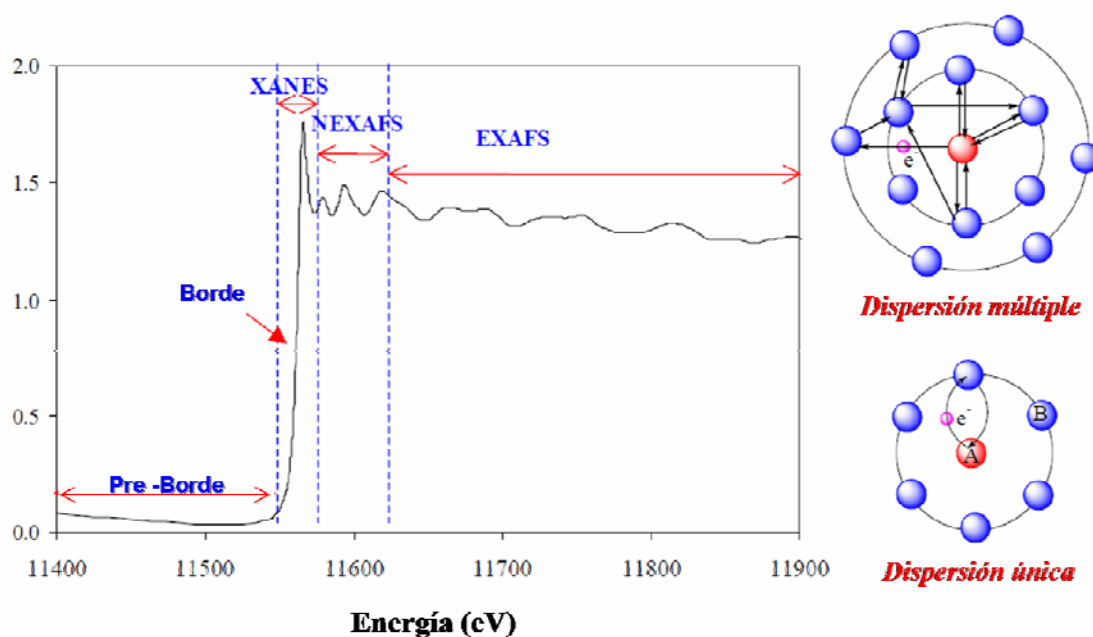


Figura 2.8 Ejemplo de un espectro de absorción de Rayos X.

Las características de menor importancia en la región de pre-borde suelen ser debidas a transiciones de los electrones centrales a un orbital más alto vacío o semi vacío (por ejemplo $s \rightarrow p$, o $p \rightarrow d$). En la región XANES, se dan a lugar transiciones de los electrones centrales a niveles no coordinados con energías cercanas. Debido a la alta probabilidad de este tipo de transiciones, la energía de absorción aumenta considerablemente. En NEXAFS los fotoelectrones emitidos tienen una energía cinética baja ($E-E_0$ es muy pequeño) y experimentan múltiples dispersiones por el primer y subsecuentes niveles de coordinación. Por otro lado, en la región EXAFS los fotoelectrones emitidos tienen energía cinética alta ($E-E_0$ es grande), y normalmente domina una única dispersión cerca de los átomos vecinos [5].

En este trabajo las medidas de XAS de las capas de IrO_x fueron realizadas en la línea BM29 en el ESRF (Grenoble, Francia). Se utilizó un monocromador de

doble cristal Si(111) con una energía de resolución de $\Delta E/E \approx 10^4$. Los espectros XANES y EXAFS fueron medidos a temperatura ambiente en modo de fluorescencia usando un detector 13-element de Ge en estado sólido. Para minimizar la contribución de la línea de fluorescencia L_α del Pt del sustrato, la cual se solapa con la línea de fluorescencia L_α del Ir, se utilizó un ángulo de incidencia de 0.15° (por encima del ángulo crítico) con respecto a la superficie de la muestra (Figura 2.9). La energía del borde L_3 del Ir, i.e. 11.220 eV fue calibrada con la medición simultánea del espectro del Ir metálico (en modo transmisión).

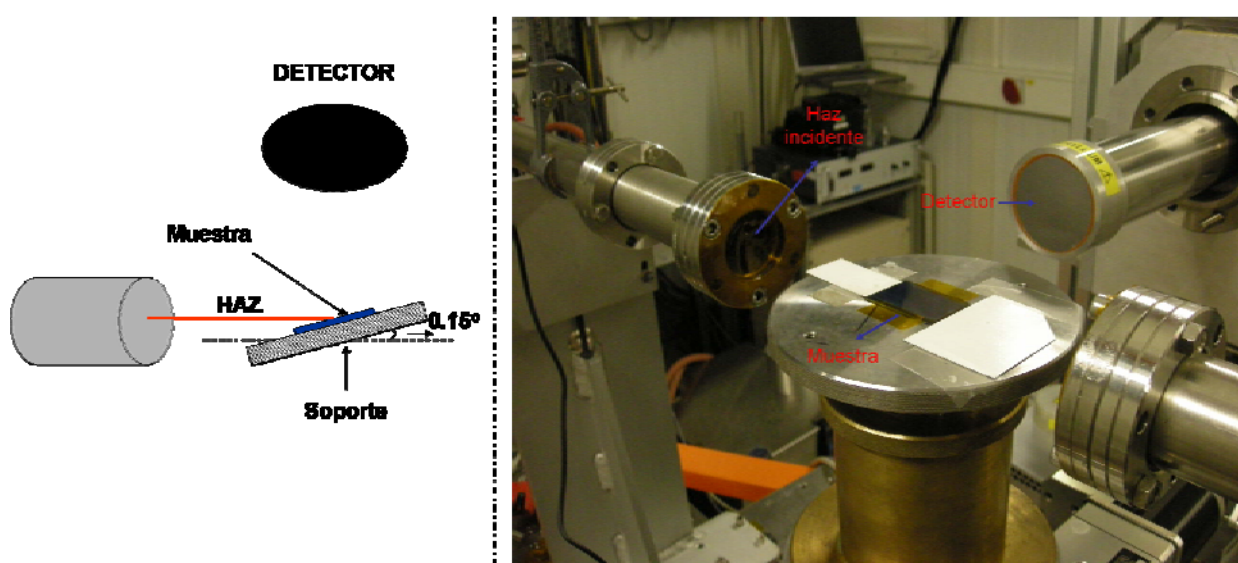


Figura 2.9 Configuración utilizada en las medidas de XAS de muestras de IrO_x .

Cada punto fue medido durante 5 s y se promediaron varios espectros en todas las medidas para conseguir la mejor relación señal/ruido. El promedio de espectros, la substracción del ruido de fondo y la normalización requerida para obtener la señal $\chi(k)$ fueron realizados mediante el programa Athena (versión 0.8.058) [6]. La transformada de Fourier (FT) de las k -weighed de los espectros EXAFS fue calculada entre 3 y 12 \AA^{-1} usando una función seno.

El mejor ajuste de los datos fue realizado con el programa Artemis (versión 0.8.013) [7,8] en el modo de ajuste espacio-R hasta 4 \AA para obtener la distancia de enlace promedio (R), el número de coordinación (N) y el factor de Debye-Waller (σ^2) para cada capa de coordinación Ir-O e Ir-Ir, ajuste que fue realizado por la Dra. Gloria Subías de la Universidad de Zaragoza.

2.3 Caracterización Microestructural

2.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microestructura de la superficie de las capas fue observada por medio de un microscopio SEM QUANTA FEI 200 FEG-ESEM (Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona) con un potencial de 5 kV y una presión de 50 Pa. El grosor de algunas de las capas pudo ser evaluado también utilizando dicho microscopio.

2.3.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microestructura fue también analizada mediante AFM en modo dinámico con un microscopio Pico Plus Molecular Imaging utilizando puntas de silicio de 10 y 4 nm. La fuerza del cantilever utilizada fue de aproximadamente 40 N/m y la frecuencia de resonancia fue de 170 kHz. Fueron escogidas al azar 10 áreas de cada muestra para evaluar la rugosidad y el tamaño de grano presentes mediante un análisis global de las imágenes utilizando el software Mountains. Los valores de rugosidad fueron calculados a partir de la relación:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - z)^2} \quad (2.3)$$

donde z_i es la altura del punto (x_i, y_i) tomado de la imagen de AFM, N es el número de puntos de la medida y z está definida por:

$$z = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - z) \quad (2.4)$$

2.3.3 Ángulo de Contacto

El ángulo de contacto de los substratos utilizados, definido como el ángulo θ que se forma entre una fase líquida (en forma de gota) que está en contacto con la superficie (Figura 2.10A), fue realizado mediante un Pocket Goniometer modelo PG2 a temperatura ambiente con micro gotas de agua Milli-Q y medio de cultivo

Neurobasal (Invitrogen) (Figura 2.10B). El ángulo de contacto es una medida de la hidrofiliicidad de la muestra.

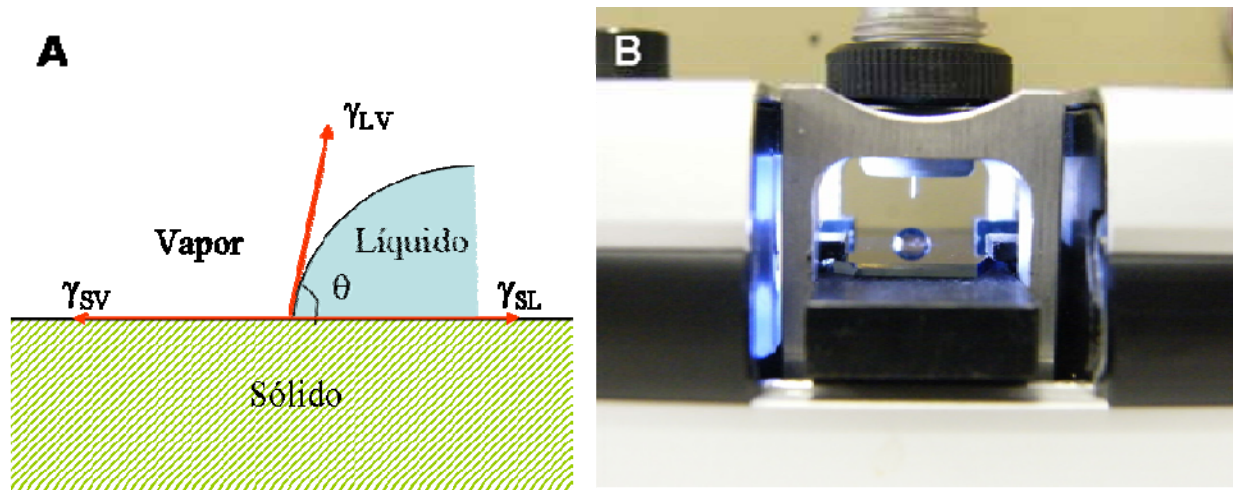


Figura 2.10 A) Unión de las tensiones interfaciales de una superficie sólida en contacto con un líquido y B) Equipo utilizado en la medida del ángulo de contacto.

2.4 Caracterización Eléctrica y Electroquímica

Además de los métodos de caracterización electroquímica tipo voltametría cíclica que se describen en el apartado 2.1.3.2 se han utilizado las siguientes técnicas de caracterización eléctrica y electroquímica:

2.4.1 Microbalanza de Cuarzo Electroquímica (EQCM)

La EQCM (Seiko EGyG PAR) acoplada a un potenciostato/galvanostato VMP3 Bio Logic fue utilizada en las muestras de IrO_x para calcular la cantidad de masa depositada durante la síntesis electroquímica. Para ello se utilizaron como electrodos cristales de cuarzo de 0.157 cm de diámetro recubiertos con Pt (suministrados por EGyG PAR). También se evaluó la adhesión de la polilisina utilizada como interfaz entre el material y las células neuronales en los cultivos (proceso descrito en apartado 2.5) Además, se estudió el proceso de dopaje una vez el material estaba ya formado, en los respectivos procesos de reducción y oxidación.

2.4.2 Espectroscopia de Impedancia Compleja Electroquímica (EIS)

Las medidas de EIS fueron realizadas con el propósito de evaluar la capacidad de transferencia de carga y el flujo de corriente de las capas de IrO_x y $(\text{Ir-Ti})\text{O}_x$ en un sistema real que incluye la interfase, y no solamente a través del material. Estas medidas fueron llevadas a cabo mediante un potencióstato Autolab PGSTAT302N - High performance con la misma configuración utilizada en la síntesis electroquímica usando una placa de platino como contra electrodo, un hilo de platino como electrodo de referencia y el material en estudio como electrodo de trabajo, los tres sumergidos en NaCl 0.1 M como electrolito. En todos los casos se aplicó un potencial alterno de 5 mV de amplitud en un barrido de frecuencia de 1MHz a 40Hz. En algunos casos se aplicó un potencial bias de $\pm 0.5\text{V}$ para oxidar o reducir el material in situ.

2.4.3 Current Sensing AFM

Las propiedades de transporte a nivel nanométrico de la superficie de las capas de TiO_2 e IrO_x fueron medidas por AFM en modo *current sensing* utilizando un microscopio estándar de AFM (Pico Plus Molecular Imaging) en modo contacto. Se utilizó una punta de AFM de silicio recubierta con una capa conductora de diamante dopada con boro (Constante de fuerza de la punta aproximadamente de 3N/m) y las medidas fueron realizadas en una atmósfera de nitrógeno. Se aplicaron 2 diferencias de potencial, de 0.05 V y -0.15V, entre las capas y el cantilever en diferentes puntos de la muestra generando una corriente. La resistencia media fue estimada en un régimen de bajo potencial mediante el valor de la pendiente de la parte lineal de las curvas I-V obtenidas mediante esta técnica. La adquisición de las curvas I-V fue simultánea a la medida de topografía de las capas.

2.5 Análisis Celular

2.5.1 Cultivos Celulares

Los procesos descritos a continuación fueron realizados en el Neural Repair Laboratory del Hospital Nacional de Parapléjicos (HNP-SESCAM) en Toledo, España.

Con el objetivo de evaluar la aplicación como sustratos de crecimiento neuronal de los materiales sintetizados y caracterizados en este trabajo las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Reparación Neuronal del Hospital Nacional de Parapléjicos. Antes de cultivar las células sobre los materiales, las muestras de óxido de titanio e iridio y el vidrio de control de borosilicato (cubreobjetos de microscopía No 1, Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen) fueron lavados y “esterilizadas” por inmersión en agua destilada a 60 – 80°C 2 horas. Después las superficies fueron cubiertas por una disolución de Poly-L-Lisina (PLL, 4µg/cm², Sigma-Aldrich). La disolución de L-Polilisina (PLL) fue aplicada durante 30 minutos a 37°C y luego las muestras fueron lavadas en baños de agua destilada y secadas a temperatura ambiente. Las células neuronales fueron obtenidas del cortex cerebral de embriones de rata E14 Wistar. Los cortex aislados fueron disociados por 30 minutos a 37°C en medio HBSS (sin calcio y magnesio) suplementado con piruvato, albumina, tripsina y DNAasa (todos de Sigma-Aldrich), a lo que siguió un proceso de trituración con pipetas Pasteur pulidas al fuego. Las células fueron cultivadas con una densidad de 25000 células/cm² en medio DMEM-F12 que contiene 10% de suero fetal. Después de dos horas el medio fue cambiado a un suplemento neurobasal con L-glutamina, B27 (Gibco), Gentamicina y Penicilina-Estreptomina (Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron en ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 días. La mitad del medio de cultivo fue reemplazado a los 3 días.

2.5.2 Inmunocitoquímica y Cuantificación de las Células






Cuatro días después de “plaquear” las células sobre la superficie de los materiales en estudio, los cultivos fueron fijados en una disolución neurobasal con 2% de paraformaldehído durante 12 minutos. Las células fijadas fueron incubadas

a 37 por 30 minutos en un tampón de fosfato 0.1 M con 0.2% Triton y 5% NGS. Después fueron lavadas e incubadas una noche a 4°C con anticuerpos primarios. Se usaron los siguiente anticuerpos: policlonal anti-TAU de conejo (Sigma T-6402, 1:100), monoclonal anti-GFAP de rata (Dako Z-0334, 1:500), anti-NF200 de rata (Sigma N-0142, 1:400), policlonal 6 anti-NF de conejo (Affinity NA-1297, 1:750), anti-vimentin de rata (Neomarkers, MS-129, clone U9, 1:1000), alexa-488 anti-conejo (Molecular Probes, 1:500) y alexa-594 anti-rata (Molecular Probes, 1:1000). Por último, fueron utilizados marcadores Hoechst (Molecular Probes 33342) para marcar el núcleo de la célula y complementar el conteo de la supervivencia neuronal. Para esto, después de lavar los anticuerpos secundarios, se aplicó a las células una disolución de Hoechst (2 µl/ml en PBS) durante 50 minutos. Los cultivos fueron lavados con PBS, montados en PBS-Glicerol (50:50) y observados en un microscopio de fluorescencia.

Para la cuantificación celular fueron tomadas imágenes (2776 x 2074 pixels) usando un microscopio digital de imagen (Olympus DP50), y las imágenes de fluorescencia tanto del Hoescht como de los anticuerpos fueron combinadas y procesadas digitalmente (Analysis, Soft Imaging System GMBH). Fueron fotografiados 6 campos radiales (563 x 401 µm) en total por cada muestra, y el número de células encontrado fue extrapolado al área superficial total.

Con el fin de evitar el solapamiento de dendritas y discernir la influencia que otras neuronas tienen en el crecimiento, se realizaron también cultivos de baja densidad (500 células/cm²). Estos cultivos permitieron estudiar las interacciones neurona-substrato sin las interferencias tróficas de células vecinas y cuantificar la extensión de las dendritas y axones de neuronas individuales en las diferentes etapas de desarrollo neuronal (ver Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Etapas de desarrollo de neuronas del hipocampo [9]

Etapa	1	2	3	4	5
	Lamellipodia	Procesos menores	Crecimiento axonal	Crecimiento dendrítico	Madurez
					
Días en cultivo	0.25	0.5	1.5	4	>7

El número de dendritas medido fue promediado para 120 neuronas en cada tipo de muestra. Las neuritas fueron definidas como proyecciones celulares desde el soma y de aproximadamente 10 μm en longitud. La extensión de las neuritas fue también evaluada por la combinación de luz reflejada y fluorescencia en un microscopio confocal (TCS SP2 SE, Leica Microsystems CMS GmbH). Los datos obtenidos de los diferentes tipos de muestras fueron comparados usando un software comercial (SigmaStat 3.1.1, Systat).

2.5.3 Electroestimulación In Situ

Con el fin de evaluar los efectos de la aplicación de campo eléctrico en el crecimiento neuronal sobre los substratos sintetizados en este trabajo fueron realizados tres tipos de experimentos preliminares de electroestimulación descritos a continuación:

1. Se utilizó una configuración de 3 electrodos usando capas de IrO_x “*as prepared*” obtenidas a corriente constante (445 μA 20 min) en la configuración mostrada en la Figura 2.11. Tanto el contra-electrodo como el electrodo de referencia consistieron en hilos de platino. Las capas de IrO_x fueron utilizadas como substratos de cultivo de glia radial. La electroestimulación fue realizada

mediante pulsos de -0.2V vs Pt durante 1 s con 5 s de descanso (0 V vs Pt). Se usó una placa calefactora a 350°C y aceite mineral cubriendo la superficie.

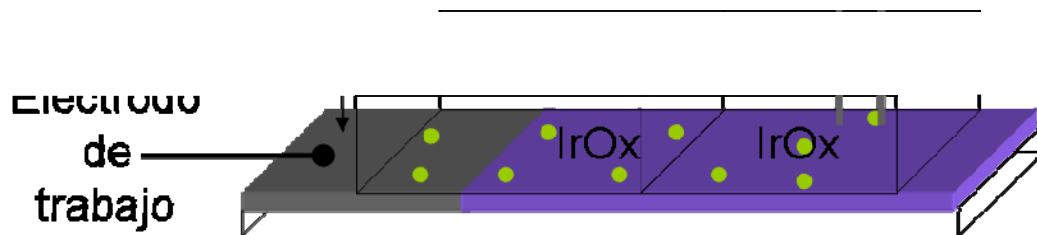


Figura 2.11 Esquema de la configuración usada para la electroestimulación de células glia sembradas sobre capas IrO_x .

2. Se utilizó una configuración de 3 electodos usando capas de IrO_x “as prepared” obtenidas a corriente constante ($445\ \mu\text{A}$ 20 min) en la misma configuración mostrada en la Figura 2.11. Las capas de IrO_x fueron usadas como substratos de cultivo de neuronas corticales E14 a 4 DIV. La electroestimulación fue realizada en corriente directa con un potencial de -0.2V vs Pt durante 10 min. El seguimiento de las neuronas fue realizado mediante un microscopio óptico en modo de contraste de fase TCS SP2 SE, Leica Microsystems CMS GMBH.

3. Se utilizó una configuración de dos electodos usando como electrodo de trabajo y contra-electrodo capas de IrO_x “as prepared” obtenidas a potencial dinámico (0.55V , 10mV/s , 50 ciclos) separadas por una placa de vidrio soda lime como indica la Figura 2.12. Los dos electodos de IrO_x y la placa de vidrio soda lime fueron usados como substratos de cultivo de neuronas corticales E18 y la electroestimulación fue realizada justo después de la siembra. Se aplicaron 5 pulsos de -1V durante 5 s con descansos de 60 s a 0V vs Pt entre cada pulso. Las células fueron monitoreadas mediante un Video Time Lapse de Olympus con microscopio de platina motorizada modelo IX81. Las células se mantuvieron en la cámara del microscopio a 37°C y 5 % de CO_2 . Se registraron imágenes del cultivo cada 20 min durante 48 horas en dos puntos de cada sección de la celda (electrodo

de trabajo, vidrio soda lime y contra). El software utilizado para la toma de las imágenes fue el Cell R de Olympus.

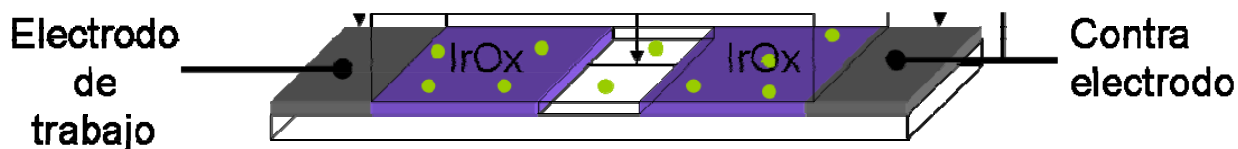


Figura 2.12 Esquema de la configuración usada para la electroestimulación de neuronas corticales sembradas sobre capas de IrO_x

2.6 Referencias Bibliográficas

1. BRINKER C.J; SCHERER, G.W. *Sol Gel Science*. San Diego-USA. Academic Press, 1989.
2. BAGOTSKY, V.S. *Fundamentals of Electrochemistry*. New-Jersey-USA. John Wiley and Sons inc, 2006.
3. PETIT, M.A; PLICHON, V. *J. Electroanal. Chem.* v. 444, p. 247-252, 1998.
4. DRAGO, R.S. *Physical Methods in Chemistry*. Philadelphia-USA. W. B. Saunders Company, 1977.
5. MARGARITONDO, G. *Introduction to Synchrotron Radiation*. New York. Oxford-USA, 1988.
6. REHR J.J; ALBERS, R.C: AND ZABINSKY, S.I. *Phys. Rev. Lett.* v. 69, p. 3397-3400, 1992.
7. RAVEL, B. AND NEWVILLE, M. *Journal of Synchrotron Radiat.* v. 12, p. 537-541, 2005.
8. NEWVILLE, M. *Journal of Synchrotron Radiat.* v. 8, p. 322-324, 2001
9. DOTTI, C.G; SULLIVAN, C.A; AND BANKER G.A. *Journal of Neuroscience.* v. 8, n. 4, p. 1454-1488, 1988.

Capítulo 3

Capas de TiO₂

En este capítulo se resume los resultados obtenidos en la síntesis y caracterización de fases de TiO₂ de baja temperatura y su interacción con células neuronales con el fin de evaluar su utilización como sustratos para el crecimiento neuronal.

Como primera medida se realiza una breve introducción sobre el TiO₂, sus aplicaciones y propiedades, así como también de su relación con sistemas biológicos. Luego se presenta un estudio de la superficie de las capas obtenidas mediante diferentes técnicas de caracterización que muestran la composición, microestructura y comportamiento eléctrico del material dependiendo de las condiciones de síntesis y de los tratamientos térmicos realizados.

Una vez expuestas las propiedades fisicoquímicas del material en estudio se muestran los resultados de compatibilidad de las capas con neuronas corticales mediante cultivos de 4 y 10 días *in vitro* usando diferentes densidades celulares con el fin de cuantificar la supervivencia celular así como la extensión de las neuronas.

Por último se presentan las conclusiones donde se correlacionan los resultados obtenidos en la caracterización de la superficie con los datos provenientes de los cultivos celulares.

3.1 Óxido de Titanio

El óxido de titanio, TiO_2 , se presenta en la naturaleza en varias formas: rutilo (estructura tetragonal), anatasa (estructura octaédrica) y brukita (estructura ortorrómbica) como se muestra en la Figura 3.1. La existencia de un tipo de estructura depende del tamaño de partícula, del material de partida, de la temperatura, la atmósfera de la reacción y otros parámetros [1]. La superficie de las tres estructuras tiene propiedades físicas muy diferentes. El rutilo es la fase estable a alta temperatura mientras que la anatasa y la brukita son comunes en materiales naturales y sintéticos de grano fino [2].

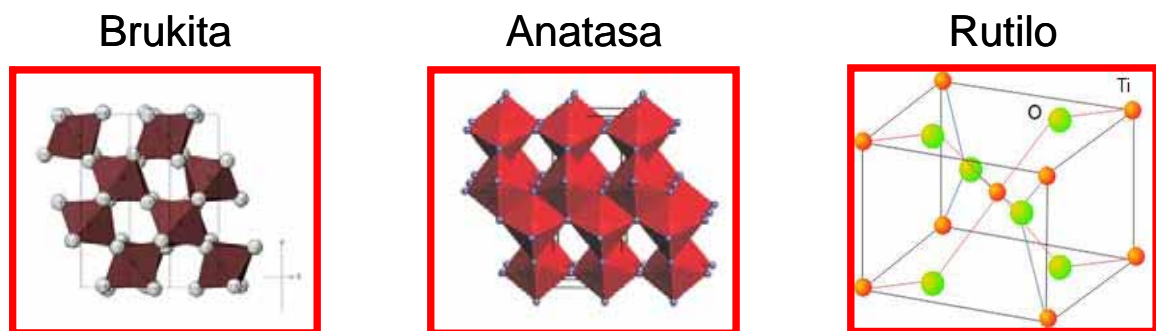


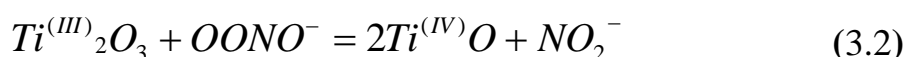
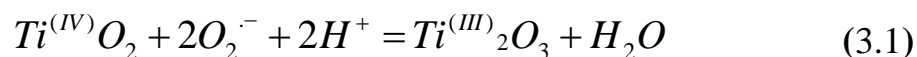
Figura 3.1 Diferentes estructuras del óxido de titanio.

Hoy en día el TiO_2 en forma de capas finas es ampliamente usado en diferentes aplicaciones, tales como dispositivos electrocrómicos [3,4] fotocatalisis [5,6], sensores de gas [7], guías de onda [8], celdas solares [9-11] entre otras.

Los implantes de titanio metálico son ampliamente usados y se ha demostrado con éxito que son altamente tolerables por el cuerpo humano [12]. La biocompatibilidad del titanio se debe principalmente a la capa de TiO_2 que se forma en la superficie del implante por pasivación directa del Ti en contacto con la atmósfera o por oxidación controlada. Esta capa de TiO_2 disminuye la formación de O_2^- y OONO^- que producen las células inflamatorias en pH fisiológico y en presencia de suero, fibrinógeno y bicarbonato [13]. También cataliza la descomposición de OONO^- y H_2O_2 [14]. Estas propiedades confieren ventajas substanciales a este óxido con respecto a otro tipo de acciones antioxidantes como el uso de enzimas que decrecen la concentración de O_2^- . Estas propiedades han

llevado a sintetizar óxidos de titanio con mejores propiedades antiinflamatorias [15].

Los mecanismos propuestos son variados, siendo algunos de ellos los presentes en las siguientes ecuaciones:



Se han propuesto diferentes métodos para la obtención de TiO₂ en forma de capas finas dependiendo de la aplicación deseada, ya que en cada técnica varían parámetros como la microestructura, tamaño de grano, porosidad o cristalinidad que determinan el comportamiento del material. Entre las técnicas más comúnmente usadas se encuentra el *sputtering* [16,17], deposición por evaporación química [18] pirólisis por spray [19] o el método sol gel [20]. A pesar de que el sol gel es una técnica con antecedentes que datan del siglo XIX [21] la bibliografía muestra un reciente interés debido a su alto potencial de aplicabilidad y su facilidad de elaboración [22] ya que en esta técnica el material es formado a temperatura ambiente y puede ser procesado a temperaturas relativamente bajas, permitiendo a su vez la obtención de fases estables a temperaturas inferiores, y microestructuras homogéneas.

Trabajos previos del proyecto donde está enmarcada esta tesis muestran que el TiO₂ obtenido por sol gel podría ser substrato para dispositivos médicos electroactivos involucrados en regeneración de tejidos por campos eléctricos. En concreto en ese campo resulta de interés su aplicabilidad en el control de radicales libres en la interfase material-célula.

De forma alternativa, la reducción parcial del Ti, tal y como se encuentra en las fases de Magneli Ti_nO_{2n}, así como también la conductividad iónica variable y la posibilidad de modulación del estado redox de proteínas absorbidas en su superficies mediante la aplicación de un potencial eléctrico permitirían que los óxidos de Ti llegaran a ser material de soporte para el crecimiento neuronal [23].

En este trabajo se obtuvieron películas de óxido de titanio, TiO_2 , mediante la hidrólisis sol-gel de precursores y la deposición en sustratos de vidrio soda lime recubiertos con ITO (Indium Tin Oxide) de 200 nm de espesor por la técnica de *Spin Coating*. Posteriormente se realizó una caracterización estructural, microestructural y electroquímica de las muestras por diferentes técnicas. Una vez caracterizadas las muestras fueron sometidas a cultivos neuronales para establecer una correlación entre la microestructura, las propiedades y la supervivencia celular en los diferentes materiales. La Figura 3.2 muestra un diagrama de flujo de las actividades realizadas:

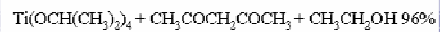


Figura 3.2 Diagrama de flujo para la obtención y caracterización de capas de TiO_2 .

3.2 Obtención de Capas Finas de TiO_2

Las capas finas de TiO_2 fueron obtenidas por *spin coating* según el método descrito en la sección 2.1.1 del capítulo 2. El sustrato de ITO es transparente así como el depósito obtenido (Figura 3.3), con el objetivo de facilitar la visualización de los cultivos celulares.



Figura 3.3 Capas de TiO₂ obtenidas por spin coating.

La Figura 3.4 muestra los resultados de reflectometría de rayos X para estas capas. Las muestras de 3 capas presentan un grosor en promedio de 98 nm (Tabla 3.1) independiente de la temperatura de tratamiento. El valor del grosor de las monocapas se extrajo del ajuste de mínimos cuadrados de la oscilación envolvente (Figura 3.4), ya que son excesivamente finas para realizar la medida directamente.

Tabla 3.1 Espesor de las capas de TiO₂ obtenidos por reflectometría de rayos X para muestras tratadas a diferentes temperaturas.

Espesor (nm)	Temperatura de tratamiento (°C)		
	250	350	450
3 capas	92±1.6	95±0.6	105±0.4
1 capa	---	27±2.5	---

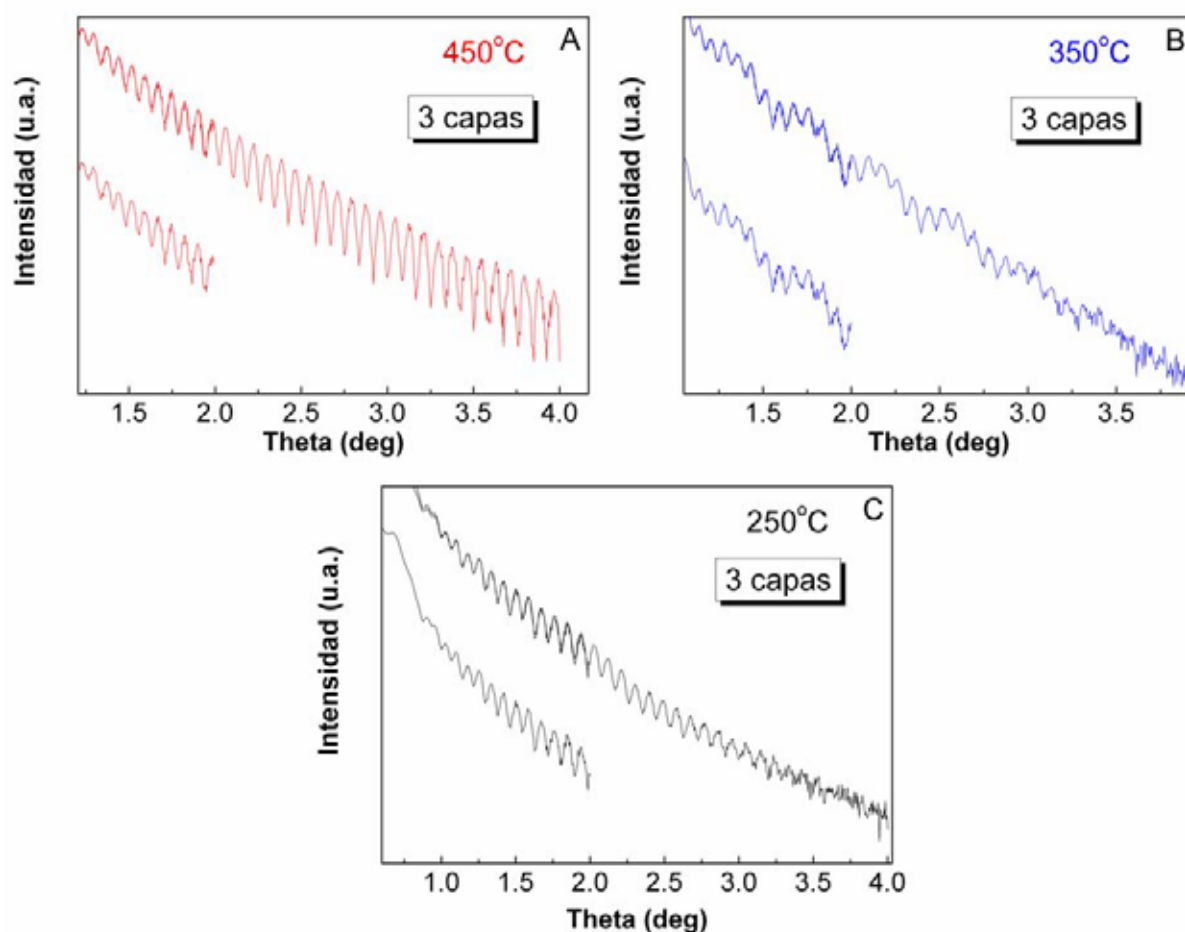


Figura 3.4 Curvas de reflectometría de rayos X de capas de TiO_2 tratadas a A) 250°C , B) 350°C y C) 450°C .

3.3 Análisis Estructural y Caracterización de la Superficie

En los resultados de las medidas de GIXRD con un ángulo de incidencia de 0.3° y 0.5° mostrados en la Figura 3.5 puede observarse que en las muestras tratadas a 250°C y 350°C solo se observan picos correspondientes al ITO, y por tanto el TiO_2 es amorfo, mientras que las tratadas a 450°C muestran la existencia de picos de difracción del TiO_2 anatasa sin la evidencia de fases cristalinas adicionales.

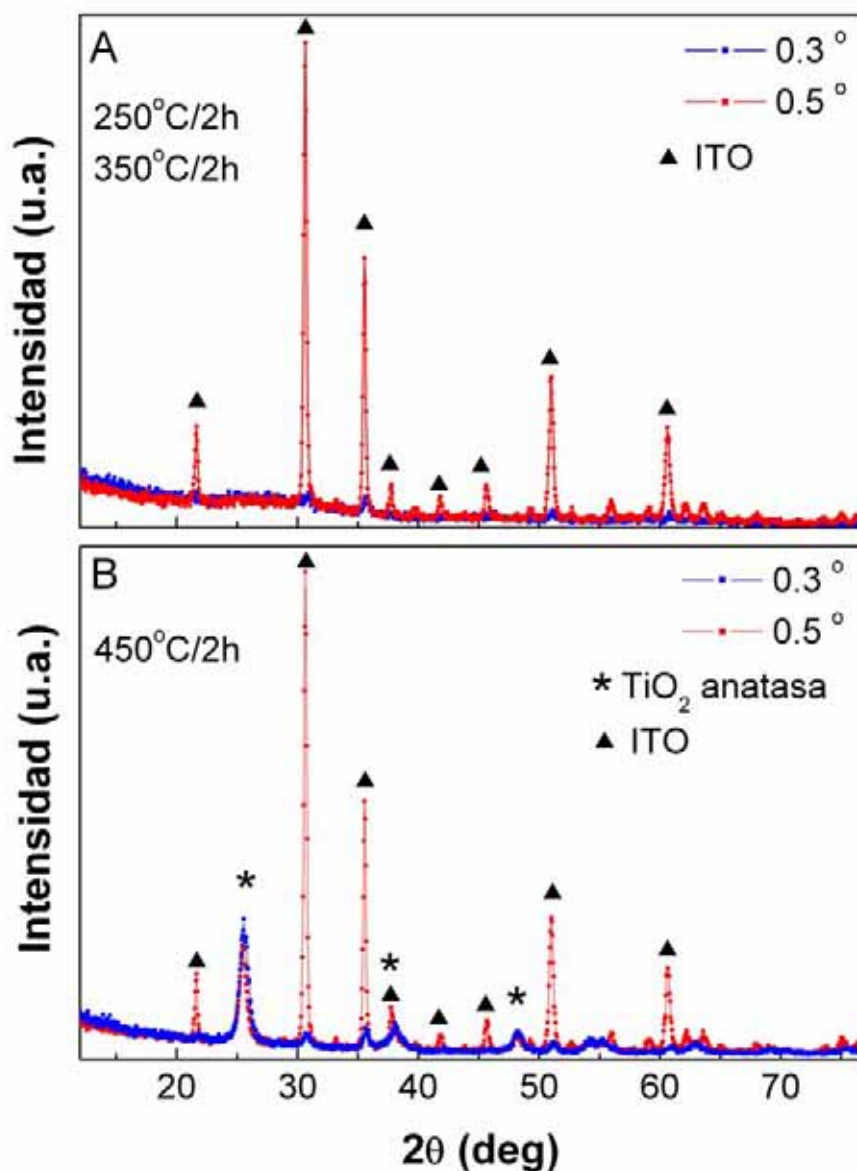


Figura 3.5 Difractogramas de Rayos X de ángulo rasante de capas de TiO₂ tratadas a A) 250°C y 350°C durante 2 horas y B) 450°C durante 2 horas.

Resulta significativo que las muestras tratadas a 450°C muestran ya la estructura anatasa del TiO₂ aún cuando los picos sean anchos debido a un tamaño de partícula pequeño y/o a un bajo grado de cristalinidad, coherente con el hecho de que el tratamiento fue realizado a una temperatura poco elevada. Esto concuerda con otras publicaciones [24].

Los datos obtenidos de los espectros de XPS están resumidos en la Tabla 3.2 y la Figura 3.6.

Tabla 3.2 Valores de energía para los picos observados en el espectro XPS general de capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas. SL es una abreviatura del vidrio soda lime. El error estimado es de $\approx 3\%$.

Temperatura (°C)	Substrato	No Capas TiO_2	Energía (eV)						
			$Ti2p_{3/2}$	$Ti2p_{1/2}$	O1s	C1s	CO_3	NaKLL	Na 1s
250	ITO-SL	1	458.5	464.2	530.0	284.7	288.7	---	---
350	ITO-SL	1	458.8	464.6	530.4	284.8	288.9	---	---
450	ITO-SL	1	458.7	464.4	530.0	284.7	288.8	495.7	1070.7
250	ITO-SL	3	458.6	464.4	530.1	284.9	288.8	---	---
350	ITO-SL	3	458.6	464.4	530.0	284.8	288.8	---	---
450	ITO-SL	3	458.2	464.0	529.4	284.9	288.6	495.7	1070.7
350	Cuarzo	3	458.7	464.5	529.9	284.9	288.8	---	---
450	Cuarzo	3	458.4	464.2	529.7	284.8	288.8	---	---

En todas las muestras se observan picos correspondientes al Ti, O y C (Figura 3.6). Es relevante que el pico C 1s aparece en muestras mantenidas en atmósfera ambiente y en los espectros se observa que la cantidad de carbono relativa disminuye al aumentar la temperatura de tratamiento lo cual sugiere una eliminación progresiva e incompleta del precursor a bajas temperaturas.

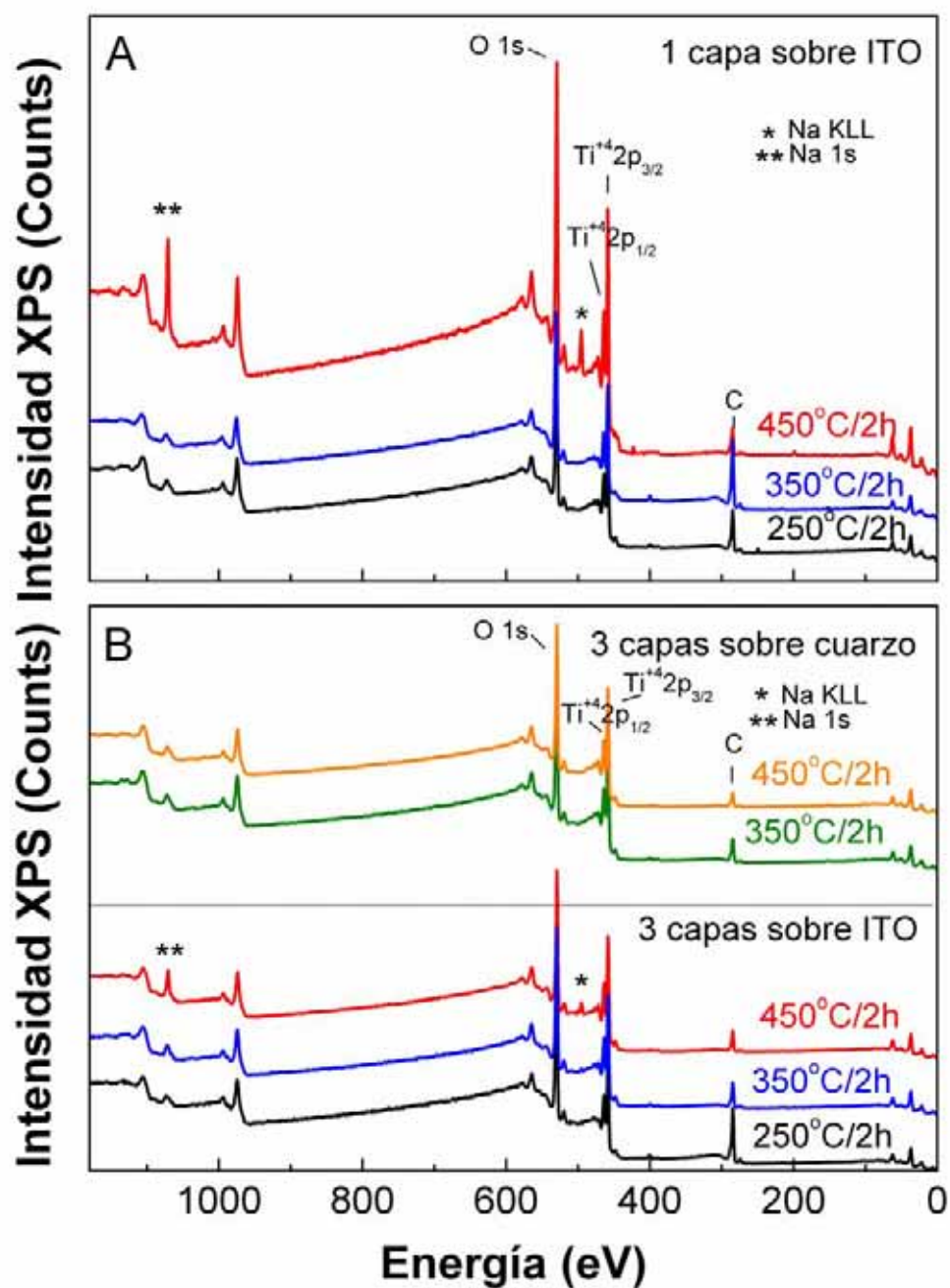


Figura 3.6 Espectro XPS general para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas.

En la Figura 3.7 se muestran las posiciones de los picos Ti $2p_{3/2}$ y $2p_{1/2}$ a 458.6 eV y 464.3 eV. Dichas energías corresponden al estado de oxidación del Ti^{+4} de acuerdo con la bibliografía [25,26]. Además, no hay evidencia de otros picos u hombros que correspondan a estados de oxidación más bajos del Ti.

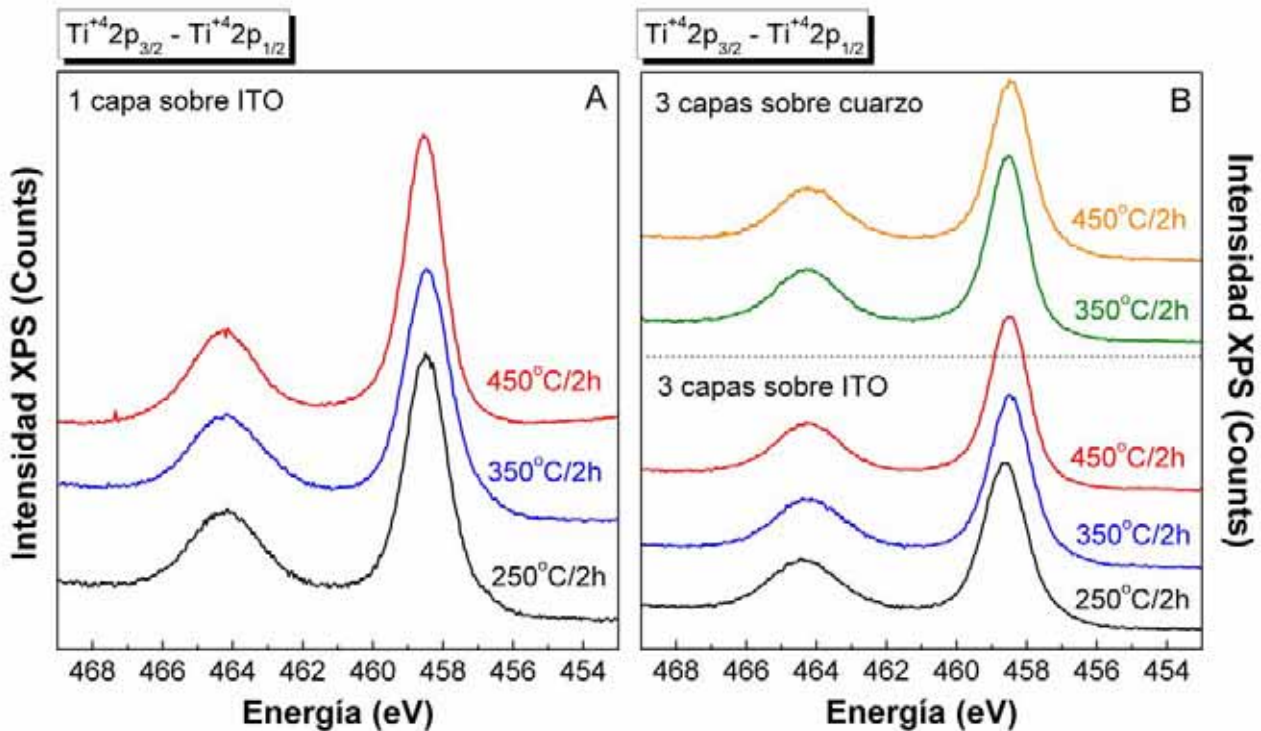


Figura 3.7 Detalle del espectro XPS de los picos $2p_{1/2}$ y $2p_{3/2}$ del Ti^{4+} para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas.

Los espectros O1s del espectro XPS (Figura 3.8), muestran un pico principal centrado a 530.0 eV que corresponde a un oxígeno de red, tipo óxido, y un hombro localizado a energías un poco más altas (alrededor de 533 eV) que puede ser asignado a la presencia de grupos OH en la superficie. Este hombro es más evidente para las muestras tratadas a más baja temperatura, 250°C y 350°C, y evidencia el carácter higroscópico de dichas capas.

Una observación remarcable es la presencia de pequeñas señales Na 1s en las capas que es más evidente en las muestras tratadas a 450°C (y a 350°C si es de una sola capa o tiempos más prolongados) Sin embargo, si la capa es depositada sobre cuarzo, dicha señal está ausente. Esto sugiere que no se trata de contaminación ambiental y que existe migración de sodio desde el vidrio soda lime, que soporta la capa de ITO hacia la superficie, un proceso que es favorecido por la temperatura. Dicha migración ya ha sido reportada en capas de TiO_2 depositadas sobre sustratos de vidrio en aplicaciones en fotocatalisis [27,28]. No es posible identificar la fase de sodio contenida en la superficie debido a que no

hay evidencias de ésta en los patrones de difracción ni en ninguna de las otras técnicas utilizadas para la caracterización microestructural de las muestras como se verá mas adelante.

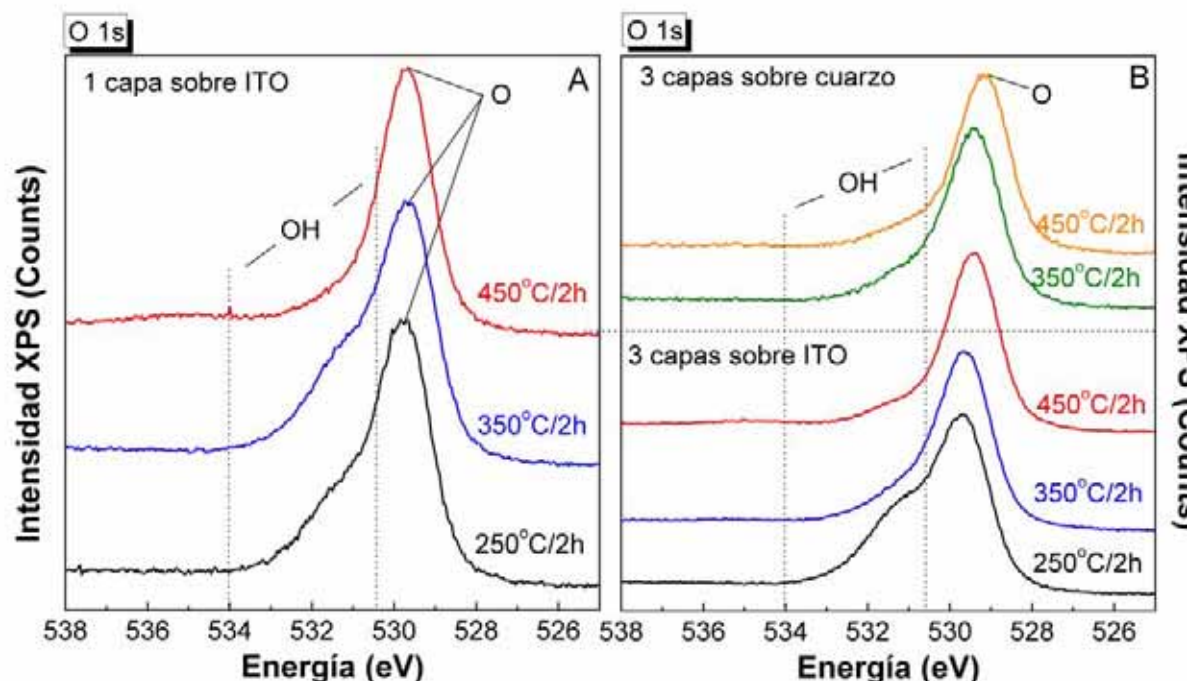


Figura 3.8 Detalle del espectro XPS del pico O1s para capas de TiO₂ depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas.

Los picos de la señal de C 1s de los espectros XPS (Figura 3.9), tienen una componente principal a 284.8 eV y se observa una componente menos intensa alrededor de 289 eV. Basándose en la bibliografía, este segundo pico corresponde a grupos carbonato [29]. La existencia de carbonato puede ser debida a la oxidación incompleta de los precursores durante el tratamiento térmico, o a la carbonatación posterior en presencia de CO₂ atmosférico. Sin embargo, el espectro general (Figura 3.6) muestra que la cantidad relativa de C disminuye cuando se incrementa la temperatura de tratamiento, lo que sugiere que las muestras tratadas a 250°C tienen un contenido de C adicional que resulta principalmente de la hidrólisis incompleta del isopropóxido de Ti a esta temperatura. Así, las capas tratadas a 350°C son las que tienen la composición teórica de TiO₂ sin migración de iones Na⁺ del sustrato y sin una cantidad significativa de C de los precursores

orgánicos, aunque si contiene grupos hidroxilo que podrían influenciar la absorción de péptidos y la respuesta celular.

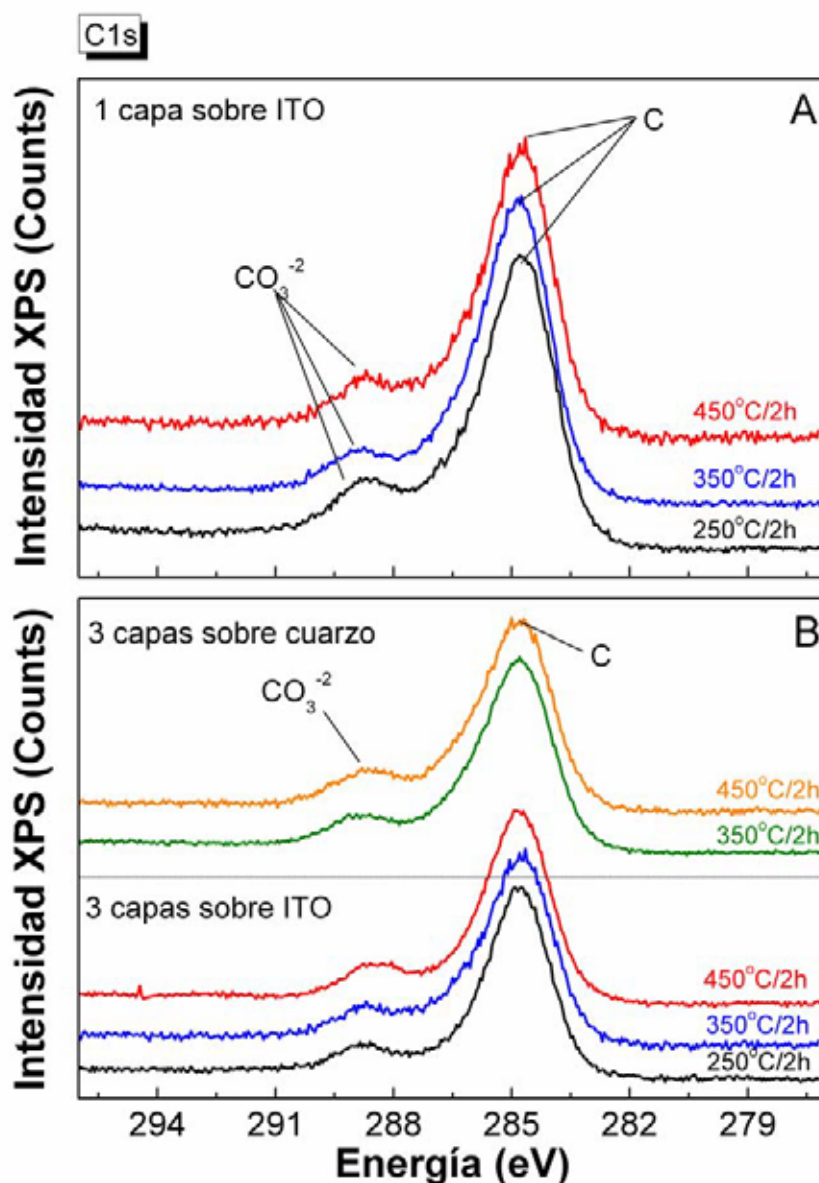


Figura 3.9 Detalle del espectro XPS de los picos C y CO_3^{2-} para capas de TiO_2 depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas.

Por otro lado, los resultados obtenidos por Espectroscopia Raman (Figura 3.10) son consistentes con los de GIXRD mostrando un espectro típico del TiO_2 anatasa [30] solamente en la muestra tratada a 450°C. No se observan picos adicionales, lo que concuerda con la existencia de una única fase cristalina.

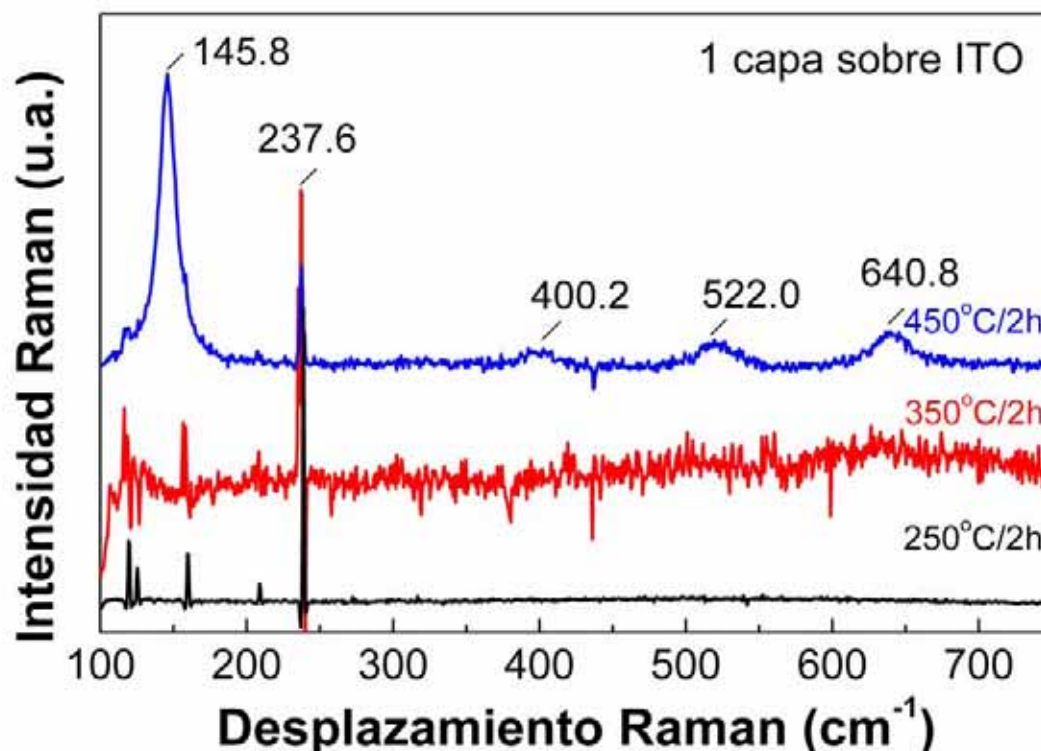


Figura 3.10 Espectro Raman de capas de TiO₂ sobre ITO tratadas a diferentes temperaturas.

La existencia de señales de Na⁺ en algunas muestras y el hecho de que los resultados de GIXRD no muestran evidencia de fases adicionales indujo a explorar la posible identidad de la fase que contiene Na⁺ mediante otras técnicas.

Los datos de ATR (Figura 3.11) sugieren vagamente la existencia de picos no identificados para el ITO o el vidrio alrededor de 1200 cm⁻¹ para las muestras tratadas a mayor temperatura. Estos picos pueden corresponder a enlaces Si-O-Ti debidos a la interacción de las capas de TiO₂ con el vidrio del substrato que ocurriría a altas temperaturas como se infiere de los resultados de XPS. Los picos correspondientes a los enlaces Ti-O-Ti están fuera del rango de medición del equipo utilizado. Por ello, aunque no existe evidencia de ninguna fase que contenga Na⁺, no se puede descartar la existencia de un titanato o silico titanato de sodio en muy pocas cantidades.

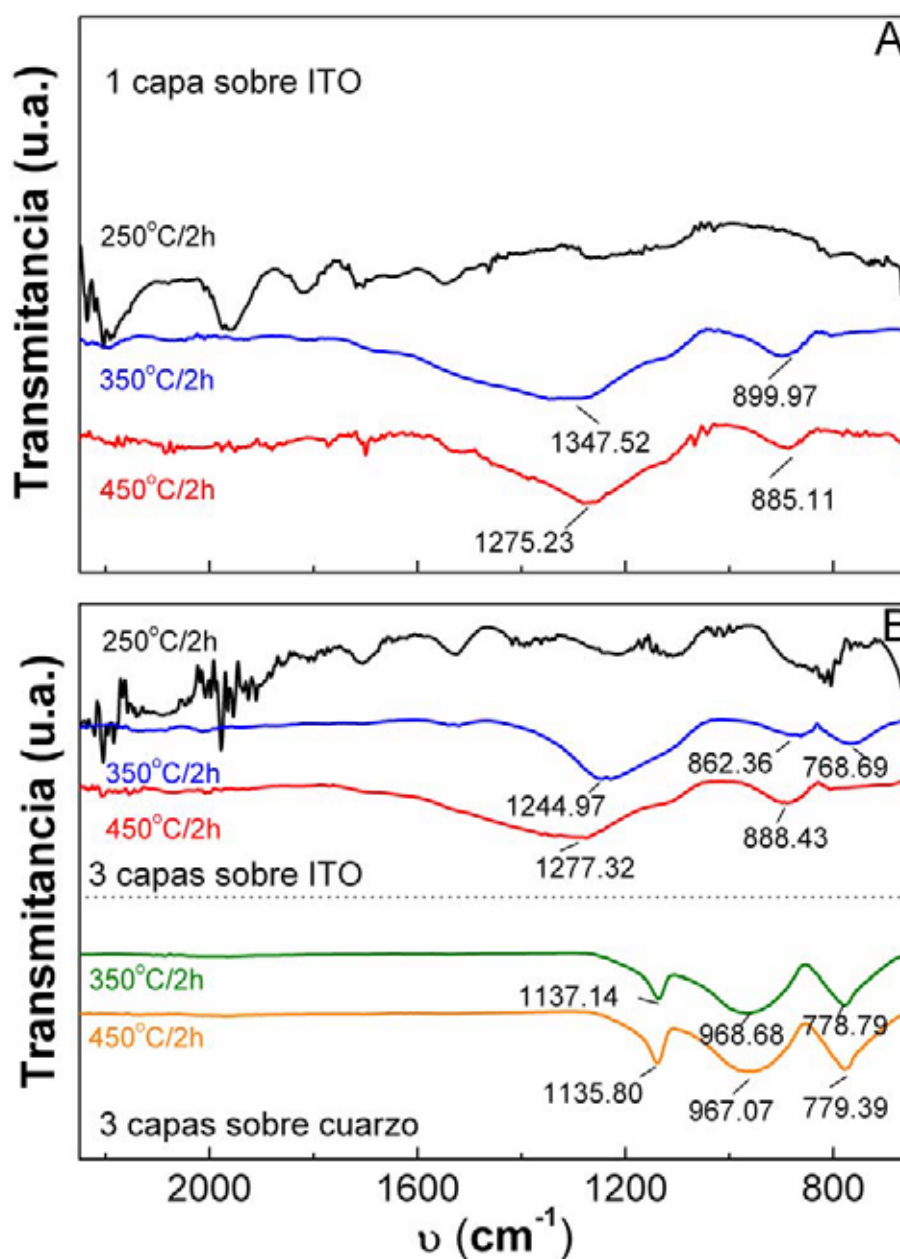


Figura 3.11 Espectros de ATR de capas de TiO_2 sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas.

Por otro lado, los datos de XPS de la superficie de las capas no muestran picos de silicio de lo que se puede concluir que la interacción entre el vidrio del sustrato y la capa de TiO_2 no alcanza la superficie que está expuesta a las células, salvo en una posible migración de pequeñas cantidades de Na^+ , ión conocido por su alta movilidad en los casos de temperatura más alta. Sin embargo se trata de una impureza muy pequeña.

3.4 Análisis Microestructural

La microestructura de las capas fue estudiada por AFM. Con el fin de tener una referencia en el análisis microestructural de las capas de TiO₂ se realizaron imágenes de AFM de los substratos utilizados para depositar las muestras (El error estimado de los valores de rugosidad es de $\approx 10\%$). Las medidas se realizaron en modo *tapping* con fuerzas de 40 N/m. En este caso el análisis de las imágenes fue realizado utilizando el software Mountains como fue descrito en la sección 2.3.2 del capítulo 2.

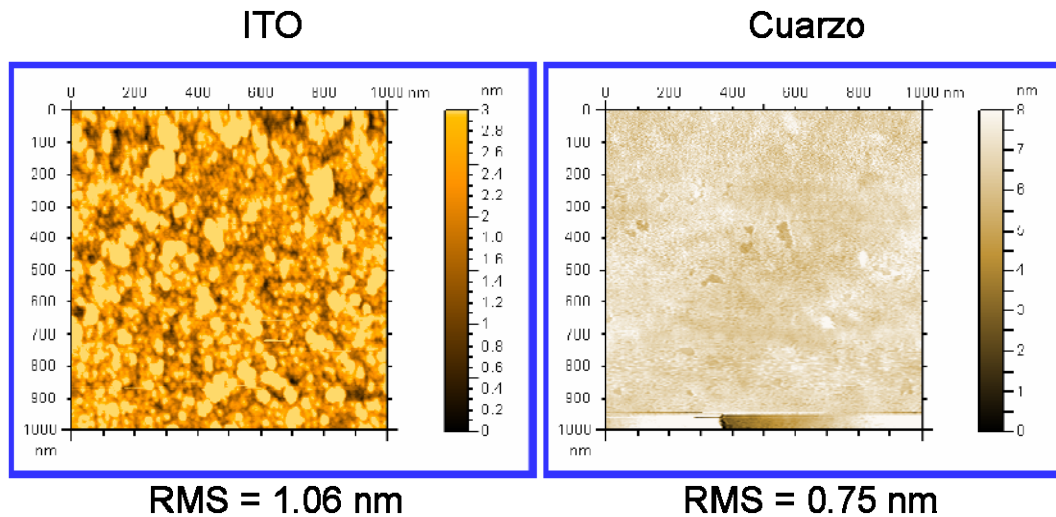


Figura 3.12 Imágenes de AFM de los substratos utilizados para las muestras del sistema TiO₂.

Las imágenes muestran que el substrato de ITO posee una rugosidad mayor que el de cuarzo.

Los experimentos de AFM realizados en las capas de TiO₂ tratadas a diferentes temperaturas muestran un alto grado de homogeneidad en todas las capas (Figura 3.13) con una nanoestructura similar a la del substrato de ITO.

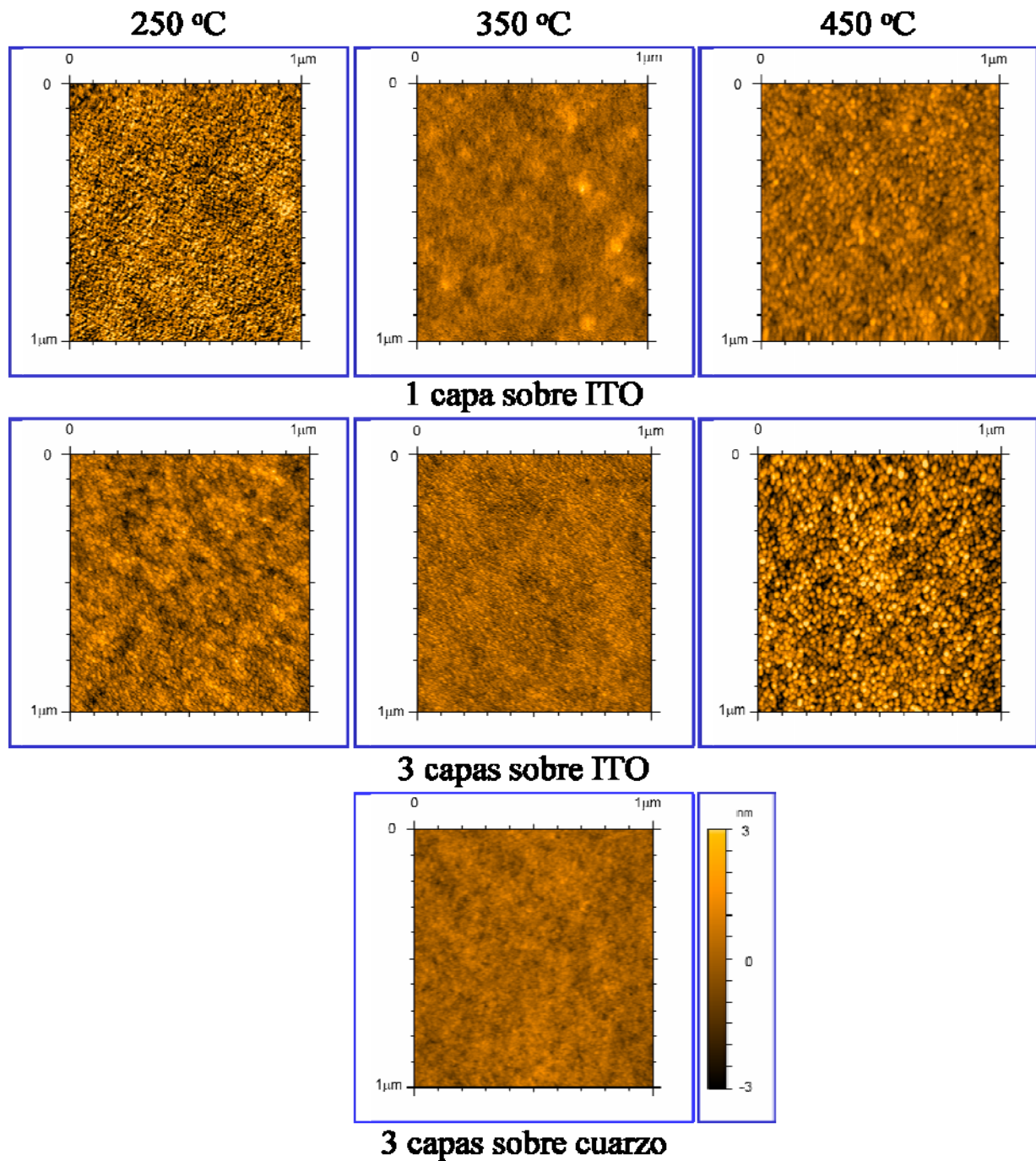


Figura 3.13 Imágenes de AFM de capas de TiO_2 sobre ITO y cuarzo tratadas a diferentes temperaturas.

Todas las muestras presentan tamaños de partícula y factores de rugosidad del orden de los nanómetros con cambios que están correlacionados con la temperatura de tratamiento.

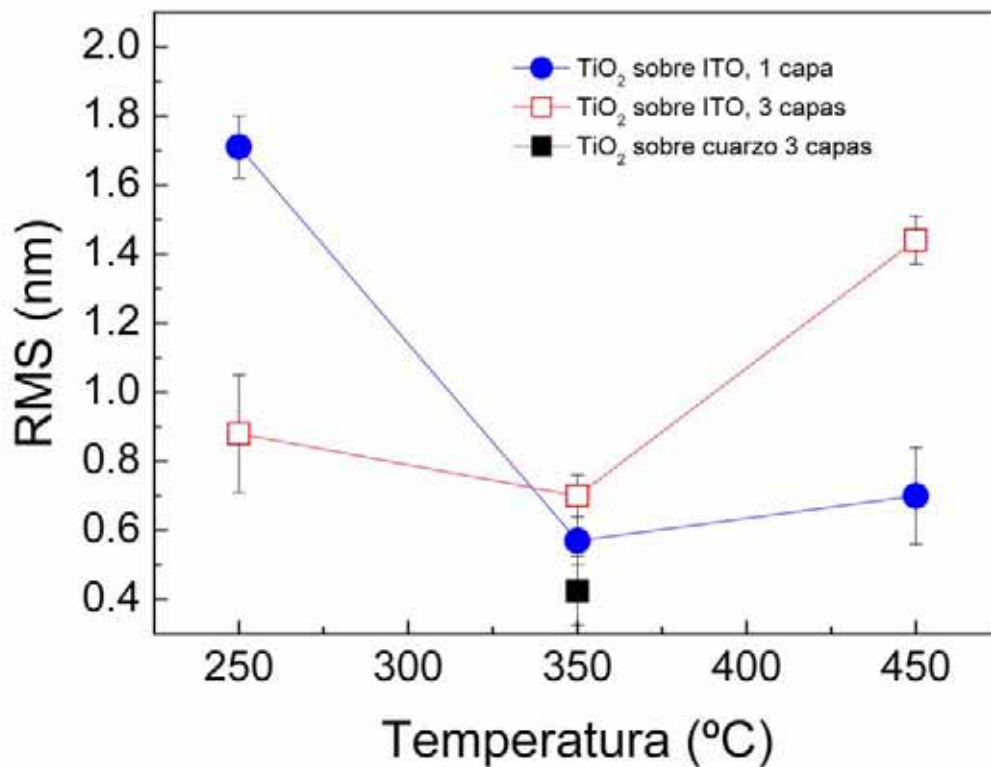


Figura 3.14 Curva del factor de rugosidad RMS con respecto a la temperatura de tratamiento para capas de TiO₂ sobre ITO y cuarzo.

Los valores de rugosidad son menores en las muestras tratadas a 350°C. El comportamiento de las muestras tratadas a 250°C y 450°C es diferente en términos de rugosidad cuando el número de capas es 1 ó 3, pero en ambos casos son más rugosas que las muestras tratadas a 350°C (Figura 3.14 y Figura 3.15).

El tamaño de grano se evaluó mediante la relación de 50 o más perfiles y un análisis de crestas y valles. Es menor en las muestras tratadas a 250°C incrementándose a medida que la cristalización aumenta.

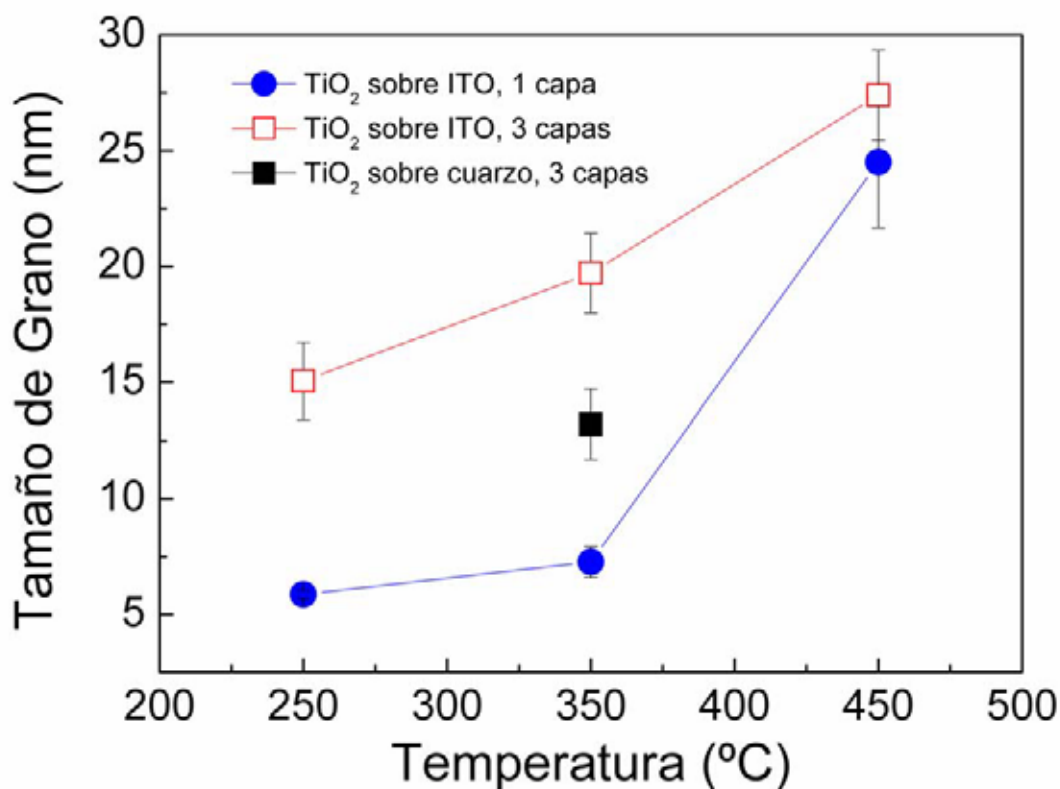


Figura 3.15 Curva de tamaño de grano con respecto a la temperatura de tratamiento para capas de TiO₂ sobre ITO y cuarzo.

Resulta significativo el alto grado de homogeneidad microestructural en las muestras y su nanoestructuración en todos los casos. De acuerdo con la caracterización microestructural reportada, la fase de TiO₂ obtenida cuando el sustrato es ITO sobre vidrio es amorfa cuando la temperatura de tratamiento es menor o igual a 350°C. En muestras cristalizadas a 450°C se observa también la existencia de Na⁺ difundiendo hacia la superficie, con lo que la muestra más pura sobre vidrio sería la tratada a 350°C.

Para evaluar la estabilidad de este sistema nanoestructurado de TiO₂ en medios acuosos se realizaron inmersiones en agua para evidenciar posibles pérdidas de Ti o Na⁺ y se realizaron análisis químicos (ICP) del agua residual tras 2 y 24 días. Estos análisis muestran que las muestras no liberan ninguno de los elementos presentes (Ti, Na...), lo que a su vez implica que el óxido está bien adherido al sustrato y que no es reactivo en medio acuoso, aspecto importante en términos de cultivos y crecimiento celular. Además, si estos resultados se

correlacionan con los obtenidos por AFM se puede decir que las muestras con capas de TiO₂ nanoestructuradas mantienen su microestructura en soluciones acuosas.

Por otro lado, las medidas de ángulo de contacto con agua de la Figura 3.16 y Figura 3.17 muestran claramente un incremento en la hidrofiliicidad con el aumento de la temperatura de tratamiento tanto en las monocapas como en las muestras de 3 capas.

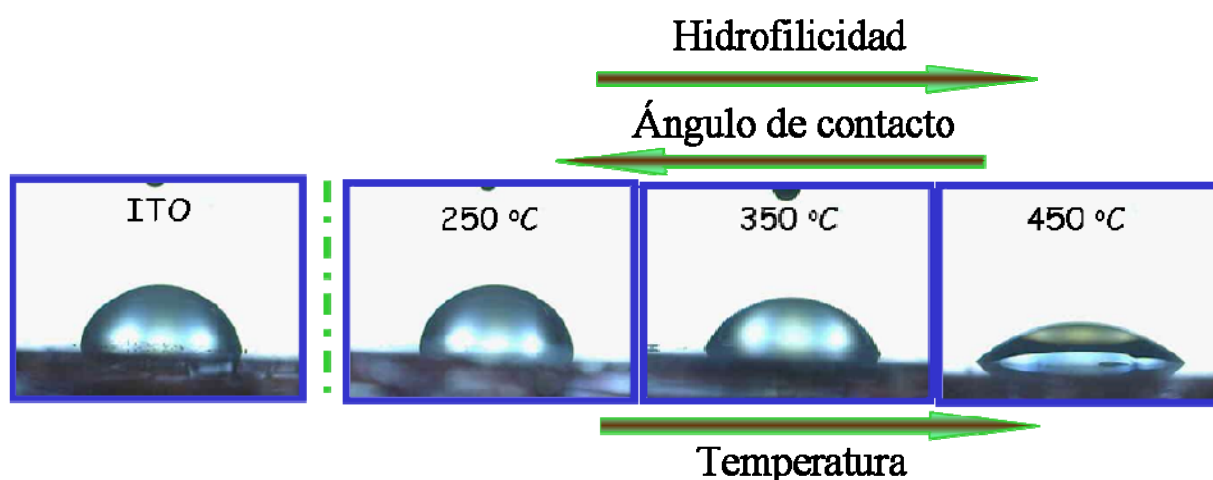


Figura 3.16 Imágenes de la evolución del ángulo de contacto de una gota de agua sobre muestras con 1 capa de TiO₂ sobre ITO tratadas a diferentes temperaturas.

La existencia sospechada de precursores en las muestras tratadas a más baja temperatura, más hidrofóbicas, sugiere que el aumento de la hidrofiliicidad está relacionado con el crecimiento y la cristalización térmica de una fase inorgánica de TiO₂ en la superficie de la capa, que ocurre simultáneamente con la total descomposición de los precursores orgánicos en las fases tratadas a baja temperatura, CO₃²⁻ o CO₂.

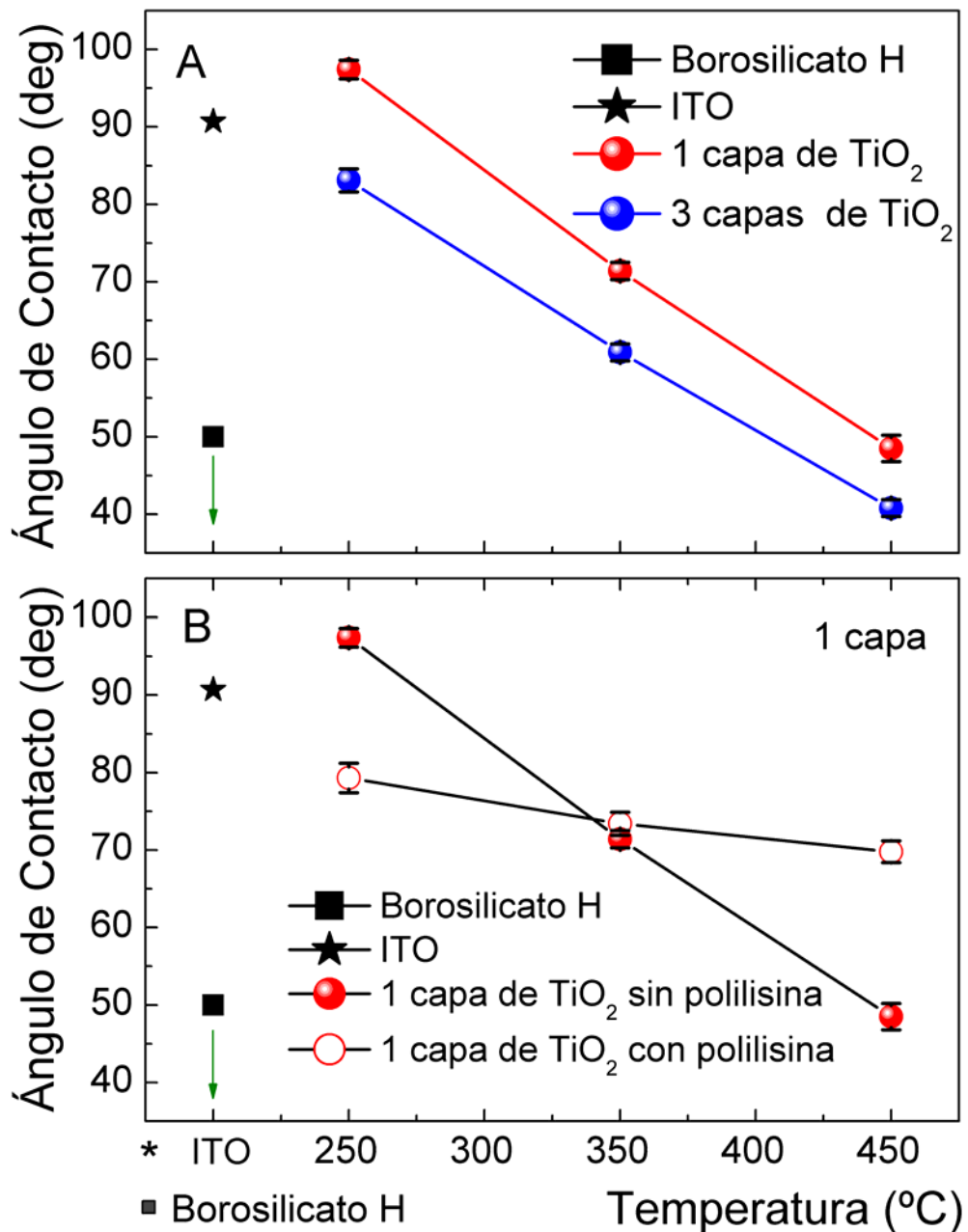


Figura 3.17 Curvas del ángulo de contacto con agua en función de la temperatura de tratamiento para capas de TiO₂ sobre ITO A) Sin polilisina y B) Comparación con y sin polilisina..

Por otro lado, también fue estudiado el efecto de la adhesión de la polilisina (Figura 3.17 B), polipéptido usado como interfaz material-célula en los cultivos celulares en cuanto a cambios inducidos en la hidrofobicidad. El polipéptido está cargado positivamente, y neutraliza la carga superficial negativa del óxido. El grado en que lo haga afectará su propia adhesión y la hidrofobicidad de la superficie en la que luego se cultivarán células. En la figura 3.17 y 3.18 se observan los

cambios inducidos por la adhesión de la polilisina. Aún cuando la tendencia se mantiene, con las muestras de mayor temperatura siendo más hidrofílicas, el grado de cambio del ángulo de contacto vs. temperatura se suaviza. Esto significaría que en todos los casos la mayor contribución a la hidrofilidad proviene de la polilisina.

Las medidas de ángulo de contacto utilizando el medio empleado en los cultivos celulares (neurobasal) son significativamente diferentes a las realizadas con agua (Figura 3.18). La tendencia lineal observada con los experimentos con agua desaparece y las muestras tratadas a 350°C aparecen como las menos hidrofílicas. Esto implica que la composición del medio de cultivo influye en las interacciones entre la fase líquida y la superficie, hecho remarcable debido a que el agua es frecuentemente usada en muchos de los estudios de hidrofilidad para predecir la interacción entre las superficies de los materiales y electrolitos fisiológicos [31].

El cambio en la tendencia del ángulo de contacto en presencia de medio de cultivo implica un comportamiento distinto de la fase de 350°C y también una inversión de la de 250°C y la de 450°C. La posible adhesión de proteínas del medio diferente de una muestra a otra, indicaría una interacción mayor de la de 250°C con el medio mientras que para la de 350° la interacción sería similar (mismo valor absoluto). La complejidad de dichas observaciones ha sugerido una caracterización más profunda contenida en otro trabajo de tesis doctoral.

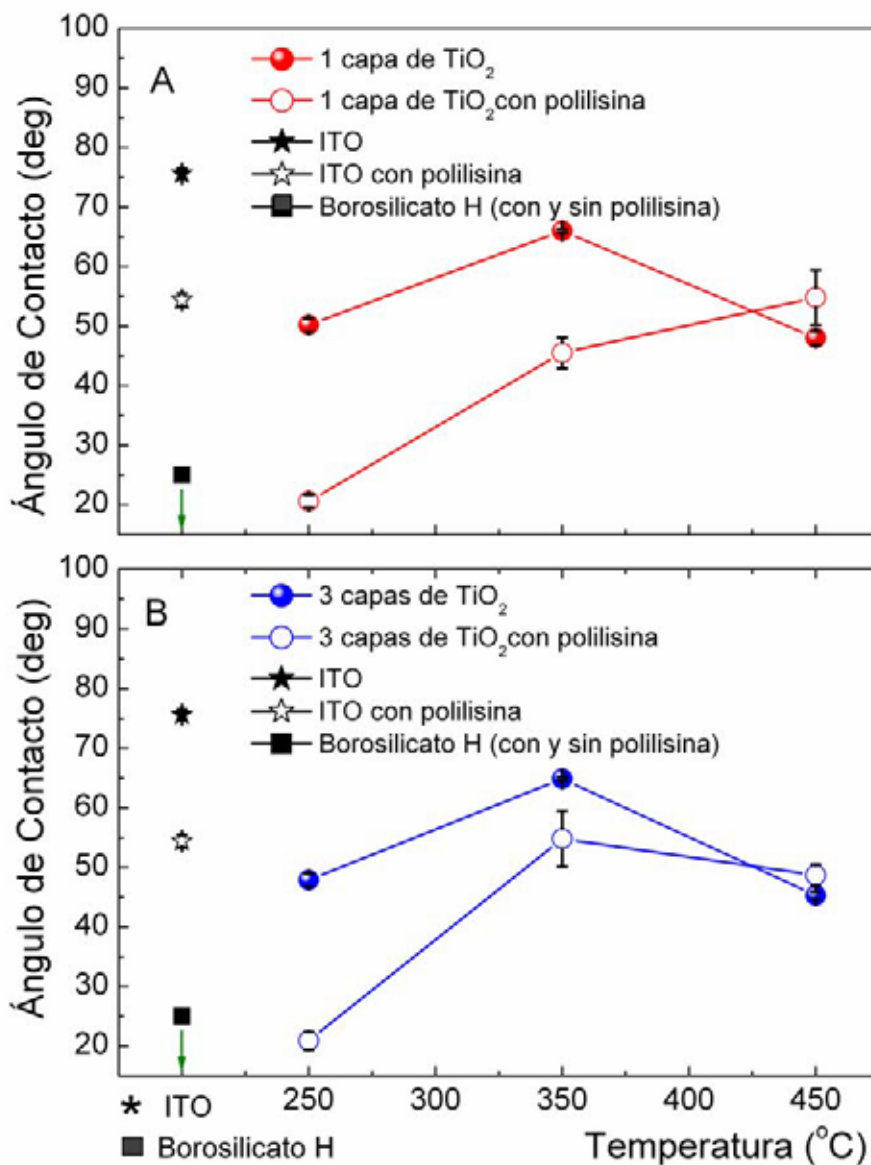


Figura 3.18 Curvas del ángulo de contacto con medio de cultivo en capas de TiO₂ sobre ITO con y sin polilisina A) 1 capa y B) 3 capas

3.5 Propiedades Electroquímicas y Eléctricas

Aunque las medidas de resistividad macroscópica en una configuración de dos puntas evidencian una conducción fácil a través de las capas de TiO₂, esta puede ser debida al poco grosor de las capas, que permite el contacto eléctrico con el sustrato de ITO conductor. Se realizaron experimentos a menor escala con poca área superficial en contacto mediante AFM en modo *current sensing*. En este caso las muestras presentaron un comportamiento aislante en la superficie. El umbral para la conductividad en estos casos ocurre cuando el potencial bias entre la punta del AFM y el sustrato es próximo a 6 V.

Debido a que se pretende usar las capas de TiO₂ en electrolitos fisiológicos su comportamiento electroquímico fue asimismo estudiado en diferentes soluciones tales como tampón fosfato 0.1M a pH 7, tampón acetato 0.1M a pH 5 y medio de cultivo celular neurobasal (Figura 3.19).

El comportamiento electroquímico de las capas fue similar independientemente del número de capas depositadas. La oxidación y reducción del agua sucede con bajos valores de resistencia pesar del carácter aislante del TiO₂, lo que implica que a pesar de su carácter aislante estas capas pueden ser utilizadas en la superficie de cualquier dispositivo electroactivo. La ventana electroquímica donde no ocurre ninguna reacción a pH biológico es entre -0.5 V a +0.2 V (V versus Pt id vs Ag/AgCl). Por otro lado la adhesión de polilisina (estimada al margen de este trabajo en TiO₂ rutilo en 1 nm [32]) no pasiva la superficie y permite el uso de estas capas como electrodos, como se observa de la ausencia de cambios en los CV.

Los resultados obtenidos no muestran ninguna evidencia de intercalación de Na⁺ del medio fosfato en el TiO₂. Sin embargo, la capa de TiO₂ no pasiva la respuesta eléctrica y electroquímica del ITO. Las capas tratadas a 450°C mostraron menos actividad redox entre la evolución de hidrógeno y oxígeno, probablemente debido a la limitada reactividad de la fase anatasa. Por otro lado en las voltametrías realizadas en tampón fosfato y acetato las fases más amorfas del TiO₂ (muestras tratadas a 250°C y 350°C) mostraron picos de reducción distintivos que podrían estar relacionados con la existencia de precursores en estas capas. En el medio de cultivo el electrodo más inerte fue el de las capas tratadas a 350°C el cual es también el más hidrofóbico en medidas de ángulo de contacto realizadas con el medio de cultivo (Figura 3.18).

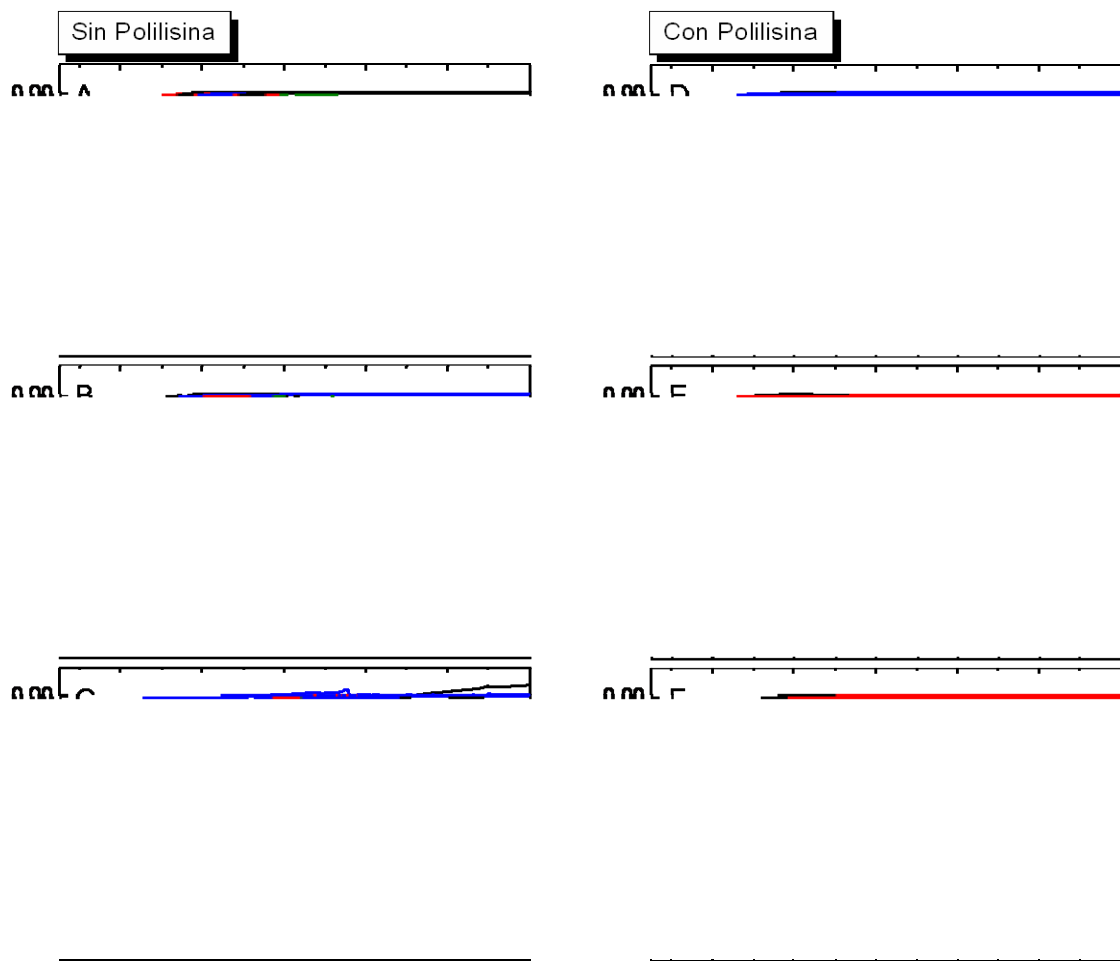


Figura 3.19 Voltametrías cíclicas (2mV/s) de tricapas de TiO_2 tratadas a 250°C/2h, 350°C/2h, 450°C/2h y substratos de ITO en diferentes medios. (Nótese que la escala es la misma en todos los casos para favorecer la comparación).

3.6 Cultivos Neuronales

Las muestras de TiO_2 fueron ensayadas como substrato para neuronas provenientes del córtex cerebral de embriones de rata Whistar de 14 y 18 días, según el método descrito en el apartado 2.5 del capítulo 2. En los cultivos celulares de alta densidad puede apreciarse que las neuronas no tienen tendencia a aglomerarse cuando están colocadas en las superficies de anatasa recubiertas de polilisina facilitando así la cuantificación de la supervivencia de las células y la extensión de las neuritas (Figura 3.20), e indicando un cierto “bienestar” neuronal en ese medio cuando se compara con otros materiales ensayados [33].

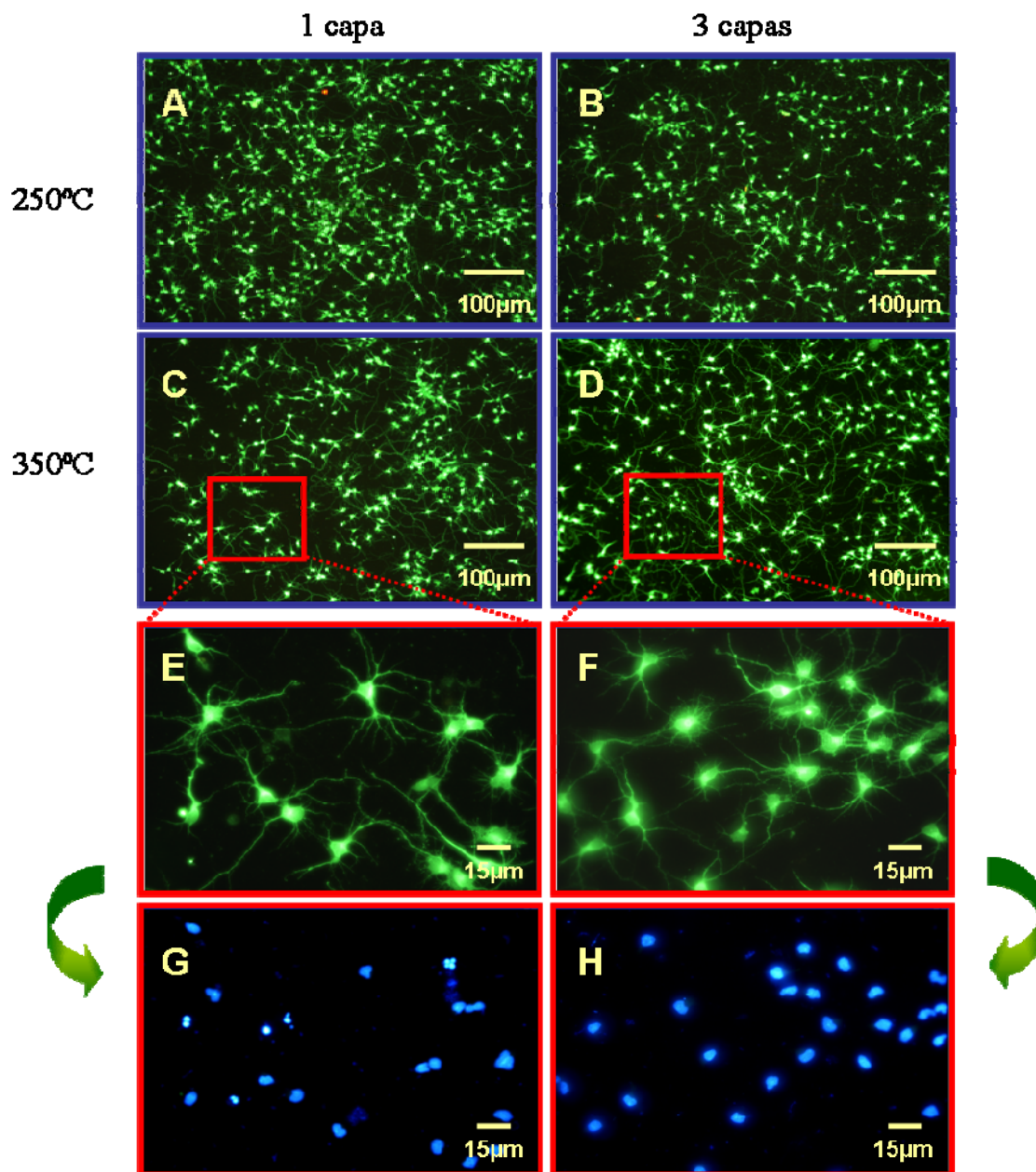


Figura 3.20 Imágenes de microscopía óptica de cultivos celulares realizados sobre capas de TiO₂ depositadas sobre ITO y tratadas a 250°C y 350°C durante 2 horas.

Los estudios inmunocitoquímicos revelan que la cantidad de células gliales y fibroblastos presentes en el cultivo *in vitro* durante 4 días es despreciable (menos de un 0.1%) y casi todas las células muestran un fenotipo neuronal. Además en todos los cultivos de alta densidad (25000 células/cm²) se presentan numerosos procesos celulares (Figura 3.20). En general, las células se adhieren bien y sobreviven en las capas de TiO₂.

Los resultados de los cultivos de alta densidad realizados a 4 días fueron estadísticamente similares para todas las temperaturas de tratamiento en las muestras de una sola capa de TiO₂ como se muestra en la Figura 3.21A.

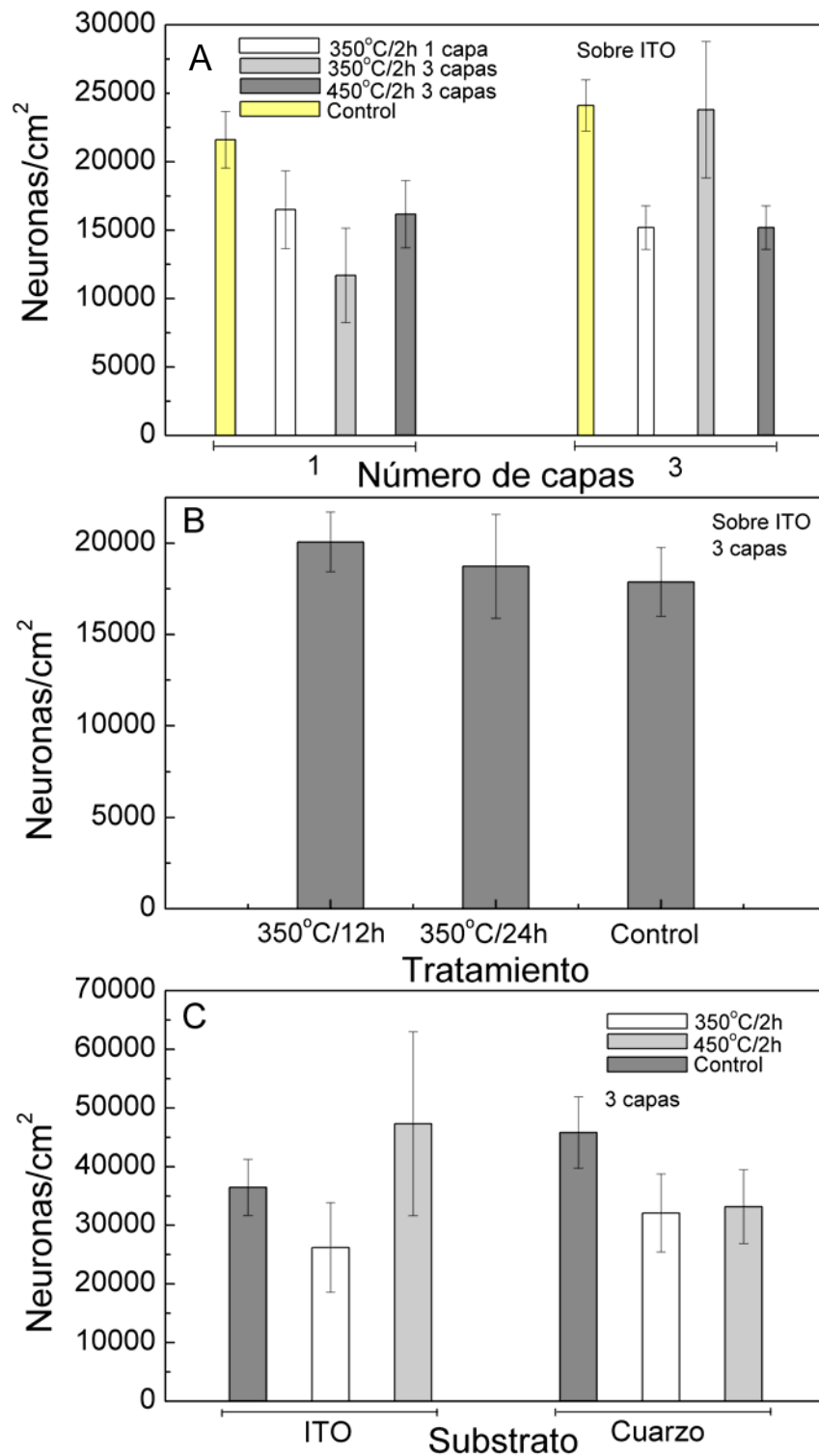


Figura 3.21 A) Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad (25000 cel/cm²) después de 4 días in vitro (DIV) en capas de TiO₂ tratadas térmicamente a 250°C, 350°C y 450°C 2 horas, B) Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad después de 4 DIV en tricapas de TiO₂ tratadas a 350°C 12 y 24 horas y C) Supervivencia neuronal en cultivos de alta densidad después de 10 DIV en capas de TiO₂ depositadas sobre ITO y cuarzo tratadas térmicamente a 350°C y 450°C 2 horas.

Además todas las capas tuvieron una cuantificación de células ligeramente más bajo que el cultivo sobre borosilicato hidrofílico utilizado como referencia. Sin embargo en las muestras con 3 capas hay una diferencia significativa entre la muestra tratada a 350°C y las del resto de temperaturas. Esta temperatura en particular que según los resultados de GIXRD tiene una estructura amorfa y según los resultados de AFM tiene una rugosidad menor que las demás. Químicamente las muestras tratadas a esta temperatura no contienen iones Na⁺ provenientes del sustrato a diferencia de las tratadas a 450°C y además poseen una cantidad de precursores hidróxidos más pequeña cuando son comparadas con las muestras tratadas a 250°C. Son además las menos afines al medio de cultivo.

Las muestras de una sola capa tratadas a 250°C, 350°C y 450°C tienen rugosidades similares a la de 3 capas tratada a 350°C lo cual indica que este parámetro no es decisivo en términos de supervivencia de las células y que son los factores químicos los que influyen el comportamiento de los diferentes cultivos, factores que pueden estar correlacionados directamente con la hidrofiliidad de la superficie y el diferente grado de adhesión de polilisina. Este último factor está siendo estudiado.

En los cultivos de alta densidad, las células ejercen influencias tróficas que pueden ocultar efectos adversos poco perceptibles por parte del sustrato. Además las dendritas de las diferentes células se solapan haciendo difícil la medida de su extensión. Por esta razón fueron realizados también cultivos de baja densidad (500 células/cm²) con el fin de estudiar las interacciones neurona-sustrato sin las interferencias tróficas de células vecinas y para cuantificar la extensión de las dendritas y axones de neuronas individuales.

Después de 4 días de cultivo un 50% de las neuronas sembradas en el control estaban en la etapa de desarrollo de crecimiento 1-2 (ver Tabla 2.1 del capítulo 2) y el otro 50% en la etapa 3-4.

Las neuronas que se encuentran en la etapas 1-2 presentaron menos dendritas al ser sembradas sobre las capas de TiO₂ que en las sembradas sobre el control (p<0.001) aunque esta inhibición en el material no impide la diferenciación de dendritas y axones.

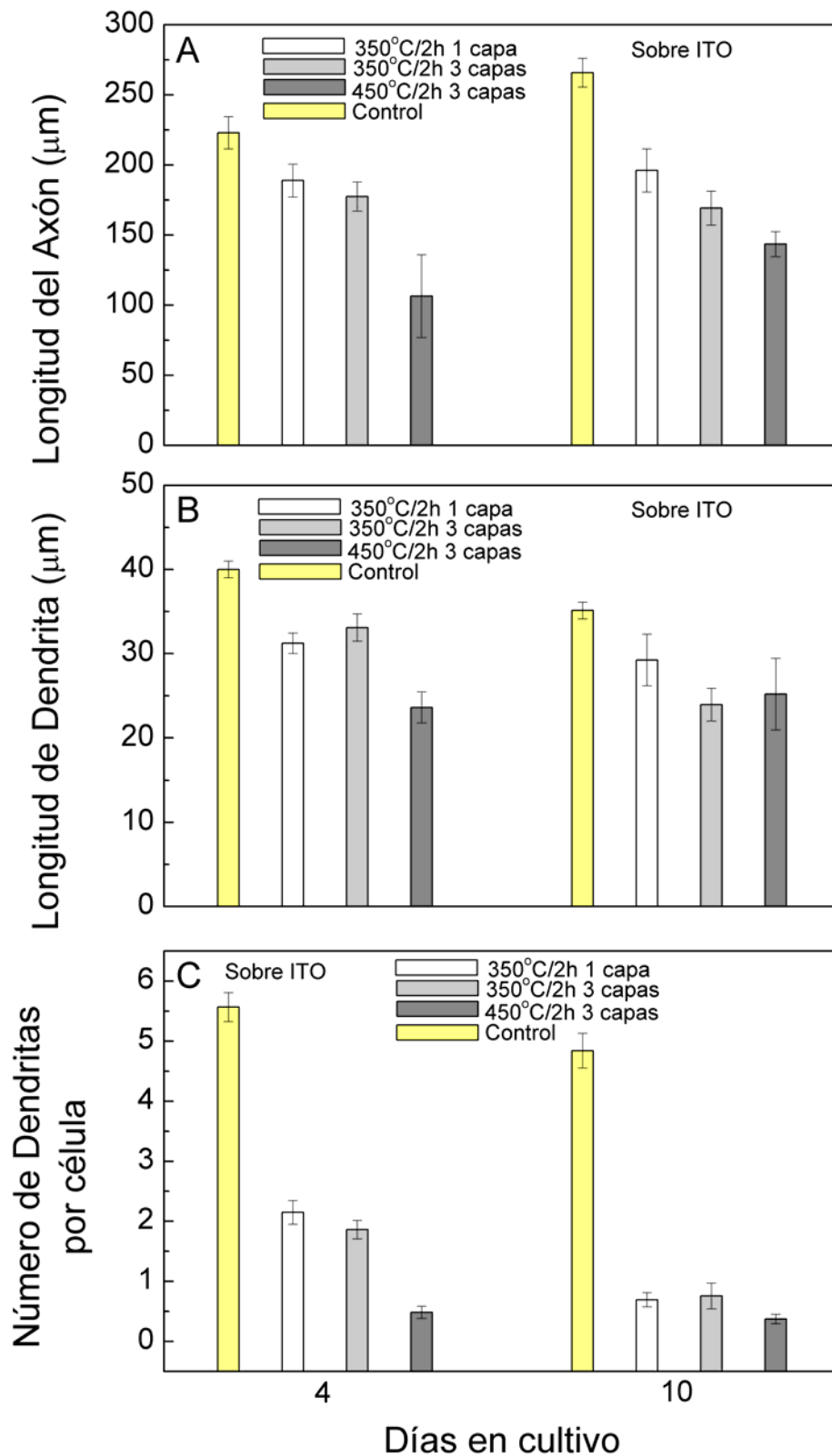


Figura 3.22 Procesos de crecimiento neuronal en cultivos de baja densidad (500 cel/cm^2) en capas de TiO_2 y superficies de control. Los datos representan la diferencia media \pm desviación estándar del error significativa a $p < 0.05$ de: A) Longitud del axón primario, B) Longitud de las dendritas primarias y C) Número de dendritas primarias por célula.

En estudios reportados en la bibliografía se ha demostrado que los axones de neuronas de ratas crecen hasta 150 μm en los primeros 4 días de cultivo (presumiblemente sobre placas de cultivo) [34]. En los cultivos sobre capas de TiO₂ realizados en este trabajo los axones tienen una longitud superior a 150 μm en las capas tratadas a 350°C (Figura 3.22A). Sin embargo, el valor de dicha longitud así como los valores de la extensión de las dendritas (Figura 3.22B) en las capas de TiO₂ son inferiores aproximadamente en un 20% a los de las células sembradas sobre los controles de borosilicato H.

En el caso de los controles los axones crecieron un 15% adicional del día 4 al día 10 de cultivo, lo que no ocurrió con las capas de TiO₂ indicando que el óxido interrumpe de alguna manera el proceso de maduración de las neuronas. Sin embargo el efecto es más visible en el gráfico del número de dendritas (Figura 3.22C) donde se aprecia que las capas tratadas a 350°C tienen 40% menos dendritas que los controles en el día 4, y además las muestras tratadas a 450°C están prácticamente desprovistas de dendritas.

Los resultados de los cultivos de baja densidad (500 células/cm²) muestran diferencias en términos de desarrollo neuronal entre los controles y las capas de TiO₂, con efectos particulares en cada etapa de crecimiento de la neurona. Las capas permiten la adhesión celular, la diferenciación del axón y el crecimiento en las etapas iniciales, pero inhiben el desarrollo de las dendritas y la maduración del axón en comparación con las superficies de control utilizadas.

Por otro lado, la extensión de las dendritas es similar a la encontrada en muestras de TiO₂ rutilo estudiadas previamente [32]. Esto da a entender que las neuronas corticales sobreviven en una gran variedad de topografías y que el factor más importante en la supervivencia y crecimiento neuronal es la identidad química del material utilizado como sustrato.

3.7 Conclusiones

- Las capas finas de TiO₂ se preparan para una serie de aplicaciones, como por ejemplo, celdas fotovoltaicas sobre sustratos transparentes de vidrio [35]. Este estudio muestra que lo que se ha considerado clásicamente como un óxido puro

de TiO_2 contiene cantidades pequeñas, pero significativas en la superficie, de Na^+ proveniente del vidrio en forma de una fase no identificada y que puede afectar algunas aplicaciones. En el caso de este trabajo, la diferencia significativa entre las muestras tratadas a 350°C de 3 capas (sin Na^+ y sin precursores en la superficie) y el resto de muestras evidencia que el Na^+ puede estar afectando en la utilización posterior. Esto indica a su vez que de usar un material de soporte como el vidrio, la temperatura de tratamiento para un dispositivo aplicado al sistema nervioso debería ser baja.

- El TiO_2 en su forma anatasa derivado del proceso sol-gel y nanoestructurado es homogéneo, aislante y no pasiva en estas dimensiones el paso de corriente de un substrato conductor. Su ventana de acción electroquímica es de -0.7 V a 0.5 V .
- Sobre el TiO_2 el crecimiento neuronal existe, con valores ligeramente diferentes a la referencia usual, borosilicato hidrofílico, lo que implica que su uso como recubrimiento en un electrodo prótesis para el sistema nervioso podría ser adecuado y óptimo. El recubrimiento óptimo es el de 350°C 3 capas y 90 nm de espesor con una fase previa a la cristalización en la estructura anatasa.
- Se observa la inhibición tardía del desarrollo de dendritas que parece estar motivado por la química del material más que por su microestructura ya que se observa también para el TiO_2 de estructura rutilo con tamaño de partícula superior.

3.8 Referencias bibliográficas

1. RANADE, M.R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 99, n. S2, p. 6476-6481, 2002:
2. ZHANG, H; BANFIELD, J.F. *J. Phys. Chem. B.* v. 104, p. 3481-3487, 2000:
T. Ohzuku, T. Hirai, *Electrochim. Acta* 27 (1982) 1263.
3. SOPYAN, I; MURASAWA, S. *Chem. Lett.* v.8, p. 723, 1994
4. LINKOUS, C.A. et al. *Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 22, p. 4754-4728, 2000.
5. FUJISHIMA, A; HONDA, K. *Nature.* v. 238, p. 37, 1972.

6. HAYAKAWA, I. et al. *Sensors and actuators B: Chemical*, v. 62, n. 1, p. 55-60, 2000
7. BAHATAT, A. et al. *J. Non-Cryst Solids*. vol 202, no 1-2, pp 16-22, 1996
8. BACH, U. et al. *Nature*. v. 395, n. 6702, p. 583-585, 1998.
9. O'REGAN, B; GRATZEL, M. *Nature*. v. 353, p. 737, 1991.
10. KARUPPUCHAMY, S. et al. *Solid State Ionics*. v. 151, p. 19, 2002.
11. BRUNETTE, D.M; TENGVALL, P; TEXTOR, M; THOMSEN, P. *Titanium in Medicine*. Springer-Verlag. Berlin-Germany, 2001.
12. SUZUKI R. et al. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* v. 66A, n. 2, p. 396-402, 2003.
13. SUZUKI, R; FRANGOS, J.A. *Clin. Orthop. Rel. Res.* v. 372, p. 280-289, 2000.
14. CONTRERAS, R; SAHLIN, H; FRANGOS J.A. *J Biomed Mater Res A*. v. 80, p.480-485, 2007.
15. HAGFELDT, A; VLACHOPOULOS, N; GRATZEL, M. *J. Electrochem. Soc.* v. 141, p. L82, 1994.
16. GOMEZ, M. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*. v. 62, p. 259, 2000.
17. BOSCHLOO, G.K; GOOSSENS, A; SCHOONMAN, J. *Electrochem. Soc.* v. 144, p. 1311, 1997.
19. NATARAJAN, C; FUKUNAGA, N; NOGAMI, G. *Thin Solid Films*. v. 322 p, 6, 1998.
20. HAMASAKI, Y. *J. Electrochem. Soc.* p. 141, n. 660, 1994.
21. EBELMEN, M.A. *Chim. Phys.* v. 16, p. 129, 1846.
22. PAPOUTIS, D. P. *Langmuir*, v. 10, p. 1684-1689, 1994.
23. SMITH, R; WALSH, F.C; CLARKE, R.L. *J. Appl. Electrochem.* v. 28, n. 10, p. 1021-1033, 1998.
24. LOZANO, M.P. FRAXEDAS, J. *Surf. Interface Anal.* v. 30, p. 623, 2000.
25. PARRA, R. et al. *Chem. Mater.*v. 20, p. 143-150, 2008.

26. MARTÍNEZ-FERRERO, E. et al. *Adv. Funct. Mater.* v. 17, p. 3348, 2007.
27. TOMASZEWSKI, H. et al. *International Journal of Photoenergy.* ID 95213, p. 1-5, 2007.
28. GUANGHUI, F. et al. *J. Non-Cryst. Solids.* v. 112, n. 1-3, p. 454-457, 1989.
29. HUG ,S.J; BAHNEMANN, D. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena.* v. 150, p. 208–219, 2006.
30. OHSAKA, T; IZUMI, F; FUJIKI, Y. *Journal of Raman Spectroscopy.* v. 7, n. 6, p. 321-324, 2005
31. GÖBBELS, K. et al. *Biomaterials.* v. 31, p. 1055–1067, 2010.
32. CARBALLO-VILA, M. *J. Biomed. Mater. Res. A.* v. 90, p. 94, 2009.
33. MORAL, J. *Tesis Doctoral Materiales Electroactivos Híbridos como Substrato de Crecimiento Neuronal de la Universidad Autónoma de Barcelona.* En proceso de elaboración.
34. IKEGAYA, Y. *Neuroscience.* v. 97, p. 215, 2000.
35. ADDAMO, M. et al. *Chem. Comm.* v. 47, p. 4943-4945, 2006.

