

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author



Caracterización y Optimización de Superficies Biomiméticas para Regeneración de Tejido Óseo.

Memoria de Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad
Politécnica de Cataluña.

Virginia Nathaly Paredes Méndez.

Co-dirigida por:

Dr. José María Manero Planella.

Dr. Emiliano Salvagni.

Programa de Doctorado Ingeniería Biomédica.
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.
E.T.S. de Ingeniería Industrial de Barcelona.
Universidad Politécnica de Cataluña.

2012.



Acta de calificación de tesis doctoral

Curso académico:

Nombre y apellidos

Virginia Nathaly Paredes Méndez

DNI / NIE / Pasaporte

X-9724647-V

Programa de doctorado

Ingeniería Biomédica

Unidad estructural responsable del programa

Resolución del Tribunal

Reunido el Tribunal designado a tal efecto, el doctorand / la doctoranda expone el tema de la su tesis doctoral titulada **Caracterización y Optimización de Superficies Biomiméticas para Regeneración de Tejido Óseo**

Acabada la lectura y después de dar respuesta a las cuestiones formuladas por los miembros titulares del tribunal, éste otorga la calificación:

APTA/O NO APTA/O

(Nombre, apellidos y firma)		(Nombre, apellidos y firma)	
Presidente/a		Secretario/a	
(Nombre, apellidos y firma)			
Vocal	Vocal	Vocal	Vocal

_____, _____ de _____ de _____

El resultado del escrutinio de los votos emitidos por los miembros titulares del tribunal, efectuado por la Escuela de Doctorado, a instancia de la Comisión de Doctorado de la UPC, otorga la MENCIÓN CUM LAUDE:

SI NO

(Nombre, apellidos y firma)		(Nombre, apellidos y firma)	
Presidenta de la Comisió de Doctorado		Secretaria de la Comisión de Doctorado	

Barcelona, _____ de _____ de _____

DEDICATORIA.

A **Mami**, porque desde tu nubecita eres una angelita que sigues cuidándome, ite amo del cielo a la tierra!

A **Papi**, por ser el mejor ejemplo de humildad, perseverancia, por tu apoyo incondicional, por ser el motor que me ha impulsado a llegar hasta acá, y por tu infinita paciencia, este título es tuyo y... ¿sabes qué?: ¡Tú y Yo pa' lo que salga!

A mis hermanos:

Soly, aunque querías que nos mantuviésemos cerquita, has aprendido que desde la distancia eres más que vencedora, has tomado la batuta y eres el eje que nos mantiene unidos.

Patry, por ser el toque alegre de cada situación, por tus ocurrencias, por tu apoyo, por el sin fin de anécdotas de los veranos y por tu aporte creativo.

El Negrito, porque aunque siempre serás el niño de la casa, ya te has hecho un "hombre grande", al que admiro, por haberme enseñado otra manera de ver la vida.

A **Trinitica**, por siempre estar entre nosotros.

A **León**, por tu paciencia y asertividad y porque has decidido de corazón ser uno más de nosotros.

A mis sobrinos (**María Patricia y Jesús David**), que apenas tienen una mínima idea de lo que significan para mí, son mi mayor motivación por regresar cada año, ya que tan solo con verles y oírles, me hacen súper feliz.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo que me ha apasionado, y que con gran satisfacción hoy llega a su final, es justo realizar un insight, que me muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible, sin la participación de personas e instituciones que me han facilitado las cosas para que hoy día sea posible decir: Listo Virgi, Ciclo Cerrado!!!. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justa y consecuente, expresándoles mis agradecimientos.

- *Quiero alabar a primeramente a **Papá Dios**, por ser mi luz, compañero en cada paso y demostrarme, que "Todo lo puedo en Cristo que me fortalece" y a la **Virgen** por mantenerme siempre abrigada en su santísimo manto y tomada de la mano.*

- *Quiero dejar patente mi agradecimiento a mi Director de Tesis, el **Dr. José María Manero**, te agradezco por las horas dedicadas a mi formación, por todas tus enseñanzas, por tu constante apoyo durante estos años, por incorporarme a tus proyectos y grupo de investigación y también por los momentos de crisis y alto estrés, por tantas cosas: Gracias, de corazón!*

- *Mi gratitud, para al **Dr. Emiliano Salvagni**, porque mas allá de ser mi co-director, te involucraste en cada fase de mi investigación, trabajaste conmigo mano a mano, me brindaste tu apoyo técnico y tu inestimable amistad.*

- *Deseo extender un sincero agradecimiento al **Dr. Enrique Rodríguez**, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su invaluable experiencia y amplio conocimiento sobre la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, su colaboración fue de gran ayuda durante mis estancias en su laboratorio. Le agradezco también por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo, lo cual se ha visto también reflejado en los buenos resultados obtenidos. Muchas gracias Enrique!*

- *Muchas gracias a todos los miembros del **Grupo de Biomateriales**; por su apoyo en los laboratorios y colaboración en diferentes ensayos, por convertirse en los compañeros que le dieron un toque especial a esta travesía... seguro que no los olvidaré.*

- *Para quienes no solo fueron compañeros de trabajo, sino que se comportaron como un SOL dentro de la Universidad: **Nathalia, Pablo, María, Kiara, Ana Oliva y Ana Guamán** LOS QUIERO MUCHÍSIMO.*

- *Quiero agradecer por la financiación ofrecida a la **Fundación Gran Mariscal de Ayacucho** (Venezuela) y a la **Universidad Politécnica de Cataluña** (España).*

- *Y por sobre todas las cosas, muchísimas gracias a cada una de las maravillosas personas que he conocido en tierras Españolas, gracias por llenar esta etapa de mi vida de imborrables recuerdos, gracias por ser mis compañeros de risas y de tristezas, gracias porque por ustedes logre sentirme como en casa.*

Virginia

RESUMEN

Este proyecto se propone caracterizar y optimizar superficies biofuncionalizadas con diferentes secuencias peptídicas, para lograr la regeneración ósea (oseointegración) y por ende la disminución de los problemas de rechazo que ocurren al implantar materiales metálicos dentro del cuerpo humano.

En base a lo descrito bibliográficamente, se utilizará una aleación de CoCr aprobada por las normas ASTM, para usos en dispositivos médicos y una aleación de Ti libre de Níquel desarrollada para tal fin por el grupo de biomateriales de la UPC.

Para la caracterización y optimización del proceso de biofuncionalización los estudios se dividirán en tres etapas: Limpieza y Activación, Silanización e Inmovilización de biomoléculas.

En cuanto a la limpieza y activación se realizará un estudio comparativo entre el plasma y diferentes tratamientos químicos (piraña en el caso de la aleación de Ti y ácido nítrico para la aleación de CoCr), para seleccionar el mejor en términos de introducción de grupos activos en superficie (grupos hidroxilos), grado de limpieza y composición química de la capa de óxidos superficial.

La silanización es un proceso intermedio que enlaza un material inorgánico (metal) con un material orgánico (biomoléculas), en este proyecto se usarán 3 silanos: APTES+Maleimido, GPTES, CPTES sobre cada una de las superficies y se procederá a seleccionar aquel que presente el mejor enlace covalente con la superficie metálica y la mayor estabilidad térmica, química y mecánica.

Una vez silanizadas las superficies se realizará la inmovilización de diversas secuencias peptídicas (RGD, PHSRN, FHRRIKA, RGD + FHRRIKA Y RGD + PHSRN), que forman parte de las proteínas presentes en el cuerpo humano y por ende podrán ser fácilmente reconocidas por las células; en esta fase se hará un estudio comparativo de la cantidad de peptidos, así como se evaluará también la estabilidad de los mismos sobre las superficies.

Durante el desarrollo de la biofuncionalización se hará énfasis en la optimización de los procedimientos y la caracterización superficial de cada etapa por medio de diversas técnicas, entre ellas: XPS, ángulo de contacto, ToF SIMS, Interferometría, espectrometría de luz UV, y técnicas de fluorescencia.

Para finalizar se evaluará el proceso de optimización, estudiando la influencia de las secuencias pépticas cortas en la respuesta celular, en términos de adhesión y proliferación de células madres mesenquimales de ratas.

Como conclusión de esta tesis se tiene que:

En cuanto a la limpieza y activación superficial, tanto los tratamientos químicos como el plasma de oxígeno limpian eficazmente las superficies, las hacen hidrofílicas y aumentan su energía superficial. Sin embargo la optimización de los procesos permite afirmar que en términos de densidad de grupos OH^- en superficie, y en función de la relación $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$, para el caso de la aleación de CoCr el tratamiento más efectivo es el ácido nítrico y para la aleación de Ti el plasma de oxígeno.

Al evaluar el proceso de silanización mediante el ToF SIMS y el XPS, se pudo identificar la presencia de los organosilanos en superficie y sus respectivos enlaces covalentes. Ahora bien la selección de los mejores silanos se hizo en función del

estudio de estabilidad térmica, química y mecánica, de lo cual se tiene que para la aleación de CoCr, los mejores resultados se consiguieron con APTES+Ma y con GPTES y para la aleación de Ti, se seleccionó el APTES+Ma y el CPTES.

La inmovilización de biomoléculas en superficies fue evaluada por XPS, cuyos resultados sólo permiten distinguir la presencia del péptido en superficie, Subsecuentemente, se realizó un estudio de estabilidad mediante el cual se confirmó que están enlazados covalentemente.

Para afirmar la hipótesis de que la densidad de las biomoléculas adheridas en superficies mejora la respuesta celular, se realizó un estudio celular in vitro y en base a sus resultados se puede concluir que a mayor cantidad de biomolécula, mejor respuesta celular, en términos de cantidad de células adheridas y morfología. Específicamente las mejores respuestas se consiguieron con las muestras silanizadas con APTES+Ma, que contenían RGD y RGD+FHRRIKA, al mismo tiempo que al comparar ambas aleaciones, los mejores resultados se obtuvieron en las superficies de CoCr, en términos de cantidad de células adheridas y área de extensión de las mismas.

ABSTRACT

The aim of this project is to characterise and optimise biofunctionalised surfaces bearing different peptide sequences in order to achieve an improved bone regeneration (osteointegration) and to reduce rejection problems associated with metal implant materials in human body.

On the basis of previous studies reported in the literature, a CoCr alloy approved by the American Society for Testing and Materials (ASTM) was chosen. This material has been widely used for biomedical devices. In addition, a nickel free Ti alloy, previously developed in the biomaterials group at the UPC, was also investigated for the same purpose.

The biofunctionalised surface were achieved in three fundamental steps and characterised after each modification: 1) Cleaning and activation, 2) Silanization and 3) biomolecule immobilization.

As for the cleaning and activation a comparative study between oxygen plasma and acidic treatment (piranha solution for Ti alloy and nitric acid for CrCo alloy) was performed with the aim to select the best method to oxidise the surface, introduce hydroxyl groups and simultaneously remove impurities.

Silanization is an intermediary step that allows to bind an inorganic material (metal) to an organic material (biomolecule). The organosilanes employed on each metal surface for this purpose were three: 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) further derivitised with a Maleimide group for activation, 3-glycidoxypropyltriethoxysilane (GPTES), 3-chloropropyltriethoxysilane CPTES. Covalent binding and mechanical, chemical and thermal stability at the surface were the criteria followed to determine the best silanization method.

The following step was the surface immobilization of different peptide sequences (RGD, PHSRN, FHRRKA, RGD + FHRRKA Y RGD + PHSRN), which are the "active part" of more complex proteins present in the human body that cells may easily recognise and bind. A comparative studies of amount of bound peptide was carried out along with stability studies at the surface.

In order to develop and optimise the whole biofunctionalisation process each modification step was fully characterised by several analytical techniques, such as XPS, contact angle, Tof-SIMS, interferometry, UV light spectrometry and fluorescence techniques.

Finally, to select the best biofunctionalised material samples were tested for mesenchymal rat stem cells (MRSCs) response in terms of number of cells adhered and proliferation at the surface.

In conclusion, this study has proven that: for surface cleaning and activation, either acidic treatments or oxygen plasma demonstrated to be effective for removal of impurities, increase of hydrophilicity and higher surface energy.

Moreover, the optimization process led to the conclusion that for optimal surface activation a high ratio of OH-/O²⁻ is necessary. For CoCr the most effective method for the introduction of hydroxyl groups density at the surface and therefore a higher OH -/O²⁻ ratio was nitric acid, whereas for the Ti alloy was oxygen plasma.

Índice

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
<i>Estado del Arte.....</i>	3
<i>Índice de Tablas del Capítulo I.....</i>	6
<i>Índice de Figuras del Capítulo I.....</i>	6
I.1 INTRODUCCIÓN.....	7
I.2 OBJETIVOS.....	10
I.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
I. 3 ESTADO DEL ARTE.....	11
I.3.1 LOS BIOMATERIALES.....	11
I.3.2. HISTORIA DE LOS BIOMATERIALES METÁLICOS.....	12
I.3.3 PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL USO DE MATERIALES METÁLICOS.....	16
I.3.4 MODIFICACIÓN BIOMIMÉTICA DE LAS SUPERFICIES METÁLICAS.....	20
I.3.5 REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO.....	32
I.4 BIBLIOGRAFÍA.....	41
CAPÍTULO II.....	51
<i>Técnicas de Caracterización.....</i>	51
<i>Índice de Tablas del Capítulo II.....</i>	54
II.1 INTRODUCCIÓN.....	55
II.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	56
II.2.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICA.....	56
II.2.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	59
II.2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR.....	70
II.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	72
II.4 BIBLIOGRAFÍA.....	73
CAPÍTULO III.....	75
<i>Caracterización Físico-Química de las Superficies de CoCr Activadas.....</i>	75
<i>Índice de Tablas del Capítulo III.....</i>	78
<i>Índice de Figuras del Capítulo III.....</i>	78
III.1 INTRODUCCIÓN.....	79
III.1.1 PLASMA CLEANING.....	79
III.1.2 ATAQUE QUÍMICO.....	80
III.2 OBJETIVOS.....	81
III.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	81

III.2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.....	81
III.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
III.3.1 MATERIALES.....	82
III.3.2 MÉTODOS.....	82
III.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	84
III.4.1. CARACTERIZACIÓN DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN DE UNA MUESTRA SIN TRATAMIENTO.....	84
III.4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIMPIEZA.....	87
III.4.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE GRUPOS HIDROXILOS EN SUPERFICIE.....	93
III.4.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CAPA DE ÓXIDOS SUPERFICIALES.....	96
III.4.5 ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE LA ACTIVACIÓN SUPERFICIAL A TRAVÉS DE UN PÉPTIDO FLUORESCENTE.....	99
III.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	102
III.6 BIBLIOGRAFÍA.....	104
<i>CAPÍTULO IV.....</i>	<i>109</i>
<i>Caracterización Físico-Química del Proceso de Silanización de la Aleación de CoCr.</i>	<i>109</i>
<i>Índice de Tablas del Capítulo III.....</i>	<i>112</i>
<i>Índice de Figuras del Capítulo III.....</i>	<i>112</i>
IV.1 INTRODUCCIÓN.....	113
IV.1.1 OBJETIVOS.....	116
IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	117
IV.2.1 MATERIALES.....	117
IV.2.2 MÉTODOS.....	117
IV.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	117
IV.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.....	117
IV.3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.....	118
IV.3.3 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS MUESTRAS SILANIZADAS.....	125
IV.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SUPERFICIES SILANIZADAS, EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	128
IV.5 BIBLIOGRAFÍA.....	130
<i>CAPÍTULO V.....</i>	<i>133</i>
<i>Caracterización Química del Proceso de Inmovilización de Biomoléculas en la Aleación de CoCr.....</i>	<i>133</i>
<i>Índice de Tablas del Capítulo V.....</i>	<i>136</i>
<i>Índice de Figuras del Capítulo V.....</i>	<i>136</i>
V.1 INTRODUCCIÓN.....	137
V.1.1 OBJETIVOS.....	139
V.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	141

V.2.1 MATERIALES.....	141
V.2.2 MÉTODOS.	141
V.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	142
V.3.1.CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS.....	142
V.3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS	143
V.3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	146
V.3.4 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS BIOMOLÉCULAS INMOVILIZADAS EN SUPERFICIE.	153
V.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO ADHERIDO EN SUPERFICIE.	156
V.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LAS BIOMOLECULAS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	158
V.5 BIBLIOGRAFÍA.....	160
CAPÍTULO VI.....	163
<i>Influencia de las Secuencias Peptídicas Cortas en la Respuesta Celular in Vitro sobre Superficies de CoCr.....</i>	<i>163</i>
<i>Índice de Tablas del Capítulo VI</i>	<i>166</i>
<i>Índice de Figuras del Capítulo VI</i>	<i>166</i>
VI.1 INTRODUCCIÓN	167
VI.1.1 OBJETIVOS.	169
VI.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	170
VI.2.1 MATERIALES.	170
VI.2.2 MÉTODOS.	171
VI.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	176
VI.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SEMBRADO CELULAR.	176
VI.3.2 EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN CELULAR.....	178
VI.3.3 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PROLIFERACIÓN.	182
VI.4 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS CON SECUENCIAS PEPTÍDICAS CORTAS, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO.....	185
VI.5 BIBLIOGRAFÍA.....	186
CAPÍTULO VII.	189
<i>Caracterización Físico-Química de la Aleación de TiHfNb Biofuncionalizada.</i>	<i>189</i>
<i>Índice de Tablas del Capítulo VII</i>	<i>193</i>
<i>Índice de Figuras del Capítulo VII</i>	<i>194</i>
VII.1 INTRODUCCIÓN	195
<i>VII.2 PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN SUPERFICIAL.</i>	<i>197</i>
VII.2.1 INTRODUCCIÓN.....	197
VII.2.1.2 ATAQUE QUÍMICO PARA LA ALEACIÓN DE Ti.	197
VII.2.2 OBJETIVOS.	198

VII.2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.	199
VII.2.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	201
VII.2.4.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES ACTIVADAS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS.	211
<i>VII.3 PROCESO DE SILANIZACIÓN.</i>	<i>213</i>
VII.3.1 OBJETIVOS.	213
VII.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	215
VII.3.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	215
VII.3.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SUPERFICIES SILANIZADAS, EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	223
<i>VII.4 PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.</i>	<i>225</i>
VII.4.1 OBJETIVOS.	225
VII.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	226
VII.4.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	226
VII.4.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LAS BIOMOLECULAS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	231
<i>VII.5 RESPUESTA CELULAR IN VITRO.</i>	<i>233</i>
VII.5.1 OBJETIVOS.	233
VII.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	234
VII.5.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	234
VII.5.4 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS CON SECUENCIAS PEPTÍDICAS CORTAS, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO.	240
VII.6 BIBLIOGRAFÍA.	241
CAPÍTULO VIII.	245
<i>Conclusiones Finales</i>	<i>245</i>
PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN	247
PROCESO DE SILANIZACIÓN.....	248
INMOVILIZACIÓN DE LA BIOMOLÉCULA	249
RESPUESTA CELULAR.....	250

INTRODUCCIÓN

Esta tesis doctoral se enmarca dentro de un proyecto de investigación del Ministerio que lleva por título: **"Biofunctionalized surfaces for tissue repair and regeneration" (2009-2011)**, el cual tiene como objetivo principal desarrollar superficies biofuncionalizadas en diferentes materiales (polímeros y metales), con una serie de biomoléculas funcionales (péptidos y bpolímeros) para emplearse en las siguientes aplicaciones: cardiovascular, regeneración ósea y regeneración nerviosa. A su vez este proyecto incluye la síntesis de algunas de las biomoléculas, la modificación controlada de la topografía de las superficies, y con mayor relevancia, el enlace covalente de las biomoléculas funcionales por medio de rutas químicas apropiadas, para conseguir superficies estables y biológicamente activas.

En la parte metálica de este proyecto se proponen diferentes materiales tales como: 1) CoCr (ASTM 1537), Ti cp, TiNbHf para aplicaciones óseas o 2) CoCr (ASTM F90) para aplicaciones cardiovasculares, en ambos casos se usaron diferentes secuencias peptídicas (RGD, PHSRN, FHRRKA, YIGSR) o biopolímeros genéticamente modificados.

Dentro del ámbito de la regeneración ósea, en esta tesis, se han elegido dos aleaciones de gran interés tanto desde el punto de vista comercial (CoCr ASTM1537) como desde el punto de vista de aplicaciones futuras (TiHfNb).

La aleación Ti16Hf25Nb ha sido desarrollada dentro departamento de ciencias de los materiales de la UPC y presenta una serie de ventajas:

- Menor módulo elástico que las aleaciones comerciales.
- No citotóxica.
- Biocompatibilidad.
- Pseudoelasticidad en determinadas condiciones.

A la hora de seleccionar las mejores biomoléculas, una forma directa y sencilla de estudiar la eficacia de las diferentes superficies biomiméticas, es a través del estudio del comportamiento celular mediante cultivos celulares "in vitro". Obviamente, éste es un método válido y sencillo, no obstante, quedan procesos sin estudiar como por ejemplo, las diferentes etapas intermedias (activación superficial, silanización, enlace covalente con las biomoléculas) necesarias para injertar biomoléculas.

Es por ello que se ha considerado que la caracterización y optimización de cada etapa del proceso puede aportar una información valiosa, por lo cual, esta tesis doctoral se enfoca en el estudio de estas superficies biomiméticas, caracterizando y optimizando cada proceso intermedio y aunque es una forma algo más compleja de abordar el problema, como se mencionó anteriormente, los resultados permitirán optimizar el anclaje de las biomoléculas propuestas y por tanto, su respuesta celular.

No obstante, uno de los principales problemas a la hora de afrontar este reto, es la utilización de técnicas de caracterización superficial lo suficientemente sensibles (para medir concentraciones atómicas bajas) y superficiales (a nivel nanométrico) que puedan detectar y caracterizar las superficies biomiméticas (organosilanos, secuencias peptídicas cortas y/o tipos de enlaces).

En la literatura existe una gran diversidad de técnicas de caracterización superficial, que aportan diferentes informaciones. Hay técnicas que aportan información química de la superficie como la espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS), espectroscopia de electrones Auger (AES) o espectroscopia de masas de iones secundarios (SIMS)); información topográfica como microscopía de fuerzas atómicas (AFM), microscopía de efecto túnel (STM) o microscopía de electrones de baja energía (LEEM); o información cristalográfica mediante técnicas de difracción (LEED). Lógicamente todas las técnicas presentan ventajas e inconvenientes.

En esta tesis, a la hora de caracterizar y optimizar los procesos que intervienen en la inmovilización de las biomoléculas propuestas, se ha elegido y profundizado la técnica de XPS ya que presenta una serie de ventajas:

- Análisis químico elemental para $Z > 3$.
- Análisis superficial (3nm - 10nm).
- Buena reproducibilidad.
- Reporta información química (tipo enlace).

Un motivo muy importante para elegir esta técnica ha sido que los picos de fotoemisión obtenidos a través de la misma son muy sensibles al estado de carga del átomo, como por ejemplo cambios de oxidación, electronegatividad de los ligandos o tipo de enlaces. Todas estas ventajas sugieren que la técnica de XPS presenta una gran potencialidad a la hora de caracterizar las modificaciones propuestas en este proyecto de investigación.

Adicionalmente se han incluido otras técnicas de caracterización a lo largo de la tesis (ángulo de contacto, ToF-SIMS, interferometría, técnica de sustitución del complejo de zinc, espectrofotometría de luz UV/visible y fluorescente, etc.), con el fin de explorar y profundizar en las posibles aplicaciones en este campo.

Una vez elegido los mejores procesos de activación, organosilanos, y adhesión covalente del péptido, se realizó una valoración del proceso de optimización a través de un estudio biológico mediante cultivos celulares estudiando la influencia de las diferentes secuencias peptídicas sobre los procesos de adhesión y proliferación celular.

CAPÍTULO I.

Estado del Arte.

<i>CAPÍTULO I</i>	3
<i>Estado del Arte</i>	3
I.1 INTRODUCCIÓN.	7
I.2 OBJETIVOS.	10
I.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
I. 3 ESTADO DEL ARTE.....	11
I.3.1 LOS BIOMATERIALES.	11
I.3.2. HISTORIA DE LOS BIOMATERIALES METÁLICOS.	12
I.3.2.1 BIOCOPATIBILIDAD DE LAS ALEACIONES DE CoCr.	13
I.3.2.2 BIOCOPATIBILIDAD DE LAS ALEACIONES DE TI LIBRE DE NI.	15
I.3.3 PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL USO DE MATERIALES METÁLICOS.....	16
I.3.3.1 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD.....	17
I.3.3.2. LESIONES CUTÁNEAS.	19
I.3.3.3. AFLOJAMIENTO ASÉPTICO.....	19
I.3.4 MODIFICACIÓN BIOMIMÉTICA DE LAS SUPERFICIES METÁLICAS.	20
I.3.4.1 ESTADO ACTUAL DE LAS SUPERFICIES BIOMIMÉTICAS.	20
I.3.4.1. LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN.	24
I.3.4.2 SILANIZACIÓN.	26
I.3.4.3 INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.	28
I.3.5 REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO.....	32
I.3.5.1 INTERACCIÓN OSTEÓBLASTOS-METAL.	36
I.3.5.2 BIOMOLÉCULAS QUE INDUCEN LA OSEOINTEGRACIÓN SOBRE METALES. .	38
I.4 BIBLIOGRAFIA.	41

Índice de Tablas del Capítulo I

*Tabla I 1 Propiedades Mecánicas Típicas de los Metales.*¹¹ 11

*Tabla I 2 Composición Química de las Aleaciones de Co para Implantes.*¹¹ 14

*Tabla I 3 Clasificación de las técnicas de tratamiento superficial de los metales para los dispositivos médicos de acuerdo al proceso y el propósito.*⁷¹ 21

Índice de Figuras del Capítulo I

Figura I 1 Diagrama Esquemático de los Tejidos. Duros 7

Figura I 2 Población sensible al Níquel(%). 18

Figura I 3 Proceso de Biofuncionalización. 23

*Figura I 4 Proceso de Formación de grupos hidroxilos sobre óxidos de titanio(A) y la disociación de los mismos a diferentes pH (B).*⁷¹ 24

Figura I 5 Interfaz Metal-Biomolécula. 26

Figura I 6 Esquema de los Organosilanos..... 26

*Figura I 7 Mecanismos de adhesión celular sobre materiales sintéticos.*⁹³ 29

*Figura I 8 Evolución de las Superficies Bioadhesivas.*⁹³ 29

Figura I 9 Hueso 32

*Figura I 10 Sustancias que intervienen en la regeneración de tejido óseo.*¹⁰⁸ 33

Figura I 11 Aminoácidos 38

Figura I 12 Fórmula General de los Aminoácidos..... 39

*Figura I 13 Formación de un Dipéptido.*¹²² 39

I.1 INTRODUCCIÓN.

Un diagrama esquemático del los tejidos duros del cuerpo humano es mostrado en la *Figura I 1*, los tejidos duros frecuentemente sufren daños debido a accidentes, envejecimiento, y otras causas. Por tanto en la actualidad los procedimientos quirúrgicos para la sustitución con materiales artificiales de los huesos dañados es una práctica común.¹

Dependiendo de la región en la cual el implante ha de ser insertado y las funciones que debe desempeñar, los requerimientos de diseño han de ser diferentes.

La búsqueda de nuevos materiales para la reparación y/o regeneración de tejidos duros (huesos y dientes), es en la actualidad, uno de los campos de investigación más interesantes de la ciencia de materiales.

El aumento de fracturas relacionadas con la osteoporosis y pérdida ósea representa actualmente uno de los mayores problemas en este campo. Adicionalmente, existen estudios que estiman que en el futuro más de un cincuenta por ciento de todas las personas mayores de 60 años sufrirán enfermedades degenerativas de las articulaciones. Por tanto, esta área está experimentando un gran avance, como consecuencia de la necesidad de tratar a un gran número de pacientes, unido al aumento de la expectativa de vida y a la obligación de asegurar a la población una mejor calidad de vida.²

En el año 2005 se realizaron más de 360.000 operaciones de cadera en Estados Unidos y más de 450.000 en Europa. En Estados Unidos, más de un 15% de las intervenciones fueron para sustituir implantes rotos o deteriorados, mientras que en Europa, este caso, representa un 10% de las operaciones. El coste asociado a las operaciones de sustitución de cadera y rodilla en Europa fue del orden de 1.800 millones de dólares en el año 2005 y se estima que el número de intervenciones aumentará cada año entre un 4 y un 8%.²

Según un artículo publicado en Europa Press Latinoamérica (ep/latam) en enero de 2012, reportan que: las caderas artificiales realizadas completamente en metal fueron desarrolladas para ser más durables que los implantes tradicionales, que combinan una bola de cerámica o metal con una cubierta plástica. Siendo Johnson & Johnson (J&J) el mayor productor de los dispositivos íntegramente metálicos, seguido de otros fabricantes como Zimmer Holdings Inc y Wright Medical Group. Sin embargo J&J retiró su implante totalmente de metal ASR en el 2010 y desde entonces ha destinado 3.000 millones de dólares a cubrir los costos legales relacionados con demandas de pacientes. Estudios recientes demostraron que estos productos fallan a tasas mayores que sus antecesores y que podrían filtrar altas

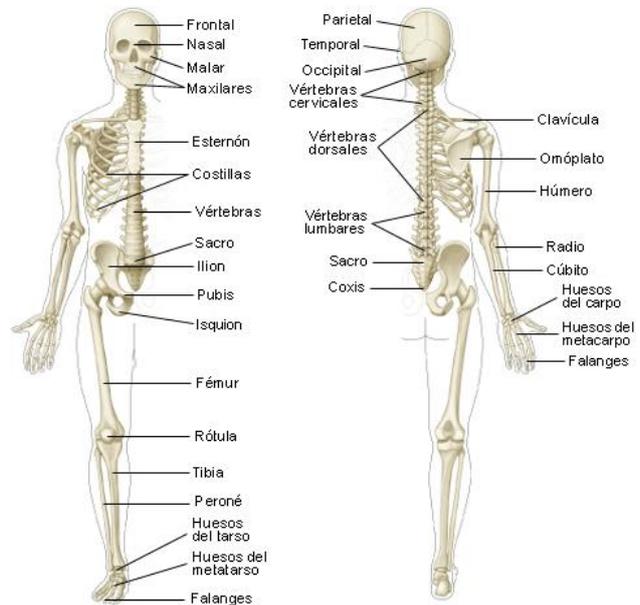


Figura I 1 Diagrama Esquemático de los Tejidos.

concentraciones de iones de metal en el torrente sanguíneo.³ Estos datos revelan la importancia del estudio y desarrollo de nuevos materiales que permitan una mayor durabilidad del implante reduciendo así los costos de operaciones de sustitución de los mismos.

En cuanto a los implantes dentales, se estima que la probabilidad de fallo durante el primer año se encuentra entre el 8% y el 3%⁴ y que cada año un 1% de los implantes han de ser sustituidos o reparados.⁵ Con aproximadamente 2 millones de nuevos implantes dentales realizados cada año en el mundo, se calcula que el número de fallos anuales se encuentra entre 200.000 y 250.000.⁶

Los datos expresados anteriormente, son los que justifican el aumento acelerado de líneas de investigación de biomateriales para aplicaciones óseas. Aunado a que las fallas de un material son multicausales, las propiedades de un material implantable dependen de factores biológicos, mecánicos y cinéticos, por lo que para su estudio se deben considerar simultáneamente muchos factores, entre ellos la composición química de la superficie, las propiedades mecánicas, las partículas liberadas como consecuencia del desgaste y degradación a que pueda dar lugar y la respuesta celular.

El hecho de los costos de resustitución de un implante ha de ser motivo de análisis, pero es de mayor relevancia su biocompatibilidad; debido a que, poco tiempo después de la aplicación de los implantes metálicos, aparecieron inconvenientes a causa de la corrosión o por inadecuadas propiedades mecánicas, lo cual ha afectado el cumplimiento de la función para la cual fueron diseñados. Por tanto, partiendo de la premisa que el uso de biomateriales en ingeniería de tejidos y en la medicina regenerativa se busca la reparación y la mejora funcional de tejidos y órganos⁷ y que la calidad superficial de un biomaterial es determinante para conseguir respuestas adecuadas de regeneración, entonces la biocompatibilidad de los biomateriales para interactuar con sistemas biológicos, dependerá de la fase inicial de adhesión de las células al implante⁸, por tanto, las características de la superficie de los materiales (energía superficial, propiedades mecánicas, topografía, composición química) desempeñan un papel esencial. Ya que conseguir una interfaz estable entre la superficie del material y las células generadoras de tejido óseo (osteoblastos) sin formación de tejido fibroso, garantizará el proceso de oseointegración.

Ahora bien, para la obtención de la respuesta celular deseada (adhesión de osteoblastos) es esencial optimizar la interfaz hueso-biomaterial. Y conocer las biomoléculas implicadas, en particular las proteínas involucradas en la adhesión de los osteoblastos en contacto con el material.

En la actualidad se han definido diferentes mecanismos de biofuncionalización de superficies metálicas y se está trabajando con diversas biomoléculas buscando que garanticen la óptima oseointegración de los implantes. La mayor parte de los trabajos realizados basan la evaluación en la respuesta celular, sin embargo las características físico-químicas de las superficies no se encuentran totalmente definidas.

El término funcionalización se refiere a modificar la composición química superficial del material a base de fijar grupos funcionales en él. Existe el caso concreto en que las cadenas fijadas son cadenas orgánicas, con grupos funcionales tales como son el carboxilo (-COOH), tiol (-SH) o amino (-NH₂) hablándose por lo tanto de

biofuncionalización. Dichas cadenas son capaces de formar enlaces covalentes con diversas moléculas bajo ciertas condiciones fisiológicas permitiendo una interacción estable entre el material y el sistema biológico.⁹

Por este motivo en este proyecto se realizará la caracterización de las modificaciones superficiales con el fin de conocer cómo la química de superficie, la mojabilidad, la energía superficial, entre otros factores, favorecen la respuesta celular de los implantes y por ende facilitan los procesos de regeneración del hueso.^{7,10}

Para la selección del material a caracterizar se tuvo en cuenta que los implantes metálicos usados actualmente para ortopedia y para aplicaciones dentales son comúnmente de aceros inoxidables, las aleaciones de CoCr, de titanio y sus aleaciones, por tanto, en este proyecto se evaluará:

1. Una aleación de CoCr comercialmente aprobada por la norma ASTM F1537 (American Society for Testing and Materials) para aplicaciones biomédicas.

2. Una aleación de Ti libre de níquel y de bajo módulo, desarrollada en el departamento de ciencia de los materiales de la Universidad Politécnica de Cataluña.

Estas dos aleaciones metálicas difieren tanto en sus características químicas y físicas, como en sus propiedades mecánicas, un ejemplo de ello es que de las aleaciones usadas para implantes óseos las que poseen el mayor módulo elástico son las aleaciones de CoCr (220GPa), y lo novedoso de la aleación de Ti seleccionada, es su bajo módulo y sus propiedades de pseudoelasticidad bajo condiciones de trabajo en frío.

Al trabajar con ambas aleaciones de manera paralela, se aportará una visión de cómo las características física o químicas de las superficies, interfieren en el proceso de biofuncionalización y en la respuesta celular?

Por otra parte las biomoléculas seleccionadas incluirán secuencias de aminoácidos que forman parte de la matriz extracelular de los tejidos óseo, con el fin de promover la respuesta osteoblástica. Dichos péptidos se diseñarán de tal manera que siendo secuencias cortas, puedan ser detectables, mediante técnicas de caracterización química y con ello se podrá caracterizar el proceso de inmovilización de las biomoléculas.

Como paso previo a la inmovilización de las biomoléculas, se requerirá realizar modificaciones superficiales que aporten grupos funcionales a las superficies, (grupos hidroxilos) de tal manera que los mismos faciliten el proceso de silanización, que servirá para crear la interfaz de unión entre el metal y las biomoléculas.

Esta fase es crucial ya que la biofuncionalización de las superficies tiene como objetivo fundamental realizar enlaces estables entre un material inorgánico y un material orgánico. Una vez biofuncionalizadas las superficies, se procederá a evaluar la respuesta celular.

I.2 OBJETIVOS.

En base a lo anterior se tiene que el objetivo principal del proyecto es:

“Caracterizar y optimizar el proceso de modificación biomimética de dos superficies metálicas (aleación de CoCr ASTM F1537 y TiNbHf), para promover la regeneración de tejido óseo”.

I.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar física y químicamente el proceso de activación superficial para dos aleaciones (CoCr ASTM F1537 y TiNbHf) utilizadas para aplicaciones óseas y seleccionar el mejor tratamiento en términos de introducción de grupos activos en superficie (grupos hidroxilos), grado de limpieza superficial y composición química de la capa de óxidos superficial.
2. Evaluar el proceso de silanización para dos aleaciones (CoCr ASTM F1537 y TiNbHf) previamente activadas, y seleccionar el mejor silano en términos de porcentajes de silano adherido y estabilidad de esta unión.
3. Optimizar el proceso de inmovilización de secuencias peptídicas cortas, para dos aleaciones (CoCr ASTM F1537 y TiNbHf) previamente silanizadas, en términos de porcentaje de péptido adherido y estabilidad del enlace químico (S-C).
4. Validar el proceso de optimización de la modificación biomimética de las superficies, evaluando la influencia del uso de secuencias peptídicas cortas, en la respuesta celular, en términos de adhesión y proliferación de células mesenquimales de ratas.

I. 3 ESTADO DEL ARTE.

Dentro de los materiales utilizados para implantes óseos se encuentran tres clases: los metales, los cerámicos y los polímeros. Los mismos poseen muchas clases de propiedades (ejemplo: mecánicas, químicas, térmicas, ópticas, eléctricas, magnéticas), pero para la mayoría de las aplicaciones biomédicas se toman en consideración dos de ellas: propiedades mecánicas (*Tabla I 1*) y reactividad (química). Las propiedades de la superficie de los materiales usados para implantes médicos, han demostrado tener una influencia directa en el control de las interacciones dinámicas que toman lugar en la interfaz tejido-implante.

La importancia de las superficies de los materiales ha sido apreciada desde 1960, por tanto, en este capítulo se describirá la evolución histórica de los materiales metálicos, realizando el uso de las aleaciones de Ti y de CoCr usadas para aplicaciones óseas y su influencia en la regeneración de tejido óseo.

Tabla I 1 Propiedades Mecánicas Típicas de los Metales.¹¹

Material	ASTM designation	Condition	Young's modulus (GPa)	Yield strength (MPa)	Tensile strength (MPa)	Fatigue endurance limite (at 10 ⁷ cycles, (R=-1 ^a) (MPa)
Stainless steel	F75	Annealed	190	221	483	221-280
	F55, F56, F138, F139	Annealed	190	331	586	241-276
		30% cold worked	190	792	930	310-448
		Cold forged	190	1213	1351	820
CoCr alloys	F75	As-cast/annealed	210	448-517	655-889	207-310
		P/M HIP ^b	253	841	1277	725-950
	F799	Hot forged	210	896-1200	1399-1586	600-896
	F90	Annealed	210	448-648	951-1220	Not available
		44% cold worked	210	1606	1896	586
	F562	Hot forged	232	965-1000	1206	500
	Cold worked, aged	232	1500	1795	689-793	
Ti alloys	F67	30% cold-worked Grade 4	110	485	760	300
	F136	Forged annealed	116	896	965	620
		Forged, heat treated	116	1034	1103	620-689

^a R is defined as $\sigma_{\min}/\sigma_{\max}$

I.3.1 LOS BIOMATERIALES.

Diversas definiciones se han desarrollado para los biomateriales a lo largo de los años. En sus inicios se admitió la definición desarrollada por los expertos en este

campo que indicaba que los biomateriales son materiales sintéticos o naturales utilizados para reemplazar las piezas de un sistema vivo o alguna de sus funciones, en íntimo contacto con los tejidos vivos,^{12,13} sin embargo, en el 2009, se presentó una definición más avanzada, en la cual un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para tener una forma que solo o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, por el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria.¹⁴ Por tanto para que un material pueda ser considerado como biomaterial, no solo debe tener una composición adecuada, sino también se consideran las partículas liberadas como consecuencia de su desgaste y de los productos de degradación a que pueda dar lugar. Aun cuando, se tiene presente que la tolerancia o la toxicidad de cualquier sustancia en el organismo humano es una función de la concentración en la que se encuentra presente.¹⁵

Los requisitos para la utilización de los metales como materiales implantables son tenacidad a la fractura, buenas propiedades mecánicas y buena resistencia a la corrosión; debido a que la corrosión, es un problema general de los metales, más aún si están inmersos en un medio hostil como es el organismo humano, y a temperaturas del orden de 37 °C. Sin embargo, algunos metales por lo menos en principio escapan a problemas de rechazo y corrosión (los metales preciosos) y otros al formar una capa de óxido en su superficie, es decir se pasivan, protegiendo el interior del metal y evitando que avance la corrosión (como ocurre con el titanio).^{15,16}

I.3.2. HISTORIA DE LOS BIOMATERIALES METÁLICOS.

Aun cuando la definición de un biomaterial pertenece al siglo XX. El uso de un material inorgánico dentro del cuerpo humano, data de la época de la prehistoria. En Europa en un cadáver el año 200 d.C. fue encontrado un implante de hierro y fue descrito como correctamente integrado al hueso.¹¹ Así mismo, los Mayas usaron dientes de nácar procedentes de las conchas de mar en alrededor de 600 d.C. y aparentemente, también lograron la integración de los huesos.¹¹

Posteriormente para siglo XVI en Europa se comenzó a usar el oro y la plata para la reparación dental y luego hilos de hierro para la inmovilización de fracturas óseas. En el siglo XIX se empleó cuero, polímeros naturales y/o madera en la fabricación de prótesis; los resortes contribuyeron también al desarrollo de nuevos mecanismos para la fabricación de elementos de transmisión de la fuerza y para la sujeción.¹³

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

A principios de 1900 se aplican las primeras placas óseas hechas de metal con la finalidad de separar o unir roturas o fracturas. Durante los siguientes años las aleaciones metálicas constituyen la única forma de biomateriales en uso. Pero al poco tiempo de su aplicación aparecieron inconvenientes causados por la corrosión o porque los metales carecían de las propiedades mecánicas necesarias para cumplir adecuadamente la función para las que fueron diseñados. Por tanto, en

1940 se trató de mejorar la resistencia a la corrosión agregando un bajo porcentaje de molibdeno.^{13,16}

El mayor auge de los implantes se dio en la década de los 50, después de la segunda guerra mundial, ya que se vio, que la inclusión de partículas metálicas en el cuerpo de los soldados heridos era bien tolerada, lo cual otorgó a los médicos un criterio empírico, que justificó el uso de implantes metálicos, para corregir daños en el cráneo o para la fijación interna de fracturas.

Las prótesis iniciales fueron de Vitallium, compuesto de cromo, cobalto, molibdeno y trazas de níquel, tenían superficies con fricción metal-metal, lo que resultaba en un depósito de partículas metálicas en los tejidos de la articulación. Posteriormente se usó el acero inoxidable, cuya fricción producía la liberación y depósito de iones de níquel, cromo y cobalto en la articulación y los tejidos, y aflojaba los implantes de la articulación en una cuarta parte de los pacientes.¹⁷

Hacia 1960 se redujo la concentración de carbono en los aceros inoxidables. Posteriormente se introdujo el titanio y sus aleaciones con niobio, tántalo y níquel.^{13,16} Durante esta década, se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante, e hizo su aparición el término biocompatibilidad para definir el grado de tolerancia del material por parte de la materia viva, pero sin dejar muy clara la definición de biocompatibilidad, ya que ésta no es una propiedad cuantificable, por ende es bastante ambigua, debido a que es un concepto muy general, que debe darse a materiales de diferentes características, que van actuar en diferentes ambientes y con prestaciones de servicio variadas, sin embargo la biocompatibilidad se podría interpretar como "la aceptabilidad biológica y el estudio de la interacción de los biomateriales con los tejidos susceptibles de estar en contacto con ellos".¹⁶

Hasta finales del siglo XX el acero inoxidable, las aleaciones de CoCr, el titanio y sus aleaciones continúan siendo los metales más usados para la fabricación de implantes para la sustitución de tejidos duros.^{11,18}

I.3.2.1 BIOCMPATIBILIDAD DE LAS ALEACIONES DE CoCr.

Las aleaciones de Co han sido ampliamente utilizadas en aplicaciones de implantes quirúrgicos debido a sus excelentes propiedades de resistencia a la biodegradación, resistencia a la corrosión y a sus buenas propiedades mecánicas, incluyendo la tracción máxima y resistencia a la fatiga.¹⁹

En cuanto al grado de toxicidad de los implantes de CoCr, existen estudios que avalan el uso de esta aleación;²⁰ ya que se han medido los niveles de iones en el suero, plasma, glóbulos rojos, y toda la sangre en cada paciente y los resultados indican que sólo muy pequeñas cantidades de Cr y Co se asocian con los glóbulos rojos, y la mayoría están asociadas con el suero/plasma.

En relación a los dispositivos médicos fabricados con aleaciones de CoCr, existen actualmente estudios que aportan que la hipersensibilidad pudiese ocurrir, pero es muy infrecuente y es objeto de gran parte de la investigación en la actualidad, además en ellos también se afirma, que no existe evidencia que apoye la hipótesis de efectos perjudiciales para la salud, debido a la liberación de iones de estos elementos. Referente a los implantes de traumatología, como reemplazos de

cadera de metal sobre metal no parecen sufrir los fracasos de los implantes iniciales, debido a las mejoras en su diseño y tecnología de fabricación.²¹

Los tipos de aleaciones de CoCr recomendados para aplicaciones en implantes óseos, son las aleaciones forjadas, aunque se utilizan en ocasiones aleaciones coladas a la cera perdida.

Estas aleaciones están normalizadas bajo la ASTM y las más usadas han sido: ASTM F75, ASTM 799, ASTM F1537 y ASTM F562 (*Tabla I 2*).

Tabla I 2 Composición Química de las Aleaciones de Co para Implantes.¹¹

Material	ASTM designation	Common/trade names	Composition (wt%)
CoCrMo	F75	<ul style="list-style-type: none"> • Vitallium • Haynes-Stellite 21 • Protasul-2 • Micrograin-Zimaloy 	58.9-69.5 Co 27.0-30.0 Cr 5.0-7.0 Mo max 1.0 Mn max 1.0 Si max 1.0 Ni max 1.0 Fe max 1.0 C
CoCrMo	F799	<ul style="list-style-type: none"> • Forged CoCrMo • Thermomechanical CoCrMo • FHS 	58-59 Co 26.0-30.0 Cr 5.0-7.0 Mo max 1.0 Mn max 1.0 Si max 1.0 Ni max 1.5 Fe max 0.35 C max 0.25 N
CoCrWNi	F90	<ul style="list-style-type: none"> • Haynes-Stellite 25 • Wrought CoCr 	45.5-56.2 Co 19.0-21.0 Cr 14.0-16.0 W 9.0-11.0 Ni max 3.0 Fe 1.0-2.0 Mn 0.05-0.15 C max 0.04 P max 0.40 Si max 0.03 S
CoNiCrMoTi	F562	<ul style="list-style-type: none"> • MP 35 N • Biophase • Protasul-10 	29-38.8 Co 33.0-37.0 Ni 19.0-21.0 Cr 9.0-10.5 Mo max 1.0 Ti max 0.15 Si max 0.01 S max 1.0 Fe max 0.15 Mn

ASTM F75 (59-69% Co, 27-30 % Cr, 5-7 Mo) posee las más bajas propiedades mecánicas de toda la familia de las aleaciones de CoCr,²² sin embargo se caracteriza por su excelente resistencia a la corrosión, la cual se encuentra relacionada por la composición de su capa de óxido superficial, constituida mayoritariamente por Cr₂O₃. Esta aleación ha sido usada ampliamente en aplicaciones aeroespaciales y en implantes biomédicos.¹¹

ASTM 799 (58-59 % Co, 26-30 % Cr, 5-7 % Mo) ésta es básicamente una modificación de la F75, que ha sido procesada mecánicamente por forjado en caliente después de la fundición,¹¹ posee buenas propiedades de resistencia a la

fluencia, a la tensión y a la fatiga las cuales son el doble de las exhibidas por la ASTM F75.²²

ASTM F90 (46-56% Co, 19-21% Cr, 14-16% W, 9-11% Ni) el tungsteno y el níquel son añadidos, para mejorar la maquinabilidad y la fabricación. Cuando se fabrica por recocido, sus propiedades mecánicas son similares a las ASTM F75, sin embargo, cuando es trabajada en frío sus propiedades mejoran.¹¹

ASTM F562 (29-38 % Co, 19-21% Cr, 9-10.5 % Mo, 33-37% Ni) presenta alta resistencia a la tensión debido a una combinación excepcional de endurecimiento por trabajo en frío, endurecimiento por solución sólida y endurecimiento por precipitación del Co_3Mo . Por tanto posee el más alto valor de resistencia a la fatiga de todas las aleaciones metálicas (700-800 MPa).²² Es ampliamente la más usada, aun cuando es más costosa que la ASTM F75.

Adicionalmente en el mercado se consigue otra aleación de Co comercial, que está aprobada por ASTM F1537 (60-69% Co, 27-30 % Cr, 5-7 Mo) con propiedades muy similares a la ASTM F75,²² que es de más fácil adquisición y en base a sus buenas propiedades ésta ha sido la que se ha seleccionado para el desarrollo de este trabajo.

I.3.2.2 BIOCMPATIBILIDAD DE LAS ALEACIONES DE TI LIBRE DE NI.

El titanio (Ti), posee una alta resistencia a la corrosión (casi tan resistente como el platino) y cuando está puro, es un metal ligero, fuerte, brillante, de color blanco metálico y una relativa baja densidad. Tiene muy buenas propiedades mecánicas y es reconocido como biomaterial por su capacidad de no reaccionar con el organismo, gracias a su elevada resistencia a la corrosión tanto en algunos medios inorgánicos como en casi todos los orgánicos, es decir, se trata de un material bioinerte.

Las aleaciones de Ti presentan una excepcional resistencia específica (resistencia tensión/densidad), un bajo módulo elástico, (mucho menor al de los aceros inoxidables), pasivación espontánea de una capa de TiO_2 ; siendo por esto catalogado como el mejor material bioinerte, para aplicaciones en implantes.²³

La aleación Ni-Ti (NitinolTM), descubierta por G. Buehler en 1962, contiene aproximadamente 56% de Ni y el resto de Ti y posee excelentes propiedades de memoria de forma y superelasticidad a temperatura ambiente. El nitinol se usa extensivamente en cirugía ortopédica, en stents para cirugía cardiovascular, en grapas para aneurismas, en cirugía endovascular y en alambres de ortodoncia.

Aun cuando actualmente el nitinol se continúa utilizando para implantes médicos, existen estudios que hacen referencia a alergias causadas por la liberación de iones de Ni dentro del cuerpo humano,^{24,25} ya sea cuando es transportado por la sangre, en particular por la albúmina; como también por los aminoácidos y las proteínas del plasma. Por tal razón es viable pensar, en el uso de aleaciones de Ti libres de Ni, debido a que el Ti posee una alta resistencia a la corrosión y excelentes propiedades mecánicas.

Por los problemas que ha presentado el nitinol en cuanto a liberación de iones de Ni, varios estudios realizados para evaluar la biocompatibilidad de diferentes tipos de materiales,²⁶ han demostrado que si bien el titanio es uno de los materiales que mejor respuesta presenta a la inserción en el organismo vivo; el **niobio**, el tántalo

y el circonio han resultado ser materiales no tóxicos y favorables para ser usados con aleaciones de titanio en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, estas aleaciones no son bioactivas, es decir, no forman una unión fuerte con el tejido óseo (un material es bioactivo si permite la colonización de su superficie por parte de las células osteoprogenitoras²⁴). Adicionalmente, en la actualidad se están estudiando aleaciones de Ti libres de níquel y han ido surgiendo diversas aleaciones de Ti con elementos reportados como β estabilizantes tales como **Nb**, Zr, **Hf**, Pd, Ta.^{1,24,27-29}

Además de evitar los problemas de alergias a causa del uso del Ni, la tendencia actual es buscar una aleación libre de Ni con memoria de forma o de aleaciones de titanio súper elástico con módulos bajos. De hecho alambres para ortodoncia, de tipo β como el Ti-Mo-Zr-Sn ya se ha puesto en práctica, del mismo modo se han obtenido aleaciones de Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr que han sido sometidas a trabajo en frío y el tratamiento térmico y han exhibido un comportamiento superelástico, por tanto en Japón, la licencia oficial para la aplicación de Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr como alambre para ortodoncia se ha publicado muy recientemente (2007).²⁸

En base a las posibles aleaciones, existen diversos estudios y diferentes combinaciones, de entre las cuales en la presente tesis se trabajó con una aleación desarrollada en el grupo de investigación de la UPC: Ti-16.2Hf-24.8Nb, esta aleación presenta un módulo elástico de 67 GPa, que es menor que el de las aleaciones comerciales, una elevada capacidad para ser trabajada en frío, si es tratada termomecánicamente presenta buenas propiedades de resistencia al desgaste y absorción de vibraciones, características de las aleaciones con memoria de forma y además ha permitido disminuir el módulo elástico a 44 GPa para una laminación del 95%.³⁰

Esta aleación fue seleccionada para la aplicación en implantes óseos, debido: su bajo módulo elástico, (haciéndolo mucho mas semejante al del hueso humano cortical o compacto), excelentes propiedades de pseudoelasticidad y por ser una aleación de Ti libres de níquel con lo que no se encuentra asociadas con reacciones alérgicas alrededor del tejido.

1.3.3 PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL USO DE MATERIALES METÁLICOS.

Los principios de diseño y los criterios de producción de los implantes ortopédicos son los mismos que se utilizan en otras aplicaciones en ingeniería donde se requiere que la pieza realice una función mecánica. Sin embargo, para la sustitución de tejidos duros, se debe tomar en consideración que estos y en concreto el hueso, tienen una gran capacidad para remodelarse, sin embargo, esta remodelación puede producir el crecimiento o desaparición de hueso en función de las necesidades mecánicas del mismo.

Según lo reportado en la bibliografía, cómo viene regulada esta actividad osteogénica o osteoclástica, es algo que no está bien conocido, y de aquí que no se pueda hablar que una fractura ósea sea un problema completamente resuelto.¹⁶

Por lo mencionado anteriormente, la colocación de implantes debe hacerse en sitios óseos apropiados, permitiendo un espacio propicio o un margen de seguridad para el mantenimiento de la formación e integración ósea.³¹ Así mismo, para que el implante tenga buen pronóstico se sugiere que por lo menos esté presente una pequeña cantidad de hueso de soporte; ya que un insuficiente volumen óseo puede

producir peri-implantitis, mucositis, disminución del contacto hueso-implante aumentando el riesgo de fracaso del implante.

Los fracasos en la etapa inicial de un implante, pueden amenazar la oseointegración, en cambio los fracasos tardíos se producen en situaciones en las que se pierde la oseointegración de un implante inicialmente estable y con funcionamiento adecuado, generalmente a causa de una carga excesiva y/o infección.³²

Por otra parte, es importante saber que al implantar un material en el cuerpo humano inicialmente ocurre la interacción entre él, los tejidos circundantes y los fluidos del medio fisiológico, ya sean sangre, saliva o fluidos extracelulares. La corrosión de los metales se produce debido al contacto del metal con el fluido corporal salino, el proceso de corrosión permitirá liberación de iones metálicos con una gran facilidad para incorporarse al torrente sanguíneo y cuyo efecto puede ser muy perjudicial.^{33,34} Esta degradación de la superficie del biomaterial metálico influye en diversos procesos fisiológicos dando lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias implicadas en el *aflojamiento de las prótesis, reacciones alérgicas, toxicidad*, entre otros.

La biocompatibilidad de un material va a depender de: *la reacción de hipersensibilidad* en el momento inicial, que es cuando se da la absorción de proteínas sobre el implante, la adhesión, proliferación y diferenciación celular y posteriormente a ello se tiene el *aflojamiento aséptico*.¹⁹

I.3.3.1 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD

Como ya se ha expresado los metales en contacto con sistemas biológicos experimentan corrosión; en este proceso electroquímico se forman iones metálicos, conocidos como haptenos, los cuales, al unirse a proteínas endógenas o exógenas, pueden inducir una respuesta inmunitaria.^{17,35}

La cantidad de metal liberada por efecto de la corrosión suele ser relativamente baja (aproximadamente entre 0,15 – 0,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{día}$ y alrededor de 11 mg/año para una prótesis de cadera), sin embargo éste es un factor que contribuye a la acumulación de metal.³⁵

Los iones de metal liberados pueden ser transportados por la sangre a órganos distantes, o pueden ser parcialmente eliminados a través de los fluidos corporales. No obstante, a largo plazo, los implantes ortopédicos pueden presentar micro y sub micrométricas partículas metálicas, las cuales han sido detectadas en los ganglios linfáticos, hígado y bazo.¹⁹

Las primeras referencias de una posible reacción alérgica datan de la década de los 50, ya que para ese momento, ya se sospechaba que el rechazo del implante no solo era causado por fallas estructurales. En los años 60 existen diversas publicaciones que reportan que los implantes pueden tener relación con la aparición de eczemas, urticaria y vasculitis.^{17,36,37} En esta misma época se cuantificaron las sustancias liberadas mediante espectrometría de absorción atómica y posteriormente se confirmó la presencia de iones de níquel, cobalto y cromo en diversos fluidos corporales.^{38,39}

Años más tarde surge la sospecha de que el rechazo o el aflojamiento aséptico, puede estar relacionado con una reacción de sus componentes.³⁷ En los años

setenta se comenzó a estudiar la liberación de los metales por las articulaciones, adicionalmente numerosos estudios han reportado el incremento de la liberación de concentraciones de iones metálicos.^{19,40} Por ejemplo en el caso de los aceros, los diferentes elementos que se emplean como aleantes pueden tener efectos cancerígenos y/o provocar alergias.^{41,42}

El cobalto es muy utilizado por su gran dureza y resistencia a la corrosión, aun cuando este libera iones al estar en contacto con los fluidos corporales, los mismos se excretan fácilmente por la orina, sin embargo podrían acumularse en pacientes con insuficiencia renal crónica.⁴³

El cromo no se elimina con tanta facilidad del organismo, especialmente en su forma trivalente, se acumula intracelularmente en los tejidos y en los hematíes⁴⁴. Es una causa frecuente de dermatitis de contacto en varones, la cual es una reacción inmediata. En los años 70 Gell y Coombs establecieron una clasificación de la respuesta inmune, y pensaron que la causante de la hipersensibilidad retardada es la causante del aflojamiento aséptico, pero otros estudios constataron que es muy rara la coexistencia en un mismo paciente de reacciones inmediatas (como la dermatitis) y tardías (como el aflojamiento aséptico).⁴⁵⁻⁴⁷

El níquel es uno de los elementos más usados en traumatología, por su gran dureza, aunque comúnmente se encuentra aleado con otros elementos metálicos. Tras su colocación dentro del organismo, pequeñas cantidades de níquel van liberándose de manera paulatina, éstas pueden irse eliminando por la orina⁴⁸, pero, actualmente existen múltiples estudios que indican problemas de alergias y formación de tumores causados por la liberación de iones de níquel.

Según Denkhau et al., el níquel es un elemento con un elevado nivel de potencial de toxicidad, capaz de producir desde una leve alergia hasta la formación de tumores.^{49,50} La respuesta al níquel puede variar entre un paciente y otro²⁵ y la velocidad de eliminación no está sólo relacionada con la concentración en el cuerpo, también depende del metabolismo de la persona sin embargo existen estudios que reportan que los iones de níquel liberados dentro del organismo, normalmente son

transportados por la sangre, la albúmina, los aminoácidos y las proteínas del plasma, y si la cantidad presente en el cuerpo es demasiado elevada, se puede acumular en los alvéolos pulmonares y en los riñones.^{24,50}

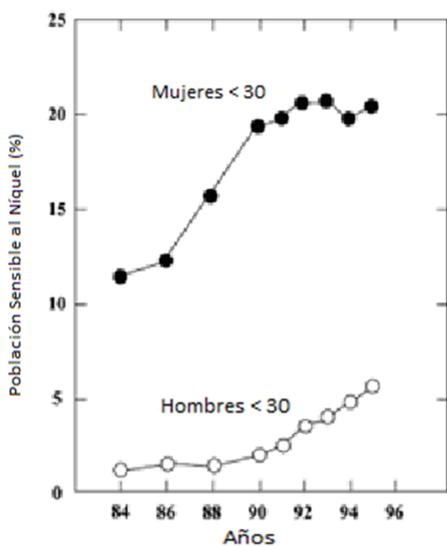


Figura I 2 Población sensible al Níquel(%).²⁴

En la *Figura I 2* se muestra el porcentaje de población sensible al níquel aumenta cada año y afecta a más del 20% de las mujeres y al 7% de los hombres.²⁴

Por lo expresado anteriormente y sabiendo que una de las propiedades de los metales, es la de oxidarse simplemente al estar en contacto atmosférico, y que este proceso corrosivo se acelera al introducirse en un ambiente salino, resulta relevante el estudiar tratamientos superficiales que modifiquen la capa de óxido, de tal manera, que impidan la liberación de iones dentro del organismo, para así obtener

metales biocompatibles. Con este objetivo y sabiendo que el titanio ha sido considerado uno de los metales con mayor biocompatibilidad, a lo largo de esta tesis se trabajó con diversos tratamientos superficiales sobre una aleación de Ti libre de níquel, la cual a su vez, fue comparada con una aleación CoCr que está aprobada por las normas ASTM, para aplicaciones biomédicas.

I.3.3.2. LESIONES CUTÁNEAS.

Debe sospecharse una respuesta de hipersensibilidad al material implantado cuando aparecen lesiones cutáneas o reacciones inflamatorias próximas al sitio donde se ha colocado un implante metálico.

Las lesiones o dermatitis de contacto por metales, especialmente cromo, níquel y cobalto, es, por otra parte, una patología frecuente. En el caso del níquel la sensibilización detectada por prueba cutánea en la población general se acerca al 5%,⁵¹ aumentado hasta más de un 25% en los sujetos a los que se realizan pruebas epicutáneas por cualquier motivo.⁵² Estos datos sugieren que probablemente la alergia a metales no debe ser un factor patogénico muy importante en el aflojamiento de prótesis, pues dada su alta prevalencia, es poco probable que este problema hubiera pasado desapercibido.³⁵ No existe una respuesta definitiva al problema y sus repercusiones pueden ser amplias, por lo que vale la pena revisar la historia de los estudios del aflojamiento aséptico.

I.3.3.3. AFLOJAMIENTO ASÉPTICO.

Primero, se emplearon prótesis de Vitallium, después de acero inoxidable. La fricción por el uso ocasionaba el aflojamiento de la articulación en una cuarta parte de los pacientes.⁵³ Posteriormente se introdujeron pares de fricción metal-plástico que inducían menos sensibilizaciones, pero que al generar más material de desecho en la articulación, podían producir una reacción de cuerpo extraño y ocasionar un aflojamiento aséptico de la prótesis.³⁵

El aflojamiento aséptico de la prótesis es la principal complicación de la cirugía protésica. Aunque el porcentaje es bajo, va aumentando año tras año. No existen estudios definitivos, por las dificultades técnicas (complicaciones de diseño, períodos de observación muy largos, entre otros), los datos de los registros de prótesis, son la principal fuente disponible de información sobre revisiones y complicaciones de las mismas. Los registros escandinavos de prótesis de cadera, demuestran que aproximadamente un 60-70% de las reintervenciones son originadas por el aflojamiento aséptico de la prótesis, la mayor parte de ellas debidas a factores mecánicos o estructurales.^{35,54,55}

En la mayoría de los casos, las causas pueden ser atribuidas a factores mecánicos y/o estructurales, relacionados con el diseño y materiales de la prótesis, lo cual explica el progresivo aumento de revisiones con el paso de los años.³⁵ También se ha investigado la probabilidad de que los aflojamientos precoces de las prótesis puedan ser a causa de una reacción de hipersensibilidad a alguno de los materiales.^{56,57} Pero hay teorías que justifican los aflojamientos precoces, sin recurrir a reacciones inmunológicas.⁵⁸ Por tanto el éxito de un implante dependerá del uso de materiales con propiedades mecánicas óptimas y con tratamientos superficiales que combatan los problemas de reacciones de hipersensibilidad.

Por otra parte, es importante saber que al implantar un material en el cuerpo humano inicialmente ocurre la interacción entre él, los tejidos circundantes y los fluidos del medio fisiológico, ya sean sangre, saliva o fluidos extracelulares. La corrosión de los metales se produce debido al contacto del metal con el fluido corporal salino, el proceso de corrosión permitirá liberación iones metálicos con una gran facilidad para incorporarse al torrente sanguíneo y cuyo efecto puede ser muy perjudicial.^{33,34}

I.3.4 MODIFICACIÓN BIOMIMÉTICA DE LAS SUPERFICIES METÁLICAS.

Una inadecuada interacción entre el metal y las células, traerá como consecuencia reacciones de cuerpo extraño tales como inflamación, infecciones, aflojamiento aséptico, encapsulamiento del implante, entre otros.⁵⁹⁻⁶¹

De allí que la biocompatibilidad de un material va a depender de: *la* reacción de hipersensibilidad en el momento inicial, que es cuando se da la absorción de proteínas sobre el implante, la adhesión, proliferación y diferenciación celular.¹⁹

Razón por la cual a finales de los años 60, los ingenieros ingresaron en los laboratorios de clínica médica, quirúrgica y dental, y sus contribuciones comenzaron a aparecer en la literatura biomédica. Lo que ha permitido la aplicación de técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los materiales, con el fin de correlacionar los cambios producidos sobre las superficies con las respuestas biológicas observadas.

Muchos esfuerzo se han realizado en el diseño, síntesis y fabricación de biomateriales y dispositivos para asegurarse de que tienen apropiadas propiedades mecánicas, durabilidad y funcionalidad, por ejemplo: una articulación de la cadera deben soportar grandes esfuerzos, un hemodializador debe tener las características de permeabilidad, por ende la estructura del bulk de los materiales regula sus propiedades. Adicionalmente la respuesta biológica a los biomateriales y dispositivos, por otro lado, está controlada en gran parte por la química de sus superficies.

Por lo tanto, modificar la superficie de los biomateriales es claramente justificable: para mantener sus propiedades mecánicas, modificando sólo la superficie más externa, que es la que va a influir en la biointeracción. De tal manera que si la modificación superficial, es efectuada correctamente, las propiedades mecánicas y la funcionalidad de los dispositivos no se verán afectadas, pero se conseguirá mejorar la biorespuesta relacionadas con la interfaz de tejido-dispositivo o tejido-implante.

I.3.4.1 ESTADO ACTUAL DE LAS SUPERFICIES BIOMIMÉTICAS.

Con el objeto de superar las limitantes que presenta el hecho de implantar un material metálico dentro del cuerpo humano, existe la tendencia de realizar modificaciones superficiales de los metales; ya que mediante éstas se logra cambiar la composición química, estructura y morfología de la superficie del material, dejando intactas las propiedades mecánicas del bulk,¹⁰ mejorando así la resistencia a la corrosión y eliminando o disminuyendo la liberación de iones metálicos dentro del organismo.

Para ello en las últimas décadas se han realizado esfuerzos centrados en tratamientos superficiales y/o recubrimientos para mejorar la relación tejido-implante; de allí que se tienen estudios en los cuales materiales han sido recubiertos con proteínas pertenecientes a la matriz extra celular (fibronectina, colágeno o laminina),⁶²⁻⁶⁴ otros se basan en la modificación biomimética de la superficie, realizando la adhesión de secuencias peptídicas cortas lineales tales como Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD), presente en un gran número de proteínas,^{65,66} mezclas de secuencia de péptidos adhesivos, o péptidos cíclicos con motivos adhesivos.⁶⁷⁻⁶⁹

Tabla I 3 Clasificación de las técnicas de tratamiento superficial de los metales para los dispositivos médicos de acuerdo al proceso y el propósito.⁷⁰

	Proceso en Seco	Proceso Electroquímico	Proceso Químico e Hidrotérmico
Hidroxiapatita (HA) o recubrimientos de fosfato de calcio	Comercializada	Comercializada	Estudiada
Recubrimientos de TiO ₂ o CaTiO ₃	Comercializada	Comercializada	
Formación de una capa superficial modificada ^a			Comercializada
Inmovilización moléculas funcionales y biomoléculas ^b		Estudiada	Estudiada
^a Mejora la compatibilidad, y la capa no contiene ni HA, ni fosfato de Calcio.			
^b Para inhibir la adsorción de proteínas y mejorar la adhesión de células.			

En la *Tabla I 3*, se presenta la clasificación de las técnicas de modificación de superficiales de acuerdo con sus procesos y propósitos. El propósito principal de la modificación de la superficie consiste en mejorar la compatibilidad de los tejidos duros o acelerar la formación de hueso. La investigación para mejorar la compatibilidad de tejido duro implica dos métodos basados en la modificación de la capa superficial resultante: ya sea a través de una capa de fosfato de calcio y óxido de titanio con el espesor medido en micrómetros o una capa de superficie modificada con el espesor medido en nanómetros, las cuales serán el objeto de estudio de esta tesis.

Las técnicas de modificación superficial, tales como silanización, plasma de descarga de gas, deposición de vapor, luz UV, polimerización foto iniciada, entre otros, han sido utilizadas para proveer grupos reactivos a las superficies de los implantes, con el objeto de producir una inmovilización covalente de las biomoléculas. Los grupos reactivos como -SH, -COOH, -NH₂ y OH⁻ ha sido usados para conseguir enlazar implantes metálicos con biomoléculas, ya sea de forma directa o mediante un agente que facilite la unión con la superficie.⁷⁰⁻⁷²

La modificación de las superficies, puede ser dividida en 2 categorías: 1) alterando química o físicamente los átomos, compuestos, o moléculas en la superficie existente (modificación química, grabado, variación de la rugosidad mecánicamente), o 2) recubriendo la superficie existente con un material que tiene una composición diferente (revestimiento, grafting, la deposición de una película fina).¹¹

Los métodos comunes de modificación mecánica de las superficies, tales como: mecanizado, granallado, pulido entre otros, implican un tratamiento físico, con el objetivo típico de obtener de topografías superficiales específicas y rugosidad, eliminar la contaminación superficial, y/o mejorar la adhesión en los pasos subsiguientes de unión.¹

Dentro de los métodos de modificación química se incluyen tratamientos químicos, tratamientos electroquímicos, sol-gel, deposición química de vapor (CVD) y modificación bioquímica. Durante los tratamientos químicos, tratamientos electroquímicos y la modificación bioquímica, las reacciones químicas o electroquímicas ocurren en la interfaz entre el metal y la solución. La deposición química de vapor es un proceso que involucra reacciones químicas entre fases químicas en gas y la superficie del material, resultando en la deposición de un compuesto no volátil sobre el sustrato. Por otra parte en el proceso de sol-gel, la reacción química no ocurre en la interfaz entre la superficie del metal y la solución o gel, sino mas bien en la solución.¹

Existe gran cantidad de artículos sobre las modificaciones químicas de las superficies de Ti, la mayor parte de estos están centrados sobre los dispositivos de Ti con recubrimiento de cerámica y vidrios bioactivos, con el fin de lograr la verdadera unión del hueso en la interfase.⁷³ Paralelamente se tienen estudios de materiales metálicos a los que se les realizan tratamientos de modificación superficial, silanización, revestimiento de proteínas, inmovilizaciones de secuencias peptídicas, entre otros.

Para solventar los problemas de rechazo de los implantes metálicos, Li et al, consideraron que la clave para la inhibición de la liberación de iones, es mejorar la resistencia a la corrosión del material de aleación, sin embargo para conseguir este objetivo, exponen diversos estudios en los que han usado distintos métodos, basados en la modificación de la superficie, tales como la implantación de plasma, tratamientos de oxidación, revestimiento de la superficie y el procesamiento láser con el fin de mejorar sus capacidades de resistencia a la corrosión y biocompatibilidad.⁴⁹

Si se observa lo anteriormente expuesto la modificación superficial de los metales, es un método que los hace biocompatibles, permitiendo un mejor reconocimiento y respuesta celular, al mismo tiempo que ataca los problemas de corrosión, con lo cual se evita la liberación de iones metálicos dentro del organismo y por ende el aflojamiento aséptico.

Hay cientos de reacciones químicas que puedes ser utilizadas para modificar la composición química de las superficies, y éstas pueden ser clasificadas en reacciones específicas o no específicas. Una reacción no específica deja una distribución diferente de grupos funcionales sobre la superficie, sin embargo una reacción específica, cambia solo un grupo funcional dentro de otro, con alto rendimiento y pocas reacciones secundarias.¹¹

A través de la modificación de la superficie del implante, se consigue la adsorción física o química, proceso en el que los átomos, iones o moléculas son atrapadas o retenidas en la superficie de un material.

- La adsorción física o fisisorción: es la fuerza de adsorción que tiene lugar entre fuerzas de tipo iónica y/o de Van der Waals. En este caso no existe ningún tipo de rearrreglo electrónico, entran en juego tan solo fuerzas de tipo

electrostáticas o dipolares. Las biomoléculas adsorbidas físicamente pueden presentar un proceso de desorción indeseado, debido a que ocurriría la separación de una molécula o átomo adherido en la superficie, quedando en zonas alejadas del implante. Además es posible un intercambio entre las biomoléculas adsorbidas y las presentes en el medio fisiológico de una manera no específica. Por ello existe un pobre control sobre la fijación de las moléculas, en su distribución y en su orientación. Además dichas desventajas dificultan su caracterización y su función superficial.⁷⁴

- La adsorción química o quimisorción: es la fijación de una molécula en la superficie del implante a través de un enlace intermedio iónico o covalente, debido a la interacción entre los estados electrónicos del implante y de la proteína. Dichas uniones tienen lugar mediante los grupos hidroxilos de las capas oxidadas inertes del sustrato, que posteriormente podrán ser utilizados como puntos de anclaje con los grupos siloxanos, aminos, carboxilos y tioles.⁷⁴

Con el objeto de conseguir la adsorción controlada de biomoléculas sobre la superficie de un metal y que al mismo tiempo se dé un enlace intermedio covalente entre el material orgánico y el inorgánico, existen numerosas técnicas de modificación superficial, tales como silanización, plasma de descarga de gas, deposición de vapor, luz UV, polimerización foto iniciada, entre otros.⁷⁰⁻⁷²

La mayoría de estos procesos se han desarrollado desde la década de 1990. Las propiedades superficiales son fundamentales para los biomateriales, y por lo tanto las técnicas de modificación de superficies son particularmente útiles. Dentro de ellas se tiene el procesamiento en seco (mediante haces de iones) y el proceso húmedo (que se lleva a cabo en soluciones acuosas). En particular, entre los procesos húmedos, la técnica electroquímica se ha convertido recientemente en una de las más importantes. La inmovilización de los factores de formación ósea, tales como proteína ósea morfológica, proteína morfogénica ósea (BMP), o biomoléculas como el colágeno y los péptidos, es otra técnica para aumentar la compatibilidad de los tejidos duros. Por otro lado, la inmovilización de moléculas biofuncionales tales como poli (etileno-Gly col), PEG, a la superficie metálica para controlar la adsorción de proteínas y adhesión de las células, plaquetas, y las bacterias también se ha intentado.⁷⁰

La modificación de la superficie que se desarrollará en esta tesis, se conseguirá mediante la modificación biomimética de las superficies, con la cual se promueve la adhesión celular y por ende la regeneración del tejido óseo, por un proceso llamado biofuncionalización. (Figura 1 3).

El Proceso de biofuncionalización empleado, involucrará tres etapas:

- **Limpieza y Activación de la Superficie:** mediante la cual se conseguirá la remoción del contenido de carbono proveniente de la atmósfera y se generaran superficies altamente reactivas.
- **Silanización:** esta fase creará una interfaz capaz de enlazar el material inorgánico (metal) con un material orgánico (biomoléculas).

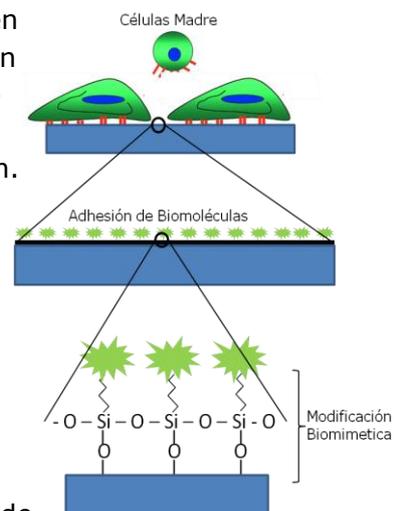


Figura 1 3 Proceso de Biofuncionalización.

- **Inmovilización de Biomoléculas:** ya que las interacciones del material con los osteoblastos dependerá de las biomoléculas que se adhieran sobre las superficies, para ello se utilizarán secuencias peptídicas cortas.

I.3.4.1. LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN.

Con la limpieza y activación de la superficie se tiene como meta conseguir la remoción del contenido de contaminantes proveniente de la atmósfera y generar superficies altamente reactivas, adicionando grupos funcionales a las superficies de los implantes, con el objeto de producir una inmovilización covalente de las biomoléculas.

Dentro de los grupos funcionales que han sido usados para conseguir enlazar implantes metálicos con biomoléculas, ya sea de forma directa o mediante un agente que facilite la unión con la superficie, se encuentran: $-SH$, $-COOH$, $-NH_2$ y OH^- .⁷⁰⁻⁷² Por ello en el desarrollo de esta tesis se optó por la activación de las superficies mediante la inclusión de grupos hidroxilos, con los cuales se obtendrán superficies reactivas capaces de facilitar la unión con los silanos.

La superficie de óxido de un metal reacciona con la humedad en el aire y se forman grupos hidroxilos rápidamente. En el caso de Ti, el óxido de la superficie reacciona inmediatamente no sólo con las moléculas de agua en soluciones acuosas, sino también con la humedad en el aire y está cubierto por grupos hidroxilo. El óxido de la superficie se forma siempre en biomateriales metálicos convencionales y la superficie del óxido de la superficie se activa por la misma razón que se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la superficie de óxido reacciona inmediatamente con las moléculas de agua y los grupos hidroxilo se forman como se muestra en la *Figura I 4A*.⁷⁰

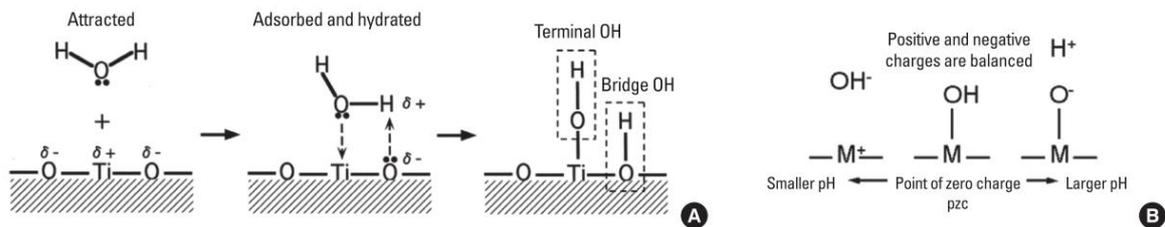


Figura I 4 Proceso de Formación de grupos hidroxilos sobre óxidos de titanio(A) y la disociación de los mismos a diferentes pH (B).⁷⁰

Los grupos hidroxilo superficiales contienen tanto OH^- terminal y de puentes OH^- en cantidades iguales. La concentración de grupos hidroxilo en la unidad de área de la superficie a lo largo de esta tesis fue determinada con diversas técnicas. Los grupos hidroxilos superficiales activos se disocian en soluciones acuosas y forman cargas eléctricas tal como se muestra en la *Figura I 4B*. Las cargas positivas o negativas debido a la disociación son influenciadas por el pH de la solución acuosa circundante: las mismas están equilibradas y la carga aparente es cero en un determinado pH. Este pH es el punto de carga cero (pcc). El pcc es el único valor de un óxido y un indicador que muestra las propiedades del óxido de ácidos o básicos. Por ejemplo, en el caso de TiO_2 , el pcc de rutilo es 5,3 y la de anatasa es 6,2. En otras palabras, la superficie anatasa es ácida a pH más bajo y es una base a un pH mayor que 6,2. Grupos hidroxilos superficiales activos y cargas eléctricas formadas por la disociación de los grupos desempeñan papeles importantes en la unión con

los materiales y la inmovilización de las moléculas. Por lo tanto, la concentración de los grupos hidroxilos de superficie y el pH son factores importantes en la unión con los materiales y la inmovilización de las moléculas.⁷⁰

Mediante una revisión bibliográfica se tienen estudios previos que han realizado la activación de las superficies de los materiales destinados a la regeneración ósea, sin embargo en la gran mayoría de ellos, su evaluación se hace a través de la respuesta celular y poca información se tiene a cerca de la caracterización físico-química de la capa activada.

Un ejemplo de ello se tiene en los estudios realizados por Chu et al. (2002), sobre una revisión bibliográfica referente a las modificaciones superficiales mediante el uso de plasma, en éste se indica que la modificación mediante plasma es una técnica de tratamiento superficial eficaz y económica para muchos materiales y el artículo revisa las diversas técnicas comunes de plasma y los métodos experimentales que se aplican a la investigación biomédica de materiales, tales como plasma bombardeo iónico y el grabado, la implantación de plasma, deposición de plasma, la polimerización de plasma, deposición por láser de plasma, pulverización de plasma, y así sucesivamente.

La única ventaja de la modificación con plasma es que las propiedades superficiales y biocompatibilidad se puede mejorar de forma selectiva, mientras que los atributos de los materiales permanecen sin cambios. Los materiales existentes pueden, por tanto, ser utilizado y las necesidades de nuevas clases de materiales puede ser obviado acortando así el tiempo para desarrollar nuevos y mejores dispositivos biomédicos. En este artículo se describen ejemplos que incluyen reemplazos de tejido duro, la sangre ponerse en contacto con las prótesis, dispositivos oftálmicos, y otros productos.⁷⁵

Fisher et al. (2005), modificaron superficialmente de cerámicas de alúmina, a través de hidróxido de sodio, consiguiendo de esta manera que un material bioinerte, luego de la hidroxilación arrojará excelentes resultados en términos de adhesión, proliferación y la secreción de osteocalcina. Al mismo tiempo ellos demostraron que al bioactivar la superficie no se tuvo ningún efecto de deterioro sobre el comportamiento de la resistencia tanto a corto, como a largo plazo.⁷⁶

De igual manera Sakamoto et al. (2007) presentaron un estudio cuyo objetivo fue investigar el efecto de grupos hidroxilo activos sobre de la fuerza de adhesión interfacial del titanio con poliuretano segmentado a través de γ -mercapto propil-trimetoxisilano. Para ello realizaron la activación de la superficie con peróxido de hidrógeno (proceso húmedo), a diferentes tiempos de inmersión. Basándose en los resultados obtenidos, concluyeron que los grupos hidroxilos activos en la película de óxido superficial fueron claramente una de las causas que regulan la resistencia de la unión interfacial.⁷⁷

En esta tesis para alcanzar la activación superficial se hará uso de dos métodos diferentes para cada una de las aleaciones:

- 1) Plasma de oxígeno, (proceso en seco) que permite modificar las superficies mediante la formación o adsorción de grupos funcionales para adaptar sus propiedades a aplicaciones específicas. En esta técnica mediante la combustión fría se consigue remover contaminantes orgánicos, y por una reacción química de radicales de oxígeno altamente reactivos se promueve la oxidación e hidroxilación de la superficie (grupos OH⁻), incrementándose la mojabilidad.⁷⁸

2) Ataque químico, (proceso húmedo) a través de la inmersión de la muestra en distintas soluciones ácidas, formando grupos hidroxilos en la superficie.

Estos procesos, se explican con mayor detalle en la introducción del capítulo de caracterización físico-química de la capa superficial activada para cada una de las aleaciones.

I.3.4.2 SILANIZACIÓN.

Una vez activadas las superficies, la siguiente etapa es conseguir desarrollar una interfaz de conexión entre las superficies de biomateriales y el sistema biológico, lo cual puede conseguirse mediante diferentes técnicas, siendo la silanización una de las más populares⁷⁹(Figura I 5).

El proceso de silanización involucra una reacción química en fase líquida, este es sencillo de realizar y de bajo costo, frecuentemente utilizado para modificar superficies hidroxiladas, al igual que las superficies oxidadas de los metales, que son ricas en grupos hidroxilos.¹¹

En la silanización intervienen los organosilanos, que son agentes de acoplamiento caracterizados por poseer una doble funcionalidad química, que le permite reaccionar tanto con compuestos orgánicos como

inorgánicos, motivo por el cual se utiliza como proceso intermedio que permite la unión entre dos materiales tan disimilares como son un metal y una biomolécula.

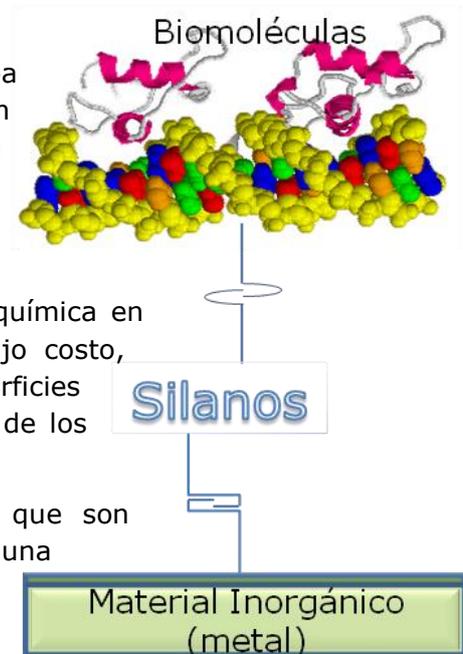
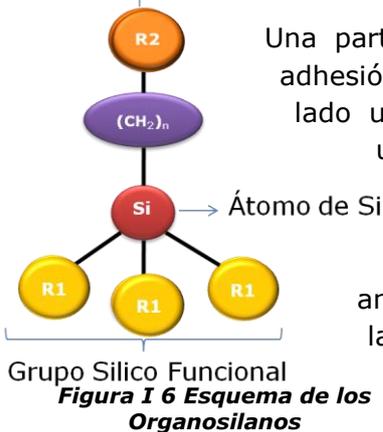


Figura I 5 Interfaz Metal-Biomolécula.

La estructura del organosilano es de forma general $(R1)_3-Si-(CH_2)_n-R2$ (Figura I 6) consiste en:



Una parte funcional (R1) enlazada al silicio que permitirá la adhesión con la fase inorgánica (Ej. cloro o alcox).⁸⁰ Por otro lado un grupo organofuncional (R2) que está fuertemente unido al silicio por medio de una cadena de carbonos no reactivos y es el lugar por donde se dará la adhesión con la biomolécula. Esos grupos funcionales incluyen entre otros cloro, epoxy, aminos; y también pueden proporcionar una variación en la hidrofobicidad de la superficie consiguiendo de esta manera modificar superficie hidrofílicas por hidrofóbicas y viceversa.⁸¹ La longitud de la cadena hidrocarbonada que sirve de espaciador entre el grupo funcional y el silicio, determinará si el átomo de silicio afecta o no a la química del grupo funcional, ya que éste afecta las propiedades físicas y limita la reactividad por su influencia en los parámetros de solubilidad.⁸²

Además de esta estructura, se tiene que:

- El átomo de silicio que es más electropositivo que el carbono, por tanto no forma dobles enlaces estables y permite formar reacciones químicas útiles.

- El grupo silico funcional que una vez realizada la hidrólisis puede reaccionar con centros activos de sustratos orgánicos o inorgánicos o por condensación con otros átomos de silicio y así formar enlaces estables.

Los factores que influyen en la reactividad de los organosilanos con la superficie son varios e incluyen: la concentración y tipo de grupos hidroxilos (OH⁻) superficiales, estabilidad hidrolítica del enlace formado con el sustrato y las dimensiones físicas del sustrato o características del sustrato.

En la última década varios autores han estudiado diferentes tipos de silanos y han observado que los mismos pueden reaccionar con superficies metálicas, ofreciendo mejoras en sus enlaces, sin embargo la selección del silano dependerá del material o biomoléculas que se quiere adherir.⁸³

Dentro de los silanos conocidos y utilizados sobre superficies metálicas, los más investigados en los últimos años han sido los aminosilanos, estos poseen la habilidad de enlazarse a los grupos hidroxilos presentes en las superficies activadas.⁸⁴ Matinlinna et al. (2004), desarrollaron estudios sobre aminosilanos con un sistema basado en la liberación de fluoruros, obteniendo buenos resultados en compuestos utilizados en implantes dentales⁸⁵. Xiao et al. (2007), estudiaron el mecanismo de la modificación de superficies con 3-aminopropil-triethoxyl-silano (APTES) y un cross linker (N-succinimetyl-3-Maleimidopropionate), consiguiendo que el entrecruzante reaccionara con el grupo amino terminal del silano formando grupos maleimidos, que finalmente se enlazaron con la secuencia peptídica.⁸⁶

En 2010 Goyal et al., realizaron un este estudio, fabricando monocapas de aminopropiltriethoxisilano (APTES) y utilizando mezclas de silanos: APTES y metiltriethoxisilano en una proporción de 1:10, para la inmovilización de proteínas en superficies de silicio. Las superficies silanizadas se modificaron adicionalmente usando tres diferentes ligandos y receptores que han sido reportados para vincular albúmina sérica humana (HSA): un péptido lineal, un anticuerpo policlonal contra albúmina de suero humano, y un ligando sintético pequeño (2, 4, 6-tris (dimetilaminometil) fenol, en este trabajo se tenía como objetivo determinar la cantidad de HSA adsorbida y se observó que la misma aumenta con el tiempo, y con la concentración inicial de la solución de HSA.⁸⁷

También se tiene conocimiento de estudios que utilizan otro tipo de silanos con organosilanos diferentes, entre ellos se puede mencionar a Navarre et al. (2001) quienes investigaron sobre la caracterización de monocapas auto-ensambladas de organosilanos, injertados en un soporte de sílice; en este estudio se usaron organosilanos con un grupo funcional etilenglicol o con un grupo metilo y observaron que la influencia del tiempo de reacción y la composición del solvente puede mejorar la homogeneidad de las monocapas auto-ensambladas.⁸⁸

De igual modo se tiene el trabajo presentado por Matinlinna, et al. (2004), sobre superficies de Ti y aleaciones de CoCrMo silanizadas con ALS (allyltrimethoxysilane) y mezclas de ALS y MPS (3-methacryloxypropyltrimethoxysilane), en este estudio se compararon ambos sustratos y se determinó que la silanización ha sido verificada para el Ti, sin embargo no quedó clara para la aleación de CoCrMo, debido a que con el Ti obtuvieron mejores respuestas en el proceso de silanización y a altas temperaturas el enlace Si-O-Si es más fuerte para el Ti.

Domingo et al. (2006) lograron adherir trialkoxisilano sobre nanopartículas de dióxido de titanio,⁸⁹ y Xiao en el mismo año(2006) utilizó APTES y CPTES

(Cloropropil - trietoxi - silano) para conseguir la inmovilización covalente de triacylglycerol lipase en esferas SiO₂ funcionalizadas.⁹⁰ Godoy (2009) trabajó con la biofuncionalización del Ti con CPTES y GPTES (glycidoxypropyl-triethoxy-silano) para mejorar el proceso de oseointegración.⁹¹ Sevilla (2010) estudió la inmovilización de oligopéptidos en la superficie de titanio mediante el uso de CPTES como agente de unión entre la superficie de titanio y el péptido.⁷⁴

Por la referencia bibliográfica que se tiene sobre los aminosilanos, dentro del desarrollo de este trabajo se usará el γ -aminopropil-triethoxy-silano (APTES) (CH₃CH₂O)₃Si(CH₂)₃NH₂, teniendo presente que cuando el silano contiene una amina como grupo funcional, en la mayoría de casos esta no reacciona directamente con los grupos funcionales activos de las biomoléculas y por lo tanto requerirá ser activado mediante el uso de agentes entrecruzantes (cross linker), para ello se usará de un agente de entrecruzamiento (maleimido).

Así mismo, se desarrollará de forma paralela la silanización usando dos silanos que permitirán el enlace directo con la biomolécula, sin la necesidad de utilizar un agente entrecruzante. Ambos favorecen el ataque nucleófilo el GPTES, a través de un grupo epoxi que es altamente reactivo y el CPTES, que posee un buen grupo saliente (cloro), además el CPTES posee la ventaja que podrá fácilmente ser detectado, por tener al cloro como grupo organofuncional.

La selección del mejor silano estará basada en estudios de estabilidad química, térmica y mecánica; con el objeto de usar este ensayo como una estrategia que permitirá inferir la presencia de enlaces covalente entre el metal y los silanos.

Una vez creada la interfaz, ya las muestras se encontraran preparadas para poder ser enlazadas con un material orgánico (biomoléculas).

I.3.4.3 INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.

Tecnología de recubrimiento orgánico actualmente tiende a emplear biopolímeros (proteínas) que han sido inmovilizadas sobre la superficie de los implantes metálicos. La intención es mejorar la respuesta del implante en el cuerpo. Esto se logra mediante el recubrimiento con sustancias que normalmente se encuentran en la superficie o en la proximidad del tejido que tiene que ser sustituido por el implante. Un review realizado en el 2011 ha encontrado que estos recubrimientos actúan como mediadores locales de la adhesión celular y en consecuencia, como un factor estimulante para el crecimiento y proliferación de las células que normalmente se encuentran alrededor del tejido sustituido.⁷⁰

La adhesión celular es esencial en el desarrollo, mantenimiento y remodelación de los tejidos óseos. Las interacciones adhesivas con los componentes de la matriz extracelular, incluyen la fibronectina y el colágeno tipo I, los cuales juegan un papel crítico en la formación del hueso. La adhesión celular de los biomateriales involucra interacciones dinámicas con los ligandos extracelulares, originadas por diferentes mecanismos: 1) adsorción de proteínas contenidas en soluciones, 2) deposición de proteínas e 3) ingeniería de motivos peptídicos (*Figura I 7*).⁹²

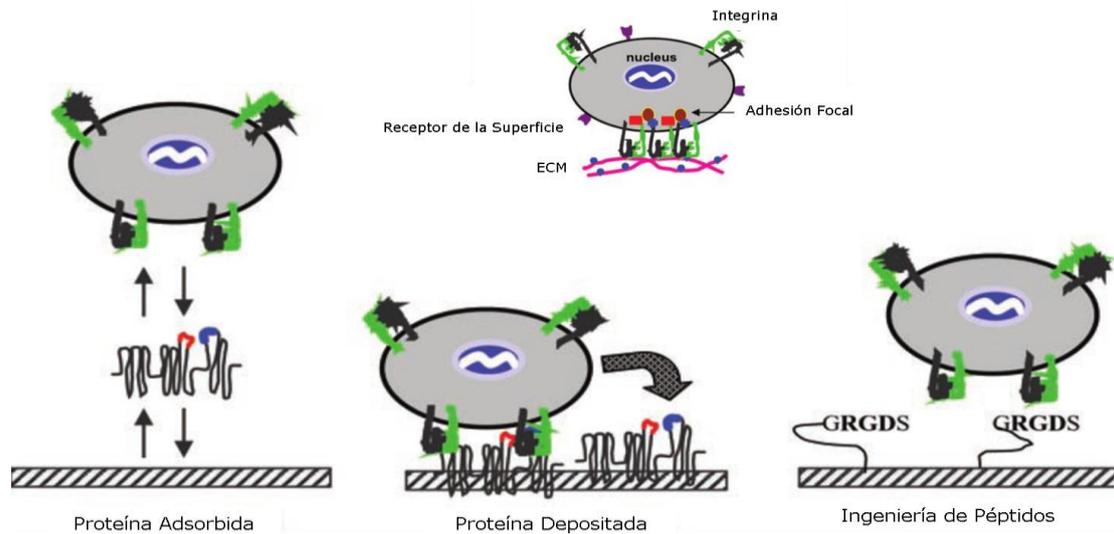
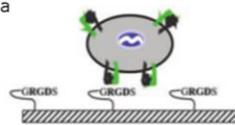


Figura I 7 Mecanismos de adhesión celular sobre materiales sintéticos.⁹²

Debido a las diferencias en las propiedades de la superficie (por ejemplo, la química, la rugosidad y la energía), materiales sintéticos tienen diferentes grados de compatibilidad con las actividades osteoblásticas, las cuales son inferiores con las matrices naturales, teniendo como resultado una pobre diferenciación celular y por ende una limitada formación de hueso. Por tal razón en la última década, los enfoques biomiméticos han tratado de transmitir biofuncionabilidad a los materiales sintéticos, mediante la presentación de biomoléculas adhesivas derivadas de componentes de la matriz extracelular, tales como el RGD de la fibronectina. Estas estrategias se centran principalmente en la inmovilización de péptidos cortos, para producir superficies biofuncionalizadas que se unen a los receptores de adhesión y promueven la adhesión celular.

1ra Generación de Superficies Bioadhesivas

- Meta:
- Unión a la integrina
 - Adhesión celular



2da Generación de Superficies Bioadhesivas

- Meta:
- Mejorar la actividad biológica
 - Especificidad en la unión a la integrina
 - Uniones por diferentes moléculas de adhesión celular

mezcla de integrina y otras moléculas de adhesión (heparina)



conformación restringida y mas sitios de adhesión



Secuencias de reconocimiento y estructuras sin RGD

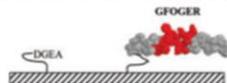


Figura I 8 Evolución de las Superficies Bioadhesivas.⁹²

Si bien ha habido un progreso considerable con péptidos cortos como RGD, que se unen a receptores de la integrina y promueven la adhesión celular existen estudios realizados sobre superficies de titanio, en las cuales se ha demostrado que esta secuencia peptídica por sí sola no mejora el contacto hueso implante, por lo que en los avances en la ingeniería biomolecular, se ha planteado como una segunda estrategia incorporar características adicionales presentes en las matrices extracelulares (Figura I 8), estos incluyen múltiples motivos de unión que soportan

la unión a la integrina y diversos receptores celulares diferentes a las integrinas (no-integrina), los gradientes de densidad de ligando, la agrupación de nanoescala, propiedades interfaciales dinámicas, y sitios de interacción de factores de crecimiento. El desarrollo de estas superficies bio-inspirados que imitan las matrices extracelulares depende en gran medida de la integración de los avances de la bioquímica, la biología celular, la química sintética y la ciencia de materiales e ingeniería y permiten mejorar la actividad biológica (Figura I 8).⁹²

La inmovilización de proteínas, péptidos y/o biopolímeros en superficies de óxido metálico previamente silanizadas ha demostrado ser exitosa, además de ser, una de las técnicas más utilizadas por su alta reproducibilidad en la funcionalización de superficies,^{83,93} sin embargo, la misma depende en parte de la reactividad entre los grupos hidroxilos presentes sobre la superficie y los reactivos químicos usados para dar lugar a propiedades de enlace.

Dado que uno de los objetivos de esta tesis es la caracterización de las superficies biofuncionalizadas, la estrategia utilizada en este proyecto para la inmovilización de las biomoléculas comprende el uso de secuencias peptídicas cortas con una cisteína (Cys), mediante la cual se dará un ataque nucleófilo con el carbono de las moléculas de silano. Se ha seleccionado la cisteína ya que este aminoácido contiene un átomo de azufre en su cadena lateral que no solo es altamente reactivo, sino que simultáneamente podrá ser detectado por medio de técnicas de caracterización química de superficies.

En cuanto al uso de las biomoléculas, Hanawa et al. y Puleo et al., describen que el enfoque de la biofuncionalización, es la inmovilización de las moléculas biofuncionales en la superficie de metal para el control de la adhesión de las células, las plaquetas, las bacterias y la absorción de las proteínas, péptidos, anticuerpos y ADN, ósea, inducir la adhesión de células específicas y la respuesta celular; consiguiendo con ello el control de la interfaz tejido-implante con biomoléculas inmovilizadas.^{10,94}

Para mejorar la respuesta celular en este proyecto se usarán secuencias peptídicas cortas, entre ellas RGDS y la mezcla de RGDS+FHRIKKA y RGDS+PHSRN, el motivo de la selección de estos péptidos, se fundamentó en los siguientes trabajos previos a cerca de inmovilización de péptidos sobre superficies para favorecer la regeneración de tejidos óseos.

Se tienen referenciados diversos artículos, entre ellos está el trabajo de Ferris et al (1999), en el cual se evaluó la calidad y cantidad de hueso formado, como respuesta a la implantación de barras de titanio recubiertas con la secuencia peptídica RGDC, los resultados obtenidos sugieren que el péptido puede mejorar la oseointegración del titanio.⁹⁵

En el mismo año Reznia et al., trabajaron con la modificación biomimética de superficies y su respectiva inmovilización de secuencias peptídicas, haciendo uso de mezclas de RGD y FHRIKKA a diferentes proporciones (I=75:25, II= 25:75 y III= 50:50), resultando que las relaciones II y III, aportan el mayor grado de propagación celular, luego de 4 h de incubación. Después de 24 días en cultivo, las áreas de mineralización de ECM formada por las mezclas II y III fueron significativamente mayores que los de otras superficies. Estos resultados demuestran que la utilización de secuencias de péptidos que incorporan motivos

heparina-adhesivo puede mejorar el grado de interacción entre la superficie celular e influir en la formación a largo plazo del mineralizado ECM in Vitro.⁹⁶

Posteriormente Davis et al. (2002), expresan que la secuencia peptídica RGD favorece los procesos de adhesión y proliferación celular en superficies de Silicon.⁹⁷

En 2005 Benoit et al., revelaron que el uso de RGD y PHSRN sobre hidrogeles de polietilglicol, mejora la adhesión proliferación y formación de contactos focales de los osteoblasto en la actividad metabólica y en los niveles de producción de fosfatasa alcalina, el cual es un marcador común en la función osteoblástica.⁹⁸

La inmovilización de RGD sobre aleaciones de Ti, según Secchi et al. (2006), estimula la adhesión y diferenciación celular y adicionalmente le confiere a la superficie la propiedad de resistencia a la apoptosis (muerte celular).⁹⁹

En el año 2006 Ochsenhirt et al, mezclaron la secuencia de RGD con PHSRN en una proporción 1:1, imitando la relación del péptido en la fibronectina; a través de esta mezcla se notó una mejora en la propagación de las células. Según los autores, los ligandos peptídicos imitan el microambiente de la célula, y los criterios que definen una superficie bioactiva, por tanto los datos ofrecen numerosas oportunidades para el desarrollo de biomateriales más complejos y los criterios para evaluar su actividad biológica.¹⁰⁰

En el trabajo de Xiao et al. (2007), trabajaron sobre superficies de Ti, luego de la silanización, procedieron a la inmovilizaron RGDC y demostraron la presencia de un enlace covalente a través del grupo tiol de la cisteína con los grupos maleimidos.⁸⁶

Para el mismo año Bagno et al., inmovilizaron péptidos con secuencias de RGD y HVP gracias al uso de aminosilanos, ellos exponen que la oseointegración puede ser promovida por la modificación específica de las características superficiales de material, mejorando así las interacciones beneficiosas en la interfaz con el medio ambiente biológico, la producción de las interacciones beneficiosas en la interfaz célula-implante in Vitro, debido a la presencia de los péptidos bioactivos, podría resultar en la promoción del proceso oseointegración. Como conclusión, este estudio revela la importancia de la optimización de la morfología superficial en la dirección de la adhesión celular. Además, aunque el RGD ha sido reconocido como el más activo, su mecanismo de acción no es osteoblastos-específico, en contraposición el HVP mostró una capacidad de adhesión que tiende a ser similar a la RGD con una acción osteoblastos-específica. La especificidad del mecanismo de acción combinada con la capacidad de adhesión hacen probable preveer que se puede utilizar para promover la integración de dispositivos endoóseos para mejorar específicamente adherencia células óseas en la superficie del implante.¹⁰¹

En 2009 Chollet et al., demostraron que en materiales híbridos que combinan tereftalato de polietileno las modificaciones biomiméticas y la inmovilización de RGDC, produce una mejora en la respuesta de las células, en función de la adhesión, cantidad de puntos focales de osteoblastos y células endoteliales, al mismo tiempo los autores indican que la densidad del péptido contribuye al aumento de contactos focales.¹⁰²

Para el año 2010 Petershans et al., afirman que la adhesión de células específicas es alcanzada por la inmovilización de biomoléculas y reexpresan que la biomolécula mas estudiada es la secuencia GRGDS; ya que es el motivo más pequeño de la

matriz celular de la fibronectina, que actúa como la integrina receptora de un enlace celular, iniciando la formación de contactos de adhesión focal.¹⁰³

En el mismo año, en los estudios de Khatayevich et al., se usaron péptidos para ser unirlos a oro, platino, titanio y vidrio, en este estudio se modificaron las superficies con poli (etilenglicol), polímero antiincrustante y la secuencia RGD. Este proceso fue basado en que estudios previos les indicaban que los péptidos tienen varias ventajas sobre las técnicas convencionales de inmovilización molecular; no requieren entornos hostiles biológicamente para ser enlazados, son específicos para sus sustratos y pueden ser adaptados para llevar diversas entidades activas. Sus resultados han demostrado que la inmovilización de péptidos, basada en la modificación superficial es una plataforma adaptable para satisfacer las necesidades específicas, que pueden surgir debido a las propiedades inherentes de los materiales utilizados para una aplicación particular, las exigencias de moléculas funcionales y las características moleculares de los péptidos.¹⁰⁴

Por tanto la modificación de la superficie resulta un enfoque sólido y biocompatible para la funcionalización de múltiples materiales para implantes.

I.3.5 REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO.

Una vez establecido los métodos de modificación superficial que se emplearán en las aleaciones de estudio, se procedió a conocer bibliográficamente qué ocurre dentro del cuerpo humano en el momento de introducir un implante, de qué manera las células interactúan con el material implantado, el rol de las proteínas involucradas en el proceso y finalmente como afectan las propiedades físicas y químicas del implante en la respuesta celular, específicamente en la regeneración ósea, por tanto, a continuación se dará una breve definición de hueso y se citarán los estudios previos enfocados en la regeneración ósea.

El hueso es un tejido dinámico, mineralizado y altamente vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que sea hueso cortical o esponjoso. Ambos contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.¹⁰⁵

El hueso se caracteriza por permanecer en remodelación durante toda su vida, desempeña un papel integral en la locomoción, el esqueleto asegura una adecuada capacidad de carga, y actúa como una cubierta protectora para los órganos delicados internos del cuerpo. Además de estas funciones estructurales, el hueso está íntimamente implicado en la homeostasis a través de su almacenamiento de iones Ca y P y mediante la regulación de la concentración de

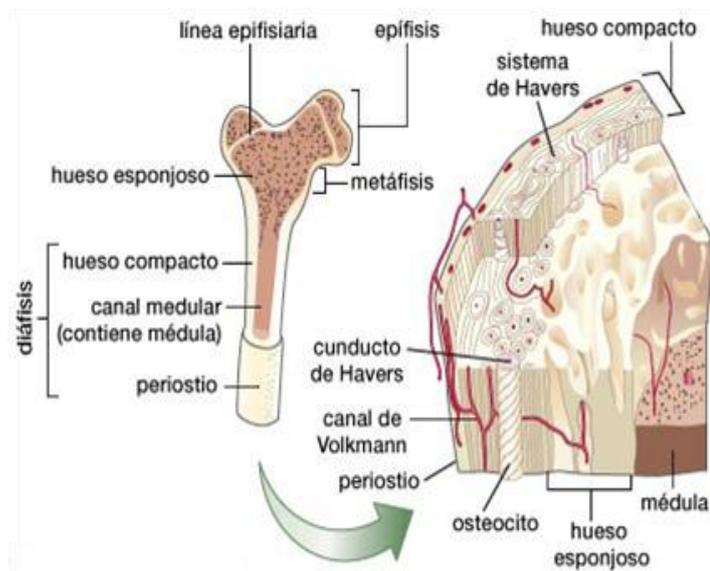


Figura I 9 Hueso

electrolitos claves en la sangre.^{95,105,106}

La estructura del hueso tiene dos formas fundamentales (*Figura I 9*). Tejido compacto, ligero pero extraordinariamente resistente, que constituye el hueso cortical y se encuentra en las diáfisis de los huesos largos. Está formado por laminillas concéntricas de disposición cilíndrica, dejando en su centro unos conductos, los *conductos de Havers*, por donde discurren los vasos. La otra forma tisular, forma mallas tridimensionales, como un panal, y se denomina hueso trabecular, y se encuentra en la epífisis de los huesos largos y de la mayor parte del tejido de los huesos planos y de las vértebras. El hueso cortical representa el 80% del total del esqueleto y el trabecular el 20% restante. La función del primero es fundamentalmente mecánica mientras que el trabecular, donde asienta la médula hematopoyética, es crucial en la regulación metabólica.

La estructura ósea sufre un proceso extraordinariamente dinámico, *el remodelado óseo*. Para entenderlo hay que analizar las células que se encuentran en el tejido óseo y que son fundamentalmente tres: el *osteoblasto*, que es una célula de origen mesenquimal y es la responsable de la formación de matriz osteoide, sobre la que se depositan cristales de hidroxapatita, que forman el hueso mineralizado; el *osteoclasto*, que es una célula gigante, multinucleada, capaz de segregar enzimas proteolíticas que disuelven la matriz ósea. Es por tanto, la célula que destruye hueso, en el proceso de reabsorción ósea, y el *osteocito*, que es una célula que procede del osteoblasto. Durante la formación de osteoide algunos osteoblastos se quedan atrapados en el seno del mismo y se transforman en osteocitos, la célula ósea más abundante. Estas tres células funcionan con una gran precisión y los osteocitos son las células coordinadoras, a su señal, se produce la activación de los precursores de los osteoclastos, formándose la célula multinucleada que se sitúa en la superficie ósea de las trabéculas o en la pared de los conductos de Havers. Allí se inicia el proceso de reabsorción, destruyendo una zona de hueso durante un período de unas dos o tres semanas. En un determinado momento se detiene la reabsorción ósea y sobre la superficie creada se deposita una capa de osteoblastos. Éstos empiezan a formar matriz osteoide en forma de capas sucesivas que se van mineralizando y acaban por rellenar los huecos formados por los osteoblastos, en un proceso que dura entre tres y seis meses. En condiciones fisiológicas sanas, se repone tanto hueso como el que se ha destruido, por lo que la situación está equilibrada con respecto a la masa ósea. Este ciclo celular es lo que se denomina *ciclo de remodelado óseo*.¹⁰⁷

La regeneración de tejido óseo es un proceso natural que involucra tanto a células como a la matriz ósea. Las células son las responsables de la formación de hueso, y en ese proceso intervienen muchos factores. En efecto, la matriz ósea está formada fundamentalmente por materia orgánica (un 25%), materia

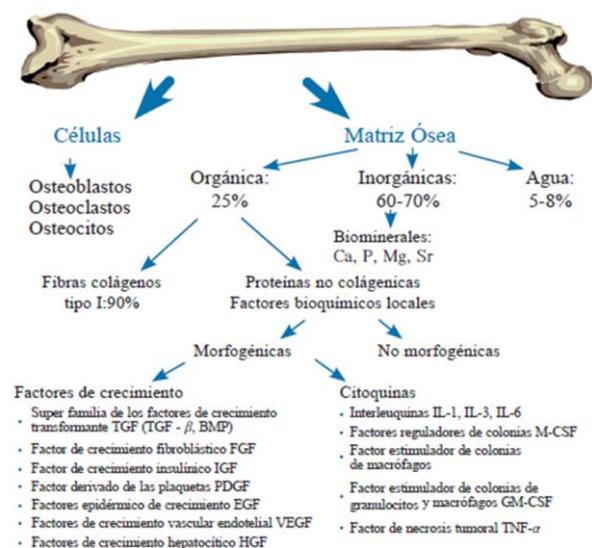


Figura I 10 Sustancias que intervienen en la regeneración de tejido óseo.¹⁰⁷

inorgánica (60-70%) y agua (5-8%) (*Figura I 10*)

La parte orgánica está constituida mayoritariamente por fibras de colágeno tipo I (90%), y en menor proporción, pero no por eso con un papel menos importante, por proteínas no colagénicas y factores bioquímicos locales, lo que hace evidente que el papel de las células es prioritario, y la necesidad de funcionalizar la superficie de los biomateriales con diversos grupos funcionales ha pasado a ser una necesidad para poder anclar proteínas y/o factores de crecimiento.¹⁰⁷

Cuando se producen fracturas traumáticas o en ciertas patologías óseas, el tejido óseo no es capaz de regenerarse por sí mismo. En estos casos, se requiere un injerto óseo o un sustitutivo sintético para promover la regeneración ósea. Aunque el mejor sustituto óseo es el propio hueso, existen problemas asociados al uso de injertos óseos, como la insuficiente cantidad de tejido disponible o el riesgo de transmisión de enfermedades. Estas limitaciones han propiciado el desarrollo de materiales sintéticos que reemplacen el tejido óseo dañado (biomateriales).

Cuando un biomaterial se implanta en el cuerpo humano es imprescindible tener en cuenta el contexto biológico que se va a encontrar, donde se va a poner en contacto con distintos tipos celulares y diferentes biomoléculas, que van a interactuar y a entrar en contacto directo con el implante. En función de cómo sea esa interacción célula-biomaterial se producirán situaciones muy diferentes: encapsulación del implante en una cápsula colagínosa acelular, que es lo que ocurre con los biomateriales inertes, o por el contrario, si esa interacción es positiva, el tejido dañado se regenerará. En esta última situación pueden intervenir proteínas y factores de crecimiento, de forma similar a como se produce el proceso natural. Estas sustancias están recogidas en la *Figura I 10*.¹⁰⁷

Por ello, para lograr las mejores condiciones de interacción entre el implante y el mundo biológico en el que va a ser implantado, una vía que actualmente se está investigando es la adecuada funcionalización de la superficie del implante, que como ha sido comentado tiene como objetivo la modificación de la superficie de los biomateriales, con diversos grupos funcionales, de tal forma que facilite la interacción con las distintas biomoléculas que están presentes en el entorno celular y molecular del entorno del implante. De esta forma, se lograrán biomateriales con superficies funcionalizadas, que facilitarán la adhesión de las células proporcionándoles un entorno apropiado. Favorecer la interacción de las células que rodean al implante con su superficie las estimulará en sus procesos de adhesión, proliferación y angiogénesis, así como los procesos de diferenciación de las células progenitoras pluripotentes, es decir, las células mesenquimales en osteoblastos, que son las células formadoras de hueso.

Los trabajos basados en ensayos *in vitro* para la regeneración de tejido óseo, se fundamentan en trabajar con cultivos de diferentes tipos de células, por lo cual vale la pena mencionar a dos investigadores, Alexander Maximow (1874-1928), y Alejandro Friedenstein (1924-1998), quienes se destacaron en hematología experimental en Rusia y aun cuando sus teorías sobre las células madre estaban muy por delante de su tiempo, los conceptos científicos de Maximow y Friedenstein representan una base experimental para el trasplante de células madre hematopoyéticas y para el desarrollo de diversos enfoques en la terapia celular y sus implicaciones. Siendo la terapia celular una disciplina de investigación prometedora que se ha desarrollado rápidamente desde la década pasada. Maximow postuló una teoría unitaria de la hematopoyesis y un concepto de células

madre hematopoyéticas y Friedenstein descubrió que las células madre adultas no hematopoyéticas (las células madre mesenquimales), se encuentran en la médula ósea,¹⁰⁸ lo cual ha permitido comprender el proceso de regeneración y reparación ósea.

Adicionalmente en los últimos 25 años el uso de implantes se ha incrementado rápidamente y la ciencia de la implantología se ha caracterizado por un progreso acelerado e innovador. En su evolución pueden destacarse que en los inicios los materiales destinados a la implantación eran diseñados para ser "bioinerte", con el paso de los años los científicos de materiales se han desplazado hacia el diseño de forma deliberada de los materiales bioactivos, que se integran con las moléculas biológicas de las células y/o tejido regenerativo.¹⁰⁶

En el caso de los implantes óseos, los materiales deben ser preferentemente osteoinductivo (tienen la capacidad de inducir la formación ósea, cuando se coloca en un sitio donde no se produciría la formación de hueso, mediante el reclutamiento de células madres que de alguna manera son estimuladas a proliferar como células formadoras de matriz ósea), osteoconductor (proporciona un andamio a las células mesenquimales para estimular el crecimiento interno de hueso circundante), y capaz de producir la oseointegración (consiguiendo un contacto directo entre el hueso y el implante a nivel microscópico).^{106,109-111}

Por lo expuesto anteriormente se tiene que la combinación sinérgica de los biomateriales y la terapia celular son de gran interés. De hecho, el potencial de las células madre mesenquimales, en la regeneración de hueso se ha destacado desde el 1980s. En la ingeniería de tejido óseo se ha usado células que van desde los osteoblastos primarios de adultos (células óseas) a las células mesenquimales de la médula ósea,¹⁰⁶ ahora bien, para definir el propósito de esta tesis es primordial destacar la diferencia entre reparación y regeneración de los tejidos, antes de profundizar sobre los avances en esta área.

En la reparación del tejido óseo, se produce la remodelación del hueso, mediante la formación de un callo fibroso, que asume características geométricas y físicas propias del hueso para soportar las cargas, sin embargo esto puede dar origen a problemas de aflojamiento aséptico y/o inestabilidad del implante.¹⁰⁹

En el caso de la regeneración tisular es la respuesta que consigue la restitución integral del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es cicatricial con características estructurales y funcionales diferentes al original.^{105,112}

Por tanto el objetivo deseado es la oseointegración, la cual es producto de la regeneración del tejido óseo, y en ella se requiere obtener un contacto directo entre el hueso y el implante.¹¹³

La regeneración ósea, origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Desde los estudios de Trueta (1963),¹¹⁴ se conoce de la importancia de los vasos sanguíneos en la osteogénesis, ya que tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un coagulo o hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina, en este momento las células liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un

nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso va a ser fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización.¹⁰⁵

En función de los avances en la ciencia de los materiales y el desarrollo de la ingeniería de tejidos están surgiendo: la asociación de factores osteo-inductivos con materiales implantables, y la asociación de las células madre osteogénicas en los mismos. En ambos casos, una comprensión de los fenómenos de adhesión celular y, en particular, la comprensión de las proteínas implicadas en la adhesión de osteoblastos, en contacto con los materiales es de crucial importancia.⁸

I.3.5.1 INTERACCIÓN OSTEOLASTOS-METAL.

Todas las células, exceptuando las sanguíneas, se asocian estrechamente con otras células y con la matriz extracelular, para que esto ocurra debe darse un paso previo, las células deben reconocerse, por tanto, existen dos conceptos de interés en este proceso: reconocimiento y adherencia. Aun cuando, no es sencillo delimitar uno del otro, es posible considerar que el reconocimiento, sólo consiste en la capacidad que posee una célula de interactuar con otra o con alguna estructura de la matriz extracelular. Este mecanismo suele ser de tipo ligando-receptor en las dos direcciones y puede ser transitorio o servir de base para el establecimiento de un sistema posterior de mayor adhesión. Por otra parte, la adherencia es cuando se da la unión o anclaje entre células y/o la matriz.¹¹⁵

Existen tres tipos de uniones intracelulares o uniones de membrana: adherentes, ocluyentes y comunicantes, siendo las primeras las principalmente implicadas en mecanismos de adhesión/anclaje. La estructura molecular de las diferentes uniones adherentes, presentan una estructura general que incluye la existencia de:¹¹⁵

- Una proteína transmembrana que en el caso de las uniones célula-célula es de tipo caderina y en el caso de las uniones célula-matriz es de tipo integrina.
- Unas proteínas de unión que median la unión entre la transmembrana y el citoesqueleto.
- Los elementos del citoesqueleto que pueden ser microfilamentos o filamentos intermedios.¹¹⁵

Las proteínas de membrana son capaces de reconocer a los componentes de la matriz extracelular y se unen a ellos determinando la adhesión de las células al medio que las rodea.¹¹⁵

Por tanto la adhesión celular tiene lugar mediante diferentes clases de receptores superficiales. De forma natural las células se unen entre ellas mediante unas proteínas no colagénicas (fibronectina y vitronectina), también llamadas proteínas de adhesión celular. Estas proteínas tienen en común una secuencia de aminoácidos de Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), que es un dominio de adhesión peptídico, reconocido por los receptores superficiales llamados integrinas, que forman parte de la familia de glicoproteínas de membrana; y sirve como mediador en el proceso de adhesión de células con la matriz extracelular y entre células.

Todas las integrinas son heterodímeros constituidos por dos subunidades conocidas como α y β asociadas de una manera no covalente. Ambas subunidades son

glicoproteínas de la transmembrana cuya combinación define la propiedad de adhesión y de señalización.

En cuanto a la interacción de las células con el implante (metálico) se tiene que, una vez introducido el implante en el organismo en muy corto tiempo, se adherirán una serie de proteínas sobre la superficie del metal, proceso que ocurre antes de que las células lleguen, de allí que las células ven primeramente una capa de proteínas antes que la superficie del biomaterial, por tanto, ellas responderán en función del tipo de proteínas. A partir de este momento las células pueden adherirse, liberar compuestos activos, reclutar otras células, crecer en tamaño, proliferar o morir, esto dependerá de las proteína de la superficie del implante.¹¹

Sobre la adhesión celular en superficies pueden encontrarse diversos estudios, tales como los realizados por M. C. Porté-Durrieu et al. (1999), en sustratos de sílica y tres métodos diferentes de modificación superficial (la silanización con aminosilanos, el uso de moléculas de maleimido y la inmovilización de péptidos que contienen la secuencia RGD), los experimentos in Vitro fueron realizados con células endoteliales y se observó una mejor adhesión en los sustratos que contenían RGD, concluyendo que esta respuesta se debe a un evento específico entre la membrana celular y la superficie del material.¹¹⁶

Otros aportes como el de Beckerle et al. (2001), sobre las integrinas permiten afirmar que existen o se conocen 18 tipos de subunidades α y 8 subunidades β en los mamíferos; con la excepción de la subunidad β_4 , todas las integrinas de la subunidad β poseen en su longitud entre 760-790 aminoácidos, para la subunidad α su longitud es de unos 1000-1200 aminoácidos.¹¹⁷

En dichos estudios se ha llegado a deducir que las integrinas presentan diferentes grados de activación o cambios en la afinidad del enlace con el ligando. El proceso capaz de modificar la afinidad es definido como Modulación de la Afinidad y consiste en una serie de señales que van desde dentro hacia fuera, siendo por lo tanto la regulación adhesiva una respuesta a estímulos fisiológicos.

Según lo reportado por Félix Rico et al. (2001), la adhesión celular es requerida para las funciones biológicas esenciales, tales como migración, formación de tejidos y curación de heridas, siendo estas mediadas por moléculas que realizan enlaces específicos con determinadas células de la matriz extracelular.¹¹⁸

Posteriormente, García et al. (2005), estudiaron superficies bio-adhesivas para promover la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso, ellos indican que la unión de receptores de la integrina de adhesión a los componentes de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno la de tipo I), activa las vías de señalización para guiar la supervivencia de los osteoblastos, la progresión del ciclo celular, la expresión génica, y mineralización de la matriz.

En dicho estudio se aplicaron estrategias biomiméticas de exploración de estas interacciones adhesivas para diseñar superficies capaces de promover la adhesión y la diferenciación de osteoblastos, la formación del hueso, y la oseointegración. Estas iniciativas se centraron en la dirección de la integrina vinculante a través presentación de los motivos bio-adhesivos derivados de matrices extracelulares. Estos enfoques de biología molecular proporcionaron estrategias prometedoras para el desarrollo de implantes biológicamente activos e injertos de sustratos con reparación ósea mejorada.¹¹⁹

En el estudio de Timothy D et al. (2007), se optimizaron las superficies de NiTi usando aminopropilsilano y consiguiendo un enlace covalente de la molécula PA (peptide amphiphile), posteriormente fueron capaces de enlazar RGD y demostraron la adhesión, diferenciación y proliferación celular.⁸⁴

En el 2011 Bacakova et al., realizaron un review en el que describen que la interacción de las células y tejidos con materiales artificiales diseñados para aplicaciones en la biotecnología y en la medicina se rige por las propiedades físicas y químicas de la superficie del material. Ellos estudiaron la relación que existe entre la mojabilidad superficial y la adhesión celular, también mencionan que la superficie del material puede ser funcionalizada por diversas biomoléculas y nanopartículas, mejorando su atractivo para las células y su eficacia en la regulación de las funciones celulares. Comentan que otro factor importante para la interacción célula-material es la rugosidad superficial y la topografía de la superficie, donde sustratos nanoestructurados ($R_a \leq 100$ nm), se consideran generalmente que es beneficioso para la adherencia y el crecimiento celular, mientras que los sustratos microestructurados se comportan más controversialmente; ya que pueden obstaculizar la propagación de células y la proliferación pero mejorar la diferenciación celular, particularmente en células osteogénicas. Por tanto, se tiene que las propiedades físico-químicas de las superficies son capaces de controlar el tamaño, forma, distribución y la madurez de placas de adhesión focal en las células, y por lo tanto la adhesión celular, proliferación y diferenciación entre otras funciones celulares.¹²⁰

I.3.5.2 BIOMOLÉCULAS QUE INDUCEN LA OSEOINTEGRACIÓN SOBRE METALES.

La pre-adsorción de cierta clase de proteínas sobre un sustrato sólido, incrementa la adhesividad de muchas clases de células, debido a que las células tienen receptores en sus membranas que se enlazan específicamente con cierto tipo de proteínas especializadas.¹¹

La adhesión como se ha descrito en el apartado anterior se realiza a través de los receptores de adhesión llamados integrinas y por lo descrito anteriormente se tiene que diversas moléculas biológicamente funcionales que pueden ser inmovilizadas sobre superficies de metales para mejorar la regeneración ósea.

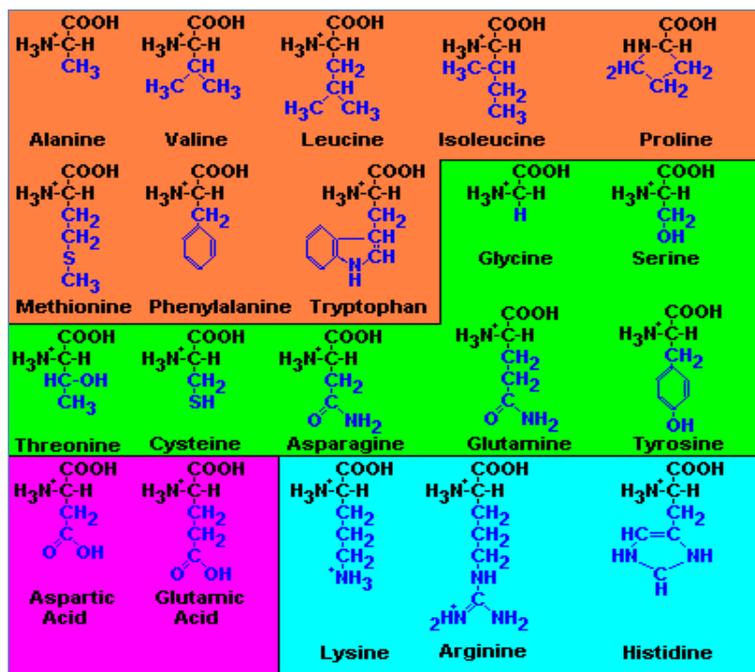


Figura I 11 Aminoácidos

Por esta razón se hace imprescindible conocer las

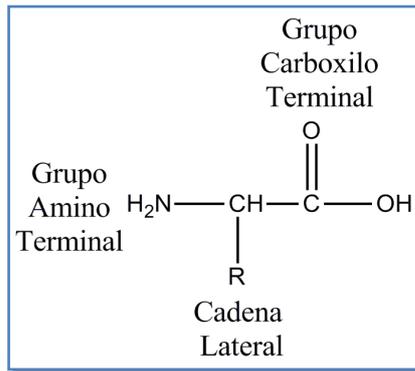


Figura I 12 Fórmula General de los Aminoácidos

fórmula general mostrada en la *Figura I 12*.

Los aminoácidos varían en sus cadenas laterales (*Figura I 11*). Los ocho aminoácidos del área superior son no-polares e hidrofóbicos. Los otros aminoácidos son polares e hidrofílicos. Los dos aminoácidos en el recuadro inferior izquierdo son ácidos (con grupos "carboxilos" en la cadena lateral) y los tres aminácidos en el recuadro inferior derecho son básicos (grupos "aminos" en la cadena lateral).

El dipéptido o enlace peptídico es la unión covalente del grupo amino ($-\text{NH}_2$) de un aminoácido y el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) de otro aminoácido, produciéndose la pérdida de una molécula de agua y la formación de un enlace covalente C-N (*Figura I 13*)

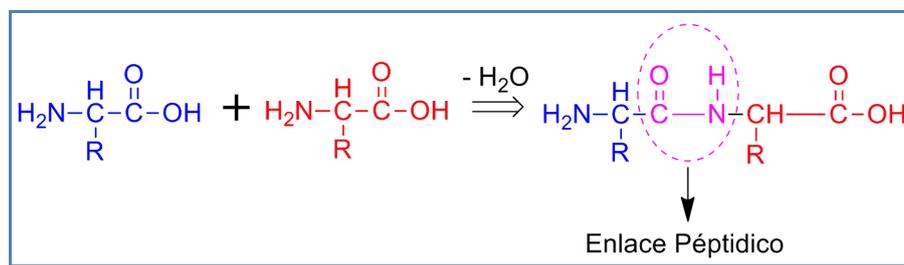


Figura I 13 Formación de un Dipéptido.¹²¹

Como se ha mencionado el RGD (Arg-Gly-Asp) es una secuencia peptídica que está expresada en muchas moléculas de la matriz extracelular (ECM),^{122,123} siendo el principal ligando que se enlaza con las integrinas receptoras.

La unión del RGD entre las subunidades α y β de las integrinas influirá en la morfología celular, la proliferación, la diferenciación y la expresión génica.

Por tanto el RGD ha sido ampliamente estudiado y se ha descrito en estudios previos que esta secuencia de aminoácidos presenta capacidad de respuesta para la adhesión celular en muchos casos¹²² y se ha comprobado que es eficiente en la adhesión de osteoblastos.⁸

De igual manera, estudios previos han demostrado que secuencias peptídicas, tales como REDV, PHSRN y KNEED de la fibronectina, YIGSR de laminina y FHRRKA de la heparina le confieren una ventaja específica a los sustratos.¹⁰⁰

Entre ellos el PHSRN ha sido identificado como un ligando de sinergia que realiza la proliferación de las células que se unen a sustratos que presentan el péptido RGD. En la actualidad existe un amplio consenso que esta secuencia (PHSRN) juega un

importante papel en la adhesión celular, pero aún no hay acuerdo sobre el mecanismo molecular por el que la sinergia del péptido incrementa la actividad de adhesión.¹²⁴ Adicionalmente, otros estudios indican que esta secuencia induce a la invasión de la matriz extra celular y acelera la cicatrización.^{125,126}

Ahora bien, la unión a través de las integrinas es sólo uno de los mecanismos implicados en la adhesión de osteoblastos; otra forma es la interacción entre la transmembrana de los proteoglicanos y los sitios de unión a heparina en las proteínas de la ECM.¹²⁷ Para ello dos secuencias de péptidos han sido identificadas: KRSR (Lys-Arg-Ser-Arg) y FHRIKA (Phe-His-Arg-Arg-Iso-Lys-Ala). KRSR representa una secuencia encontrada en cinco proteínas adhesivas diferentes relacionadas con el hueso: fibronectina, vitronectina, hueso sialoproteína, trombospondina, y osteopontina, mientras que FHRIKA se deriva de hueso sialoprotein.¹²⁸

Como se ha mencionado anteriormente, existen investigaciones que indican que la combinación de dos secuencias de péptidos diferentes, como RGD y FHRIKA, podría proporcionar una mejor adhesión de osteoblastos; como también favorecería la propagación y la cantidad de tejido mineralizado.^{122,123,128,129} Además, ha sido reportado que una mejor respuesta celular se obtienen entre una integrina de unión y un dominio de unión a heparina.¹²⁸

En resumen las biomoléculas son capaces de inducir reacciones específicas en células a través de la unión con sus receptores (integrinas), y por tanto, controlar la interacción entre el tejido y el biomaterial. Pero para su adhesión sobre las superficies metálicas es necesario realizar una modificación biomimética de las superficies estable que permita un enlace estable entre el sistema biológico y un material inorgánico.

I.4 BIBLIOGRAFÍA.

1. Liu, X., Chu, P. & Ding, C. Surface Modification of Titanium, Titanium Alloys, and Related Materials for Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: R* **47**, 49-121 (2004).
2. Gutierrez Gonzalez, C. F. Nuevos Materiales Cerámica - Niobio con Aplicaciones Biomédicas. (2009).
3. Estados Unidos revisa la seguridad de implantes de cadera totalmente metálicos. *ep/latam* (2012).at <<http://www.europapress.es/latam/estadosunidos/noticia-eeuu-estados-unidos-revisa-seguridad-implantes-cadera-totalmente-metalicos-20120627175337.html>>
4. Rosenberg, E. S. *et al.* A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **19**, 873-9
5. Perry, J. & Lenchewski, E. Clinical Performance and 5-year Retrospective Evaluation of Frialit-2 Implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19(6)**, 887-891 (2004).
6. Machtei, E. E., Mahler, D., Oettinger-Barak, O., Zuabi, O. & Horwitz, J. *Dental Implants Placed in Previously Failed Sites: Survival Rate and Factors Affecting the Outcome.* 259-264 (2008).doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01466.x
7. Sevilla Pablo, Pegueroles Marta, Salvagni Emiliano, Rodríguez Daniel, G. F. J. Biofuncionalización: El futuro de los implantes. *Gaceta Dental* (2010).
8. Anselme, K. Review: Osteoblast Adhesion on Biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667-81 (2000).
9. Hernández, M. A. Biofuncionalización de Superficies de Silicio Monocristalino, Nanoestructurado y Macroporoso. (2006).
10. Hanawa, T. An Overview of Biofunctionalization of Metals in Japan. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **6 Suppl 3**, S361-9 (2009).
11. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, J. E. L. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* (London, 2004).
12. Williams, D. F. *The Williams Dictionary of Biomaterials.* 368 (Liverpool University Press: Liverpool, UK, 1999).
13. Gustavo, A., Gonzalez, M. F. & Cuadrado, T. R. Aportes Hacia Nuevos Materiales. 22-32 (2001).
14. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897-909 (2009).
15. Vallet, R. M. *Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos.* (Madrid,).
16. F. J. Gil, M.P.Ginebra, J. A. P. Biomateriales. 141-157 (2002).
17. Anastacio, M., Olivas, S., Patricia, M., Zavala, V. & Alberto, J. Hipersensibilidad a Metales en Pacientes con Implantes Ortopédicos. *Allergy* **57**, 127-130 (2010).

18. Gil, F. J. & Ginebra, M. P. Metales y Aleaciones para la Substitución de Tejidos Duros. *Biomecánica* **VII**, **13**, 73-78 (1999).
19. Kocijan, A., Milosev, I. & Pihlar, B. Cobalt-based Alloys for Orthopaedic Applications Studied by Electrochemical and XPS Analysis. *Journal of materials science. Materials in medicine* **15**, 643-50 (2004).
20. Walter, L. R., Marel, E., Harbury, R. & Wearne, J. Distribution of chromium and cobalt ions in various blood fractions after resurfacing hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* **23**, 814-21 (2008).
21. McMinn Metal Ions from Metal on Metal Hip Replacement. *Surface Hippy* (2006).
22. Echavarría, A. Una Perspectiva de los Biomateriales Vista desde un Diseño Específico: La Prótesis Total de Cadera. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. Colombia* 95-108 (2003).
23. Pegueroles Neyra, M. Interactions Between Titanium Surfaces and Biological Components. 263 (2009).
24. Niinomi, M. Recent Research and Development in Titanium Alloys for Biomedical Applications and Healthcare Goods. *Science and Technology of Advanced Materials* **4**, 445-454 (2003).
25. Merritt, K. & Brown, S. a Tissue Reaction and Metal Sensitivity. *Acta orthopaedica Scandinavica* **51**, 403-11 (1980).
26. Matsuno, H., Yokoyama, A., Watari, F., Uo, M. & Kawasaki, T. Biocompatibility and Osteogenesis of Refractory Metal Implants, Titanium, Hafnium, Niobium, Tantalum and Rhenium. *Biomaterials* **22**, 1253-62 (2001).
27. González, M., Peña, J., Manero, J. M., Arciniegas, M. & Gil, F. J. Design and Characterization of New Ti-Nb-Hf Alloys. *Journal of Materials Engineering and Performance* **18**, 490-495 (2009).
28. Niinomi, M. Fatigue Characteristics of Metallic Biomaterials. *International Journal of Fatigue* **29**, 992-1000 (2007).
29. Metikos-Huković, M., Kwokal, A. & Piljac, J. The Influence of Niobium and Vanadium on Passivity of Titanium-based Implants in Physiological Solution. *Biomaterials* **24**, 3765-3775 (2003).
30. González, M., Peña, J., Manero, J. M., Arciniegas, M. & Gil, F. J. Optimization of the Ti-16.2Hf-24.8Nb-1Zr Alloy by Cold Working. *Journal of Materials Engineering and Performance* **18**, 506-510 (2009).
31. Jovanovic, S., Spiekermann, H. & Richter, E. Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants in Dehisced Defects Sites: A Clinical Study. *Oral Maxillofac Implants* **7**, 233-245 (1992).
32. Ikeda Artacho, M. C., Ceccarelli Calle, J. F. & Proano de Casalino, D. Peri-implantitis y Mucositis Periimplantaria. *Estomatol. Herediana* 90-98 (2007).at <http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1019-43552007000200008&script=sci_arttext&tIng=es>
33. Dunstan, E., Ladon, D., Whittingham-Jones, P., Carrington, R. & Briggs, T. W. R. Chromosomal Aberrations in the Peripheral Blood of Patients with Metal-on-Metal Hip Bearings. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **90**, 517-22 (2008).

34. Malviya, A. & Holland, J. P. Pseudotumours Associated with Metal-on-Metal Hip Resurfacings: 10-Year Newcastle experience. *Acta Orthopaedica Belgica* **75**, 477-483 (2009).
35. Baixa, H. M., L, G. A. J., C, H. D. L. M., D, M. L. & G, G. L. Reacciones Alérgicas / Inmunológicas a Materiales Empleados en Cirugía Ortopédica y Traumatología I . Materiales Internos Immunoallergic Reactions to Materials Used in Orthopedic Surgery and Traumatology I. Internal materials. *Mapfre Medicina* **2**, 114-125 (2004).
36. Contact, H. F., Veron, C., Martin, P. & Hildebrand, H. F. *Nickel, Chromium, Cobalt Dental Alloys and Allergic Reactions: An Overview. Biomaterials* **10**, 545-548 (Institut de Médecine du Travail, Faculté de Médecine: LILLE-Cedex, France, 1988).
37. Evans, E., Freeman, M., Miller, A. & Vernon-Roberts, B. Metal Sensitivity as a Cause of Bone Necrosis and Loosening of the Prosthesis in Total Joint Replacement. *The Journal of bone and joint surgery. American volume British Vo*, 626-642 (1974).
38. SUNDERMAN, F. W. J. *et al.* Cobalt, chromium, and nickel concentrations in body fluids of patients with porous-coated knee or hip prostheses. *J Orthopaedic Research* **7 (3)**, 307-315 (1989).
39. Merritt, K., Crowe, T. D. & Brown, S. A. Elimination of Nickel, Cobalt, and Chromium Following Repeated Injections of High Dose Metal Salts. *Journal of Biomedical Materials Research* **23**, 845-862 (1989).
40. Coleman, R. F., Herrington, J. & Scales, J. T. Concentration of Wear Products in Hair, Blood, and Urine After Total Hip Replacement. *British medical journal* **1**, 527-9 (1973).
41. Huber, M., Reinisch, G., Trettenhahn, G., Zweymüller, K. & Lintner, F. Presence of Corrosion Products and Hypersensitivity-Associated Reactions in Periprosthetic Tissue After Aseptic Loosening of Total Hip Replacements with Metal Bearing Surfaces. *Acta Biomaterialia* **5**, 172-180
42. Mabileau, G., Kwon, Y.-M., Pandit, H., Murray, D. W. & Sabokbar, A. Metal-on-Metal Hip Resurfacing Arthroplasty: A Review of Periprosthetic Biological Reactions. *Acta orthopaedica* **79**, 734-47 (2008).
43. Curtis, J. R., Goode, G. C., Herrington, J. & Urdaneta, L. E. Possible Cobalt Toxicity in Maintenance Hemodialysis Patients After Treatment with Cobaltous Chloride: A Study of Blood and Tissue Cobalt Concentrations in Normal Subjects and Patients with Terminal and Renal Failure. *Clinical Nephrology* **5**, 61-65 (1976).
44. Merritt, K., Brown, S. A. & Sharkey, N. A. The Binding of Metal Salts and Corrosion Products to Cells and Proteins In Vitro. *Journal of biomedical materials research* **18**, 1005-1015
45. Goodman, S. B. Does the Immune System Play a Role in Loosening and Osteolysis of Total Joint Replacements? *Journal of longterm effects of medical implants* **6**, 91-101 (1996).
46. Yang, J. & Merritt, K. Detection of antibodies against corrosion products in patients after Co-Cr total joint replacements. *Journal of Biomedical Materials Research* **28**, 1249-1258 (1994).

47. Werman, B. S. & Rietschel, R. L. Chronic urticaria from tantalum staples. *Archives of Dermatology* **117**, 438-439 (1981).
48. Merritt, K. & Brown, S. A. Distribution of Cobalt Chromium Wear and Corrosion Products and Biologic Reactions. *Clinical Orthopaedics and Related Research* S233-43 (1996).at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769337>>
49. Li, Y., Zhao, T., Wei, S., Xiang, Y. & Chen, H. Effect of Ta2O5/TiO2 Thin Film on Mechanical Properties, Corrosion and Cell Behavior of the NiTi Alloy Implanted with Tantalum. *Materials Science and Engineering: C* **30**, 1227-1235 (2010).
50. Denkhaus, E. & Salnikow, K. Nickel Essentiality, Toxicity, and Carcinogenicity. *Critical reviews in oncologyhematology* **42**, 35-56 (2002).
51. Peltonen, L. Nickel Sensitivity in the General Population. *Contact Dermatitis* **5**, 27-32 (1979).
52. Bordel-Gómez, M. ., Miranda-Romero, A. & Castrodeza-Sanz, J. Epidemiología de la Dermatitis de Contacto: Prevalencia de Sensibilización a Diferentes Alérgenos y Factores Asociados. *Actas Dermosifiliogr* 59-75 (2010).
53. Gawkrödger, D. J. Metal Sensitivities and Orthopaedic Implants Revisited: The Potential for Metal Allergy with the New Metal-on-Metal Joint Prostheses. *The British journal of dermatology* **148**, 1089-1093 (2003).
54. Puolakka, T. J. *et al.* The Finnish Arthroplasty Register: Report of the Hip Register. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **72**, 433-441 (2001).
55. Malchau, H., Herberts, P., Eisler, T., Garellick, G. & Söderman, P. The Swedish Total Hip Replacement Register. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **84-A Suppl**, 2-20 (2002).
56. Haddad, F., Cobb, A., Bentley, G., Levell, N. & Dowd, P. Hypersensitivity in Aseptic Loosening of Total Hip Replacements. The role of Constituents of Bone Cement. *The Journal of bone and joint surgery British volume* **78**, 546-549 (1996).
57. Gil-Albarova, J., Laclériga, A., Barrios, C. & Cañadell, J. Lymphocyte Response to Polymethylmethacrylate in Loose Total Hip Prostheses. *The Journal of bone and joint surgery British volume* **74**, 825-830 (1992).
58. Mjöberg, B. The Theory of Early Loosening of Hip Prostheses. *Orthopedics* **20**, 1169-1175 (1997).
59. Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign Body Reaction to Biomaterials. *NIH Public Access* **20**, 86-100 (2009).
60. Dee, K. C., Puleo, D. A. & Bizios, R. Protein-surface Interaction. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interaction* 228 (2002).
61. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. & Lemon, J. E. The Role of Adsorbed Proteins in Tissue Response to Biomaterials. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* 237-246 (2004).at <http://books.google.es/books?id=Uzmrq7LO7loC&pg=PA237&lpg=PA237&dq=the+role+of+adsorbed+proteins+in+tissue+response+to+biomaterials&source=bl&ots=zcWbFCEjW-&sig=AG69UrimxGgIKznk7XkOmy_BfCk&hl=ca&sa=X&ei=TxzjT739CMW2hAf>

- 1zLHSAw&ved=0CEsQ6AEwAA#v=onepage&q=the role of adsorbed proteins in tissue response to biomaterials&f=false>
62. Stupp, S. I. Self-Assembly and Biomaterials. *Nano letters* 4783-4786 (2010).doi:10.1021/nl103567y
 63. Shin, H., Jo, S. & Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4353-4364 (2003).
 64. Shekaran, A. & García, A. J. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *Journal of biomedical materials research. Part A* **96**, 261-72 (2011).
 65. Elmengaard, B., Bechtold, J. E. & Søballe, K. In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants. *Biomaterials* **26**, 3521-6 (2005).
 66. Yu, X. & Bellamkonda, R. V. Tissue-engineered scaffolds are effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps. *Tissue engineering* **9**, 421-30 (2003).
 67. Kantlehner, M. *et al.* Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* **1**, 107-14 (2000).
 68. Magdolen, U. *et al.* Growth promoting in vitro effect of synthetic cyclic RGD-peptides on human osteoblast-like cells attached to cancellous bone. *Journal of Biomechanics* **39**, (2006).
 69. Bell, B. F. *et al.* Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. *Clinical oral implants research* **22**, 865-72 (2011).
 70. Hanawa, T. Review: A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *J Periodontal & Implant Science* 263-272 (2011).
 71. Curran, J. M., Chen, R. & Hunt, J. a The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials* **27**, 4783-93 (2006).
 72. Curran, J. M., Chen, R. & Hunt, J. A. Utilisation of Silane Modified Surfaces to Control the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *European Cells and Materials* **10**, 2262 (2005).
 73. Brunette, D. M., Tengyvall, P., Textor, M. & Thomsen, P. *Titanium in Medicine: Maions, Surface Science, Engineering, Biological, Responses and Medical Applicatterial Science.* (Germany, 2001).
 74. Sevilla, P., Godoy, M., Salvagni, E., Rodríguez, D. & Gil, F. J. Biofunctionalization of titanium surfaces for osseintegration process improvement. *Journal of Physics: Conference Series 252 012009* **252**, 6 (2010).
 75. Chu, P., Chen, J. & Wang, L. Plasma-surface Modification of Biomaterials. *Materials Science and Engineering R* **36**, 143-206 (2002).
 76. Fischer, H. *et al.* Bioactivation of inert alumina ceramics by hydroxylation. *Biomaterials* **26**, 6151-7 (2005).

77. Sakamoto, H. *et al.* Effect of active hydroxyl groups on the interfacial bond strength of titanium with segmented polyurethane through gamma-mercapto propyl trimethoxysilane. *Dental materials journal* **27**, 81-92 (2008).
78. Salvati, L. & Yang, X. Ultrapasivación de una Aleación con contenido de Cromo. (2011).
79. Arroyo-Hernández, M. Characterization of Biofunctional Thin Films Deposited by Activated Vapor Silanization. *Journal Materials Res.* **23**, 1931-1939 (2008).
80. Mastrangelo, F. Self-Assembled Monolayers (SAMs): Which Perspectives in Implant Dentistry? *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **02**, 533-543 (2011).
81. Pesek, J. J. & Matyska, M. T. Methods for the Modification and Characterization of Oxide Surfaces. *Interface Science* **117**, 103-117 (1997).
82. Plueddemann, E. P. Silane Coupling Agents: Connecting Across Boundaries. 235 (1982).at <<http://www.gelest.com/goods/pdf/couplingagents.pdf>>
83. Schliephake, H. & Scharnweber, D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry* **18**, 2404 (2008).
84. Sargeant, T. D., Rao, M. S., Koh, C.-Y. & Stupp, S. I. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **29**, 1085-1098 (2008).
85. Matinlinna, J. P., Ozcan, M., Lassila, L. V. J. & Vallittu, P. K. The Effect of a 3-MethacryloxypropyltrimethoxySilane and Vinyltriisopropoxysilane Blend and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the Shear Bond Strength of Ccomposite Resin to Titanium Metal. *Dental materials official publication of the Academy of Dental Materials* **20**, 804-813 (2004).
86. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M.Wieland, B. Keller, H. S. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg – Gly – Asp – Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. **8**, 867-872 (2007).
87. Goyal, D. K. & Subramanian, A. In-situ Protein Adsorption Study on Biofunctionalized Surfaces Using Spectroscopic Ellipsometry. *Thin Solid Films* **518**, 2186-2193 (2010).
88. Navarre, S. *et al.* Structural Characterization of Self-Assembled Monolayers of Organosilanes Chemically Bonded onto Silica Wafers by Dynamical Force Microscopy. *Langmuir* **17**, 4844-4850 (2001).
89. Domingo, C., Loste, E. & Fraile, J. Grafting of Trialkoxysilane on the Surface of Nanoparticles by Conventional Wet Alcoholic and Supercritical Carbon Dioxide Deposition Methods. *The Journal of Supercritical Fluids* **37**, 72-86 (2006).
90. Bai, Y., Li, Y., Yang, Y. & Yi, L. Covalent Immobilization of Triacylglycerol Lipase onto Functionalized Nanoscale SiO₂ Spheres. *Process Biochemistry* **41**, 770-777 (2006).
91. Godoy, M. Biofuncionalización de Superficies de Titanio para la Mejora del Proceso de Osteointegración. (2009).
92. Garcia, a. J., Reyes, C. D. D. & García, A. J. Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Journal of Dental Research* **84**, 407-413 (2005).

93. Pasqui, D., Rossi, A., Di Cintio, F. & Barbucci, R. Functionalized titanium oxide surfaces with phosphated carboxymethyl cellulose: characterization and bonelike cell behavior. *Biomacromolecules* **8**, 3965-72 (2007).
94. Puleo, D. A. Biochemical Surface Modification of Co-Cr-Mo. *Biomaterials* **17**, 217-222 (1996).
95. Ferris, D. M. *et al.* RGD-coated Titanium Implants Stimulate Increased Bone Formation In Vivo. *Biomaterials* **20**, 2323-31 (1999).
96. Reznia, A. & Healy, K. E. Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnology progress* **15**, 19-32 (1999).
97. Davis, D. H., Giannoulis, C. S., Johnson, R. W., Desai, T. A. & Hal, D. Immobilization of RGD to < 1 1 1 > Silicon Surfaces for Enhanced Cell Adhesion and Proliferation. *Biomaterials* **23**, 4019-27 (2002).
98. Benoit, D. S. W. & Anseth, K. S. The Effect on Osteoblast Function of Colocalized RGD and PHSRN Epitopes on PEG Surfaces. *Biomaterials* **26**, 5209-20 (2005).
99. Secchi, A. G. *et al.* RGDS peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment , differentiation and confer resistance to apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2006).doi:10.1002/jbm.a
100. Ochsenhirt, S. E., Kokkoli, E., McCarthy, J. B. & Tirrell, M. Effect of RGD Secondary Structure and the Synergy Site PHSRN on Cell Adhesion, Spreading and Specific Integrin Engagement. *Biomaterials* **27**, 3863-74 (2006).
101. Bagno, A. *et al.* Human Osteoblast-like Cell Adhesion on Titanium Substrates Covalently Functionalized with Synthetic Peptides. *Bone* **40**, 693-9 (2007).
102. Chollet, C. *et al.* The Effect of RGD Density on Osteoblast and Endothelial Cell Behavior on RGD-grafted Polyethylene Terephthalate Surfaces. *Biomaterials* **30**, 711-20 (2009).
103. Petershans, A. *et al.* ToF-SIMS Analysis of Structured Surfaces Biofunctionalized by a One-step Coupling of a Spacer-linked GRGDS Peptide. *Journal of colloid and interface science* **341**, 30-7 (2010).
104. Khatayevich, D. *et al.* Biofunctionalization of Materials for Implants Using Engineered Peptides. *Acta Biomaterialia* **6**, 4634-41 (2010).
105. Hernández-gil, I. F.-tresguerres *et al.* Bases fisiológicas de la regeneración ósea I . Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral* 47-51 (2005).
106. Stevens, M. M. Biomaterials for bone Tissue Engineering. Review. *Materialstoday* **11**, 18-25 (2008).
107. Vallet-regí, M. Biocerámicas: evolución y aplicaciones. *An. Quím.* **107**, 28-35 (2011).
108. Afanasyev, B. V. *et al.* A. J. Friedenstein , founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation* **1**, 35-38 (2010).
109. Kraus, K. H. & Kirker-Head, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery* **35**, 232-42 (2006).

110. Alberektsen, T., Branemark, P., Hansson, H. A. & Lindström, J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **52**, 155-170 (1981).
111. Vanegas Acosta, J. C., Garzón-alvarado, D. & Casale, M. Interacción entre osteoblastos y superficies de titanio: aplicación en implantes dentales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* **29**, 51-68 (2010).
112. Arismendi, J. A., Ospina, A. M. & Agudelo, L. P. Oseointegración: Una cascada de eventos. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* (2000).
113. Belém, A. *et al.* Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. *Braz Dent* **21**, 471-481 (2010).
114. Trueta, J. THE ROLE OF IN OSTEOGENESIS. *The Journal Bone Joint Surgery* **45 B**, (1963).
115. Fernández, B., Bodega, G., Suarez, I. & Muñiz, E. *Biología Celular*. 319 (Editorial Síntesis, S.A.: Madrid-España,).
116. Porté-Durrieu, M. C. *et al.* Development of RGD Peptides Grafted Onto Silica Surfaces: XPS Characterization and Human Endothelial Cell Interactions. *Journal of Biomedical Materials Research* **46**, 368-375 (1999).
117. Beckerle, M. C. *Cell Adhesion*. 403 (2001).
118. Rico, F. *et al.* Cell dynamic adhesion and elastic properties probed with cylindrical atomic force microscopy cantilever tips. *Journal of molecular recognition JMR* **20**, 459-466 (2007).
119. Garcia, a. J. & Reyes, C. D. Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Journal of Dental Research* **84**, 407-413 (2005).
120. Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T. & Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology advances* **29**, 739-67 (2011).
121. Ege, S. *Química Orgánica: Estructura y Reactividad. Tomo I*. 683 (editorial REVERTE, S.A.: 1997).
122. Schaffner, P. & Dard, M. M. Review: Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 119- 132 (2003).
123. Tirrell, M., Kokkoli, E. & Biesalski, M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* **500**, 61-83 (2002).
124. Feng, Y. & Mrksich, M. The Synergy Peptide PHSRN and the Adhesion Peptide RGD Mediate Cell Adhesion through a Common Mechanism. *Biochemistry* **43**, 15811-21 (2004).
125. Satriano, C. *et al.* Surface immobilization of fibronectin-derived PHSRN peptide on functionalized polymer films-effects on fibroblast spreading. *Journal of colloid and interface science* **341**, 232-9 (2010).
126. Livant, D. L. *et al.* The PHSRN Sequence Induces Extracellular Matrix Invasion and Accelerates Wound Healing in Obese Diabetic Mice. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1537-45 (2000).
127. Schuler, M., Tosatti, S., Hamilton, D. W. & Sprecher, C. M. Primary Osteoblasts Outgrown from Rat Calvarial Explants Form a " Fried-egg " -like

- Image on Non-fouling Peptide-modified Titanium Surfaces. *European Cells and Materials* **10**, 2262 (2005).
128. Schuler, M. *et al.* Comparison of the response of cultured osteoblasts and osteoblasts outgrown from rat calvarial bone chips to nonfouling KRSR and FHRRKA-peptide modified rough titanium surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **91**, 517-27 (2009).
129. Rezania, A. & Healy, K. E. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **17**, 615-23 (1999).

CAPÍTULO II.

Técnicas de Caracterización.

<i>CAPÍTULO II.</i>	51
<i>Técnicas de Caracterización.</i>	51
II.1 INTRODUCCIÓN.	55
II.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	56
II.2.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICA.....	56
II.2.1.1 INTERFEROMETRÍA DE LUZ BLANCA	56
II.2.1.2 ÁNGULO DE CONTACTO	58
II.2.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	59
II.2.2.1 FLUORESCENCIA DE RAYOS X (FRX).....	59
II.2.2.2 ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X.....	59
II.2.2.3 ToF SIMS	66
II.2.2.4 TÉCNICA DE SUSTITUCIÓN DEL COMPLEJO DE ZINC	67
II.2.2.5 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA -VISIBLE (NANODROP) 68	
II.2.2.6 ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA (FLUORIMETRÍA).....	70
II.2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR.....	70
II.2.3.1 INMUNOFUORESCENCIA.....	70
II.2.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	71
II.2.3.3 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)	71
II.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	72
II.4 BIBLIOGRAFÍA	73

Índice de Tablas del Capítulo II

Tabla II 1 Notaciones espectroscópicas y de rayos X61
Tabla II 2 Energías y anchuras de líneas de algunas líneas de rayos X de baja energía características¹⁰63

Índice de Figuras del Capítulo II

Figura II 1 Técnicas de Caracterización.....56
Figura II 2 Medición de Ra57
Figura II 3 Ángulo de Contacto58
Figura II 4 Espectroscopia fotoelectrónica por rayos-X60
Figura II 5 Proceso Auger60
Figura II 6 Medidas del recorrido libre medio inelástico en función de la EK62
Figura II 7 Espectro panorámico de CoCrMo.64
Figura II 8 ARXPS para perfiles de profundidad65
Figura II 9 Técnica de Sustitución del Complejo de Zn68

II.1 INTRODUCCIÓN.

A la hora de seleccionar las mejores superficies para aplicaciones óseas, una forma directa y sencilla de estudiar la eficacia es a través del estudio del comportamiento celular mediante cultivos celulares "in vitro", que es un método válido y sencillo, pero en el que quedan procesos sin estudiar como, por ejemplo, las diferentes etapas intermedias necesarias para injertar biomoléculas (en este caso: activación, silanización, enlace covalente con las biomoléculas). Por ende el estudio de variables como la densidad de biomoléculas u organosilanos en superficie, naturaleza de la capa de óxidos superficiales, efecto de la temperatura, concentración y tiempo de reacción en cada proceso o distribución de moléculas en superficie, aportan un conocimiento básico que podrá ser de gran utilidad a la hora de optimizar los procesos y en consecuencia, de mejorar la respuesta celular.

En esta tesis doctoral se quiere enfocar el estudio de las superficies biomiméticas caracterizando y optimizando cada proceso intermedio. Y aunque es una forma algo más compleja de abordar el problema, sus resultados permitirán optimizar el anclaje de las biomoléculas propuestas y por tanto, mejoran la respuesta celular.

No obstante, uno de los principales problemas a la hora de afrontar este reto es la utilización de técnicas de caracterización superficial lo suficientemente sensibles (para medir concentraciones atómicas bajas) y superficiales (a nivel nanométrico) que puedan detectar y caracterizar las superficies biomiméticas (organosilanos, secuencias peptídicas cortas y/o tipos de enlaces). Por tanto con respecto a la caracterización de las superficies de los materiales usados para implantes óseos, se tiene una revisión bibliográfica realizada por Jones en 2001,¹ en la cual se indica que las herramientas estándar dependen directamente de las interacciones con los fotones, electrones, iones o neutrones. Donde las técnicas de caracterización para cada caso serían:

- Interacciones con los fotones: la espectroscopia de fotoemisión (PES), la absorción de rayos X de estructura fina, la espectroscopia de infrarrojo (IR), entre otras.
- Interacciones con los electrones: la espectroscopia de electrones de Auger (AES), la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), la espectroscopia de pérdida de energía de electrones, la difracción de electrones, etc.
- Interacción con los iones: la espectroscopia de iones de masa secundarios (SIMS), la espectroscopia de dispersión de iones (ISS) y otras.
- Interacciones con los neutrones: dispersión de neutrones.

Posteriormente se Buddy Ratner (2004),² describe que la superficie de un biomaterial puede alterar o influir, tanto en la inmovilización de proteínas como en la respuesta de las células y su interacción conduce a la biocompatibilidad. Por lo tanto, la comprensión de la superficie puede ofrecer información sobre la naturaleza de la reacción biológica, dado que las superficies son inevitablemente diferentes en la química y la estructura de la mayor parte de los materiales, por ende técnicas especiales de análisis son necesarias para estudiar las superficies.

El mismo autor³ propone dos principios fundamentales a considerar en la caracterización de los biomateriales, primero debe tenerse en cuenta que los métodos usados para analizar las superficies, tienen la potencialidad de alterarla, por lo cual es esencial ser consciente del daño que se puede ocasionar, segundo

deben estimarse que cada medición puede producir artefactos, por tanto se requiere recopilar la mayor cantidad de información, por lo cual debe usarse en la medida de lo posible más de un método de medición, para poder realizar una corroboración de los datos. Ratner presenta como técnicas de caracterización más comunes para el estudio de las superficies de los biomateriales: ángulo de contacto, XPS, SIMS, SEM, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, con el accesorio de reflexión total atenuada (FTIR-ATR) y microscopia de efecto túnel (STM).

II.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Para la caracterización físico-química de las superficies estudiadas en esta tesis, se utilizaron diversas técnicas, las cuales han sido clasificadas según los parámetros de medición (físicos o químicos) y se han esquematizado en la *Figura II 1*

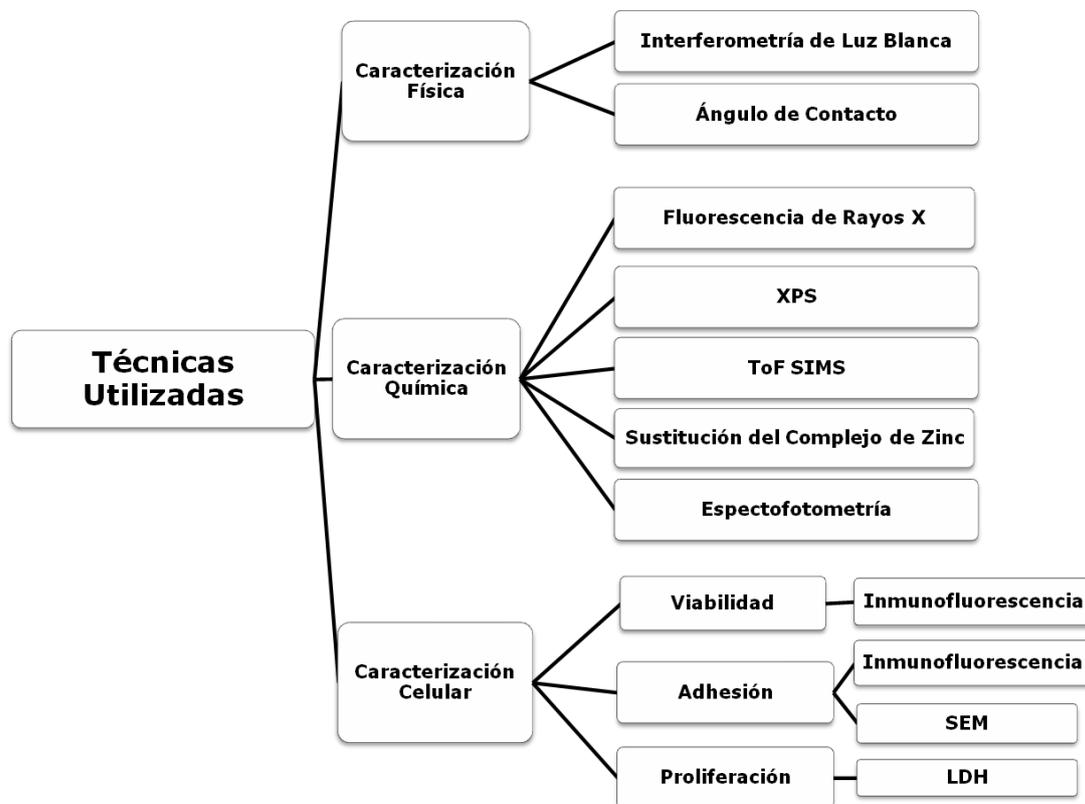


Figura II 1 Técnicas de Caracterización

II.2.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICA

II.2.1.1 INTERFEROMETRÍA DE LUZ BLANCA

Por medio de la interferometría se puede determinar la rugosidad de la capa superficial a una escala nanométrica, ya que proporciona una suficiente resolución lateral (400 nm) y una muy alta resolución en profundidad (1 nm). Ésta es una técnica de no contacto, que permite obtener imágenes en dos y tres dimensiones. En ella los objetivos interferométricos disponen de un divisor de haz que envía una parte de la luz a la superficie de la muestra y otra parte a un espejo de referencia. La luz reflejada de estas dos superficies se recombina formando bandas de interferencia que se recogen en una cámara CCD. Para cada punto de la superficie

existe una distancia del objetivo a la muestra que proporciona el enfoque (definido por la intensidad máxima de pico en las bandas de interferencia). Mediante un barrido vertical se localizan puntos de enfoque para cada área de la muestra, generando así un mapa tridimensional de la superficie, con resolución sub-nanométrica en el eje vertical.

Hay dos modos de medición: el modo de interferometría de desplazamiento de fase: PSI (phase-shifting interferometry), recomendado para muestras nanométricamente lisas y el modo de interferometría de escaneo vertical: VSI (vertical scanning interferometry) para muestras rugosas. Para el análisis de la rugosidad de una muestra existen diversos factores intervinientes, por tal razón este estudio se basó en la selección de los parámetros en la norma ISO 4287-1997,⁴ considerando:

Ra: es la media aritmética de los valores absolutos de las desviaciones de la superficie de la altura medida o superficie nominal desde el plano de mejor ajuste (*Figura II 2*).

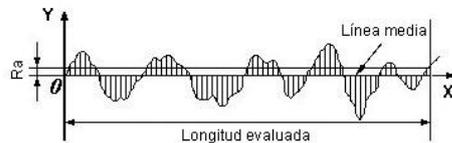


Figura II 2 Medición de Ra

Históricamente, Ra fue uno de los primeros parámetros utilizados para cuantificar la rugosidad superficial. La mayoría de las especificaciones de la superficie de rugosidad la incluyen, no obstante, puede ser engañosa, ya que muchas superficies con características diferentes pueden tener el mismo Ra; debido a que solo cuantifica la magnitud "absoluta" de la altura de la superficie y es insensible a la distribución espacial; es decir, un profundo valle o un pico alto dará como resultado el mismo valor, tal cual como puede verse en la *Ecuación II 1*.

Históricamente, Ra fue uno de los primeros parámetros utilizados para cuantificar la rugosidad superficial. La mayoría de las especificaciones de la superficie de rugosidad la incluyen, no obstante, puede ser engañosa, ya que muchas superficies con características diferentes

$$R_a = \int_0^{L_m} \frac{|y|}{L_m} dx$$

Ecuación II 1

Rq: la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media y es indicativa de la desviación estándar de la distribución de la altura. Sin embargo también es insensible a la distribución espacial de la altura de la superficie, en la que dos picos muy altos aportarán la misma información si los picos están cerca uno del otro y/o separados por el campo de medición.

Rku: proporciona la medida de la dispersión o concentración de datos, en una distribución (curtosis). Para su análisis si los valores son iguales a 3 se corresponde una superficie estocástica, sin un patrón geométrico definido, que presentan homogeneidad en la altura de los picos. Si los valores son mayores que 3 indican que la superficie presenta muchos picos y si son menores a 3 son más redondeados

Condiciones de Ensayo

Se utilizó un interferómetro de luz blanca Wyko NT 9300, con una velocidad máxima de escaneo de 25 $\mu\text{m/s}$. Los datos fueron adquiridos mediante el método de medición VSI y se hizo uso del software Vision 32, para el procesamiento de las imágenes obtenidas, logrando así eliminar los efectos ópticos de ondulación producidos por la técnica. Para corregir el efecto óptico de ondulación se empleó un filtro de curvatura e inclinación (curvature and tilt), añadiendo la opción de filtro notch.

Se trabajó con triplicados de cada tipo de muestra y sobre cada una de ellas se realizaron al menos cuatro medidas en puntos tomados aleatoriamente.

II.2.1.2 ÁNGULO DE CONTACTO

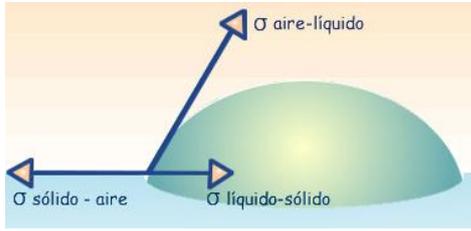


Figura II 3 Ángulo de Contacto

El estudio de la mojabilidad se hace a través de un ángulo θ (ángulo de contacto); el cual es definido como el ángulo formado entre la superficie y la línea tangente al punto de contacto entre la gota de líquido con el sólido (Figura II 3).

Este ángulo depende de la energía superficial del sólido, la energía interfacial (sólido-líquido, líquido-gas y sólido-gas) y la tensión superficial del líquido; ya que la energía superficial es una unidad de la reactividad de una superficie, de esta manera cuando un fluido entra en contacto con la superficie de un sólido, (en el cual los átomos se encuentran parcialmente rodeados por otros) se produce una atracción que equilibra las fuerzas cohesivas del fluido.

Cuando θ es menor a 90° el fluido es hidrofílico y si es mayor a 90° el fluido es hidrofóbico.⁵ Una tensión de adhesión de cero indica que los fluidos tienen igual afinidad por la superficie, indicando su capacidad de humectación inmediata y carácter súper hidrofílico ($\leq 5^\circ$), lo cual es consistente con la idea de que la superficie se encuentra perfectamente limpia, con enlaces químicos insaturados y con un estado de energía más alto y por tanto exhibe propiedades más hidrofílicas que las superficies contaminadas.⁶

Lo que un determinado líquido se extiende sobre una superficie sólida, es una propiedad que recibe el nombre de mojabilidad y la magnitud física accesible experimentalmente relacionada con la mojabilidad es el ángulo de contacto. El ángulo de contacto se determina a través de la ecuación de Young-Laplace (Ecuación II 2). En donde se relaciona con las tensiones interfaciales del sistema mojado y está definido como el ángulo que forma la tangente entre la interfaz líquido-fluido con la superficie del sólido en el punto de contacto de las tres fases, hacia el lado de la fase líquida.

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cdot \cos \theta$$

Ecuación II 2

donde: γ_s , γ_{sl} y γ_l , son las tensiones interfaciales sólido-fluido, sólido-líquido y líquido-fluido.

Condiciones de Ensayo

Las medidas de ángulo de contacto se realizaron con un sistema de video (Contact Angle System OCA15plus, Dataphysics, Alemania), a temperatura ambiente ($T=22^\circ\text{C}$) dentro de espacio con atmósfera controlada. Para la medición del ángulo de contacto, el fluido usado fue agua destilada ultra pura (MilliQ, Millipore) y la gota se depositó mediante una jeringuilla micrométrica (método de la gota de sésil), la misma fue dosificada a $1 \mu\text{l}$, con una velocidad de deposición de $1 \mu\text{l/s}$. Los ángulos de contacto estático (SCA) se determinaron semi-manualmente a partir de la imagen de la gota con una precisión de $\pm 1^\circ$, realizándose tres mediciones en cada una de las muestras, para un total de 9 mediciones por tipo de tratamiento.

Para determinar la energía superficial se empleó el software SCA20 y se calculó para cada una de las fases de funcionalización del material, se siguió el método de Owens Wendt (*Ecuación II 3*), utilizándose como líquidos agua destilada ultra pura (componente polar) y Diiodometano (componente dispersiva). La γ_s del agua es de 72,8 mN/m y del diiodometano 50,8 mN/m y las componentes polar y dispersivas son 51 mN/m y 21,8 mN/m para el agua y tendiente a 0 mN/ y 50,8 mN/m para el diiodometano

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 ((\gamma_L^d \gamma_s^d)^{1/2} + (\gamma_L^p \gamma_s^p)^{1/2}) \quad \text{Ecuación II 3}$$

II.2.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

I.2.2.1 FLUORESCENCIA DE RAYOS X (FRX)

Es una técnica cuantitativa, no destructiva, que permite identificar los elementos con número atómico superior al del oxígeno.

La FRX además de ser una técnica muy precisa, tiene como ventaja que requiere una sencilla preparación de la muestra, consistiendo en tomar un trozo del material, cortarlo de tal manera de conseguir 2 caras paralelas y realizarles un pulido especular con una rugosidad ≤ 20 nm.

Para este análisis las muestras son irradiadas con fotones de una energía comprendida normalmente entre 6 y 120 KeV, que pueden tener su origen en un tubo de rayos X, capaz de proporcionar intensidades y energías diferentes con una emisión policromática continua, o bien en la emisión espontánea de ciertos radionúclidos. La radiación al incidir sobre las muestras provoca ionizaciones en los átomos de la misma, con el consiguiente relleno de vacantes, acompañado de la emisión de rayos X fluorescentes característicos, que permiten analizar las longitudes de onda de la radiación emitida y separarlas a partir de los planos de la red de un cristal de distancia interplanar conocida. La radiación separada es capturada por un detector de rayos X y luego es enviada al sistema de registro donde se identifica el espectro correspondiente a cada elemento.⁷

Condiciones de Ensayo

Se analizaron dos muestras de la aleación de TiHfNb, realizándose en cada una de ellas tres medidas, para lo cual se utilizó un equipo Philips PW2400, en condición de 60kv de voltaje.

II.2.2.2 ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X

La espectroscopia fotoelectrónica de rayos X es actualmente la técnica analítica de superficie más ampliamente usada y la misma ha sido seleccionada como la técnica fundamental en esta tesis, por lo tanto, se describe aquí más detalladamente que las otras técnicas. Cuando la estudiaron Siegbahn y al., se le llamó ESCA (espectroscopia electrónica para análisis químico), pero actualmente el nombre ESCA se considera demasiado general ya que hay muchas espectroscopias electrónicas de superficie, y hay que dar un nombre más preciso a cada una de ellas.

Principios de Funcionamiento:

1) Es una técnica semicuantitativa, que tal como se muestra en la *Figura II 4*, permite estudiar la composición atómica de la capa superficial a profundidades entre 3 y 10 nm. El fundamento teórico del XPS se basa en que la energía de los fotones de rayos X, se invierte en vencer el potencial atómico y el exceso se suministra como energía cinética. El proceso de fotoemisión resulta ser extremadamente rápido, 10^{-16} seg, y su física básica se describe mediante la ecuación de Einstein:

$$E_B = h \cdot \nu - E_k$$

Ecuación II 4

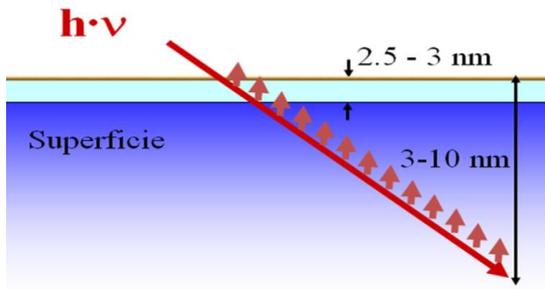


Figura II 4 Espectroscopia fotoelectrónica por rayos-X

Donde:

E_B = la energía de enlace del electrón en el átomo,

$h \cdot \nu$ = la energía de la fuente de rayos X (h =constante de plank y ν = frecuencia)

E_k = la energía cinética del electrón detectado.

La energía de enlace que se mide por XPS se asocia siempre a enlaces de tipo iónico o covalente entre átomos. Los picos obtenidos en los espectros, ponderados

con los factores de sensibilidad propios de cada átomo, se utilizan para determinar el porcentaje de la composición atómica de la superficie de los materiales.^{7,8}

A través de la medida de la energía cinética de los electrones emitidos, se puede obtener la información sobre el estado químico de la muestra, lo que conlleva a la obtención de información cualitativa y semicuantitativa de todos los elementos presentes (excepto el H y He).

$$E_k = h \cdot \nu - E_B - e\phi$$

Ecuación II 5

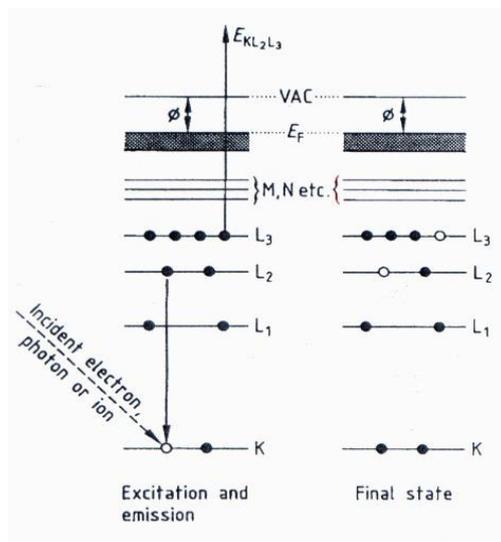


Figura II 5 Proceso Auger

Obviamente $h \cdot \nu$ debe ser mayor que E_B . El electrón emitido puede proceder de un nivel interno, o de una parte ocupada de la banda de valencia, pero en XPS la mayor atención se centra en los electrones de los niveles internos. Como no existen dos elementos que compartan el mismo conjunto de energías de ligadura electrónica, la medida de la energía cinética suministra un análisis elemental. En adición, la *Ecuación II 5* indica que cualquier cambio en las E_{Bs} se reflejará en las E_{kin} , lo que significa que cambios en el ambiente químico de un átomo pueden seguirse estudiando los cambios de las energías fotoelectrónicas, proveyendo información química. El XPS puede analizar todos los elementos de la tabla periódica con excepción del hidrógeno y del helio.

Aunque el XPS se relaciona principalmente con fotoelectrones y sus energías cinéticas, la salida de electrones por otros procesos también sucede. Un fotoelectrón emitido deja detrás de sí un hueco interno en el átomo. La secuencia de hechos que siguen a la creación del hueco interno se muestra esquemáticamente en la *Figura II 5*. En el ejemplo, el hueco se ha creado en la capa K, dando lugar a un fotoelectrón cuya energía cinética debe ser E_B , y este hueco se ocupa mediante una transición electrónica desde la capa L_2 . La energía $E_K - E_{L_2}$ asociada con la transición puede disiparse bien en forma de un fotón de rayos X característico o perdiendo un electrón de una tercera capa, que en el ejemplo es L_3 . La segunda de las posibilidades se denomina proceso Auger en honor de su descubridor. El electrón emitido resultante se le denomina electrón Auger y su energía viene dada por:

$$E_{KL_2L_3} = E_K - E_{L_2} - E^*_{L_3} \quad \text{Ecuación II 6}$$

$E^*_{L_3}$ está con un asterisco porque es la energía de ligadura del electrón en la capa L_3 en presencia de un hueco en la capa L_2 , que no es lo mismo que E_{L_3} .

La emisión de fotones de rayos X (la fluorescencia de rayos X) y la emisión de un electrón Auger son procesos que compiten entre sí, pero debido a la superficialidad de los niveles internos involucrados en los procesos XPS y Auger se favorece el proceso Auger. Así en todos los espectros fotoelectrónicos de rayos X aparecen a la vez fotoemisiones y emisiones Auger. En XPS, las señales Auger pueden ser útiles pero no son básicas para la técnica, mientras que en AES, la Ecuación 6 es la base de la técnica.

En este punto se deben explicar las nomenclaturas que se usan en XPS y en AES. En XPS se usa la notación espectroscópica, y en AES la notación de rayos X. Las dos son equivalentes, los usos diferentes proceden de razones históricas, pero es conveniente diferenciarlas. Ambas se basan en el llamado acoplamiento $j-j$ que describe el movimiento orbital de un electrón alrededor del núcleo atómico, en el cual el momento angular total de un electrón se determina sumando vectorialmente los momentos angulares y de espín de los electrones individuales. Así si l es el número cuántico del momento angular electrónico y s el número cuántico del momento de espín electrónico, el momento angular total de cada electrón viene dado por $j=l+s$. Como l puede tomar los valores $0,1,2,3,4, \dots$ y $s=\pm 1/2$, claramente $j=1/2,3/2,5/2, \dots$

Tabla II 1 Notaciones espectroscópicas y de rayos X

Números cuánticos			Estado espectroscópico	Sufijo de rayos X	Estado de rayos X
N	l	j			
1	0	1/2	1s	1	K
2	0	1/2	2s	1	L_1
2	1	1/2	$2p_{1/2}$	2	L_2
2	1	3/2	$2p_{3/2}$	3	L_3
3	0	1/2	3s	1	M_1
3	1	1/2	$3p_{1/2}$	2	M_2
3	1	3/2	$3p_{3/2}$	3	M_3
3	2	3/2	$3d_{3/2}$	4	M_4
3	2	5/2	$3d_{5/2}$	5	M_5
	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.

El número cuántico principal n puede tomar los valores $1,2,3,4, \dots$. En la notación espectroscópica, estados con $l=0,1,2,3, \dots$ se designan s, p, d, f, \dots ,

respectivamente, y la letra viene precedida por el número cuántico n ; los valores de j se añaden como sufijos y como subíndices. Así se obtienen $1s, 2s, 2p_{1/2}, 2p_{3/2}, 3s, 3p_{1/2}, 3p_{3/2}$, etc. En la notación de rayos X, los estados con $n = 0, 1, 2, 3, 4$, se designan K, L, M, N, ..., respectivamente, y los estados con varias combinaciones de $l = 0, 1, 2, 3, \dots$ y $j = 1/2, 3/2, 5/2$, se añaden como sufijos y subíndices $1, 2, 3, 4, \dots$. De esta forma se llega a K, $L_1, L_2, L_3, M_1, M_2, M_3$, etc. La equivalencia de las dos notaciones se indica en la *Tabla II 1*.

En la notación de rayos X la transición Auger que se muestra en la *Tabla II 1* y en la *Figura II 5* debe escribirse como KL_2L_3 . En este esquema de acoplamiento, seis transiciones Auger serían posibles en la serie KLL. Obviamente, otras series también son posibles (ejemplo: KLM, LMM, MNN).

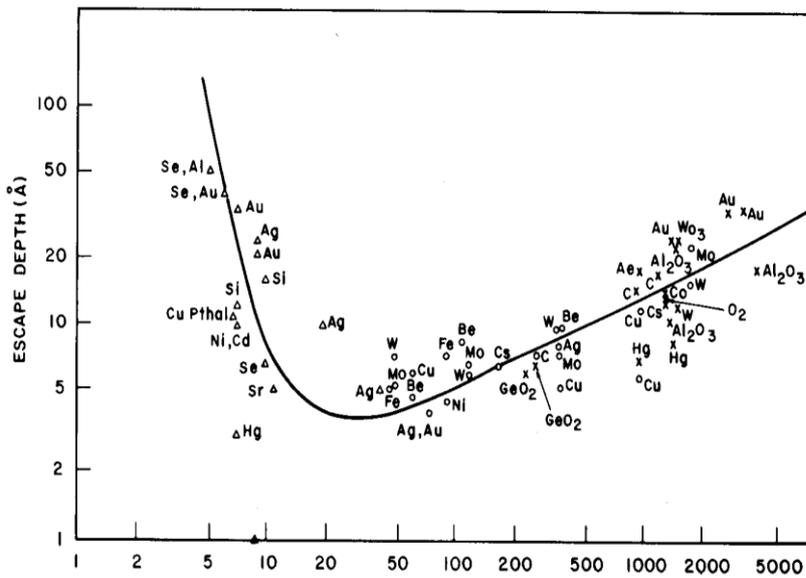


Figura II 6 Medidas del recorrido libre medio inelástico en función de la E_{κ}

A continuación se examinan las razones de por qué las técnicas de XPS y de AES son específicas de superficie. Un electrón con una energía cinética E que se mueve a través de una matriz sólida M tiene una probabilidad de viajar una cierta distancia antes de perder parte o toda su energía como resultado de un choque inelástico. Tomando como base

dicha probabilidad, la distancia promedio viajada antes de tal colisión se conoce como el recorrido libre medio inelástico ((IMFP), inelastic mean free path) $\lambda_M(E)$. El IMFP es una función sólo de M y de E . La *Figura II 6* muestra una compilación de medidas de λ hechas por Seah y Dench, en términos de capas monoatómicas en función de la energía cinética.⁹

2) Las técnicas espectroscópicas electrónicas requieren un vacío del $\approx 10^{-8}$ Pa para poder funcionar, profundidades de muestreo de unas pocas capas de átomos y con sensibilidades elementales menores de 10^{-5} átomos por capa (es decir, un átomo de un elemento particular entre 10^5 de otros átomos en una capa atómica), las técnicas son muy sensibles a la contaminación superficial, la mayoría de la cual proviene de los gases residuales en el sistema de vacío. De acuerdo con la teoría cinética de los gases, para tener el tiempo suficiente para hacer un análisis de superficie de un material cuya superficie que se ha expuesto o preparado, la presión básica debería ser de 10^{-8} Pa o menor, esto es, la región de ultra-alto vacío (UHV).

3) La consideración más importante a la hora de elegir una fuente de rayos X para XPS es la resolución de la energía. La ecuación 6 da la relación entre la energía cinética del fotoelectrón, la energía del fotón de rayos X incidente, y la energía de ligadura del electrón interno. Como la anchura de la línea de un electrón en un nivel

interno es muy pequeña, la anchura de la línea de la energía del fotoelectrón depende de la anchura de la línea de la energía de la radiación incidente. Por tanto, la anchura de la línea de la fuente incidente debe ser significativamente menor de 1.0 eV si no se quiere limitar el alcance de la técnica. La *Tabla II 2* lista las energías y las anchuras de las líneas de las líneas de rayos X características de unos cuantos materiales candidatos.

No hay muchas fuentes disponibles con la anchura de línea estrecha. Y M_{ξ} y Zr M_{ξ} podrían ser adecuadas, pero sus energías son demasiado bajas para aplicaciones generales, aunque a veces se usan para aplicaciones específicas. El silicio es un pobre conductor térmico y no es fácil como recubrimiento en un ánodo, por eso sólo Mg K_{α} y Al K_{α} son las que se usan universalmente en XPS.

Tabla II 2 Energías y anchuras de líneas de algunas líneas de rayos X de baja energía características¹⁰

Línea	Energía (eV)	Anchura (eV)
Y M_{ξ}	132.3	0.47
Zr M_{ξ}	151.4	0.77
Nb M_{ξ}	171.4	1.21
Mg K_{α}	1253.6	0.70
Al K_{α}	1486.6	0.85
Si K_{α}	1739.5	1.00
Y L_{α}	1922.6	1.50
Zr L_{α}	2042.4	1.70

Para una producción eficiente de rayos X por bombardeo electrónico, las energías de los electrones excitantes deben ser un orden de magnitud mayor que la línea de energía elegida, por eso con las fuentes de Mg y Al se emplean potenciales de aceleración de 15 kV. Las fuentes modernas se diseñan con ánodos duales, un ánodo recubierto con Mg y el otro con Al. Así es fácil pasar rápidamente de una fuente a la otra.

La radiación X de fuentes de Mg y Al es bastante compleja. Las líneas principales K_{α} son de hecho dobletes sin resolver y deberían llamarse más correctamente $K_{\alpha 1,2}$. También existen muchas líneas satélites de las cuales las más importantes desde un punto de vista práctico son las $K_{\alpha 3,4}$, que están separadas cerca de 10 eV de la línea principal y que tienen cerca de un 8% de intensidad en comparación con la de la línea principal, y la $K_{\alpha r}$ que aparece a una mayor energía, cerca de 70 eV, de la línea principal. Además, al espectro se le superpone una radiación continua de fondo que se denomina radiación Bremsstrahlung, que se origina por procesos inelásticos. La eliminación de satélites y de la radiación Bremsstrahlung, y la separación del doblete $K_{\alpha 1,2}$ puede hacerse con un monocromador. Aunque un espectro de XPS será más limpio cuando se utiliza un monocromador ya que se eliminan los satélites y la radiación de fondo, el flujo de fotones en la muestra es mucho menor que cuando se trabaja sin monocromador a la misma potencia.

5) En cuanto a la información espectral y desplazamientos químicos la *Figura II 7* muestra un amplio espectro panorámico, esto es, un espectro que se registra en un amplio rango de energías, en este caso 1100 eV. Se usó una radiación Mg K_{α} , a 1253.6 eV, y la superficie analizada corresponde a una aleación de CoCrMo. Tal espectro revela los hechos más interesantes a destacar. Pero para investigar con más detalle estos picos se requiere de la realización de espectros en unos rangos

de energía más restrictivos, que permiten una mejor resolución de la energía; este tipo de espectros se denominan de barridos estrechos o detallados, o espectros multirregión.

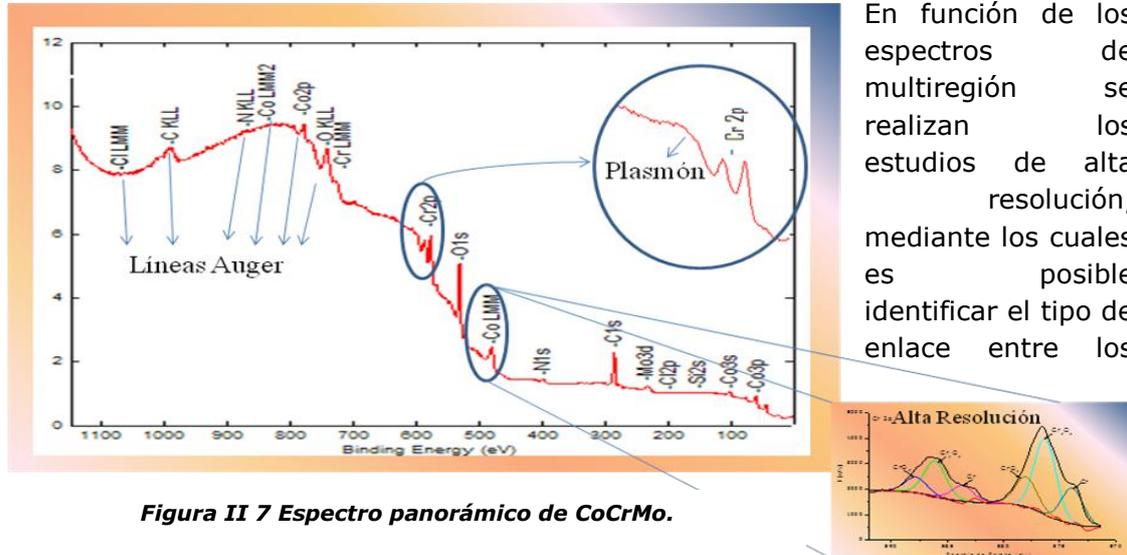


Figura II 7 Espectro panorámico de CoCrMo.

En función de los espectros de multirregión se realizan los estudios de alta resolución, mediante los cuales es posible identificar el tipo de enlace entre los

átomos y las especies químicas presentes.

Los picos más prominentes que se observan en la *Figura II 7* son picos derivados de la excitación de electrones de niveles internos de acuerdo con la Ecuación 5. Así, en la parte media del espectro se observan picos intensos, que se corresponden con Co, Cr, O y C. En la parte izquierda, en la región de alta energía cinética, hay otros picos prominentes, estos son picos Auger LMM y KLL, ya que como se indicó anteriormente, la creación de un hueco interno por cualquier medio de excitación da lugar a la emisión de un electrón Auger, por eso en los espectros de XPS la contribución de las señales Auger es muy significativa. Si los picos fotoelectrónicos y Auger se solapan en cualquier espectro, estos pueden siempre separarse cambiando la fuente de excitación (es decir, de Al K α a Mg K α , o viceversa); ya que los picos Auger son invariantes en su energía mientras que los picos fotoelectrónicos deben desplazarse con la energía de los fotones excitantes de acuerdo con la Ecuación 5. La *Figura II 7*, adicionalmente se muestran los plasmones, que pueden ser de pérdida de volumen y plasmones de superficie sucesivos asociados al pico Cr 2p. La frecuencia de oscilación, y por tanto la energía involucrada, es característica de la naturaleza del sólido y se llama la frecuencia de plasmón (o energía). El plasmón de pérdida determinado por la naturaleza tridimensional del sólido se le llama pérdida "bulk" o "de volumen", pero cuando se asocia con la naturaleza bidimensional de la superficie, se le llama pérdida de "superficie". Teóricamente, la energía de pérdida de los plasmones de superficie deberían ser $2^{1/2}$ veces menor que la energía de pérdida de plasmones bulk.

Desplazamiento químico es el nombre que se da al desplazamiento de energía observado de un pico fotoelectrónico de un elemento determinado cuando el estado químico del elemento cambia. Cuando un átomo se combina con otro átomo o grupo de átomos, ocurre una alteración en la densidad de los electrones de valencia, que puede ser positiva o negativa según pierda o gane carga, causando una alteración consecuente del potencial electrostático que afecta a los electrones internos. Por tanto, las energías de ligadura de los electrones internos cambian, dando lugar, de acuerdo con la Ecuación 6, a desplazamiento de los picos

fotoelectrónicos correspondientes. La tabulación de los desplazamientos químicos que experimenta un elemento en una serie de compuestos puros sirve para ayudar a identificar el estado químico de tal elemento durante el análisis de muestras desconocidas. La identificación del estado químico es la principal ventaja del XPS sobre otras técnicas de superficie.

Otro tipo de satélites que se pueden ver, a menudo, en los espectros de XPS es el denominado satélite "shake up". Tales satélites aparecen cuando la formación de un compuesto da lugar a la presencia de electrones desapareados en los niveles 3d o 4f; también aparecen en compuestos orgánicos dependiendo del grado de conjugación de dobles enlaces C=C, particularmente en compuestos aromáticos. En muchos casos tales estructuras de satélites pueden usarse para diagnosticar el estado de oxidación.

ARXPS (Espectroscopia de fotoelectrones de Rayos X con Ángulo Variable)

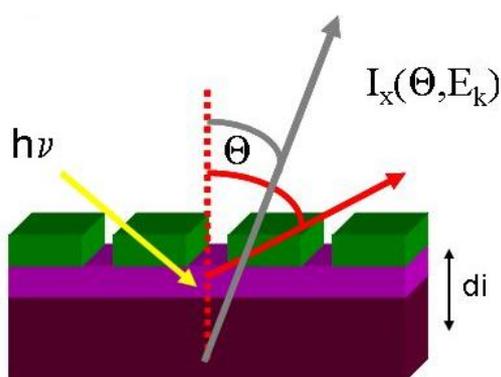


Figura II 8 ARXPS para perfiles de profundidad

Es una variante del XPS, por tanto sigue siendo una técnica no destructiva, que se trabaja en UHV y con la cual se obtienen perfiles de profundidad mediante la variación del ángulo entre el analizador y la superficie de la muestra. En este tipo de análisis se produce una relación directamente proporcional entre el ángulo y la profundidad; es decir a mayor ángulo, mayor penetración (Figura II 8).

Para un estudio con ángulo resuelto, la peor condición de funcionamiento es para los ángulos pequeños, debido a que el área de análisis es limitada por el analizador de "huella", adicionalmente en este nivel la nanorugosidad, puede alterar la información.¹¹ Ahora bien, el ángulo que refleja el mínimo error (10%), puede oscilar entre 40° y 45°.^{9,12}

Mediante la variación de ángulo de la muestra con respecto al analizador del XPS (ARXPS), se pueden determinar las concentraciones atómicas a diferentes niveles de profundidad, por ello se utilizó esta técnica con el objeto de conocer: 1) si a profundidades muy pequeñas es posible detectar los contaminantes superficiales, 2) si a profundidades lo suficientemente grandes se puede estudiar la naturaleza de la capa de óxido y 3) si a grandes profundidades, cercanas al bulk, es posible identificar mediante la alta resolución del espectro del oxígeno, los enlaces de los óxidos con los grupos hidroxilos

Condiciones de ensayo

Las medidas de XPS se realizaron con un equipo ESCA 5701 (Física Electrónica, PHI 10) equipado con un instrumento monocromático, usando una fuente de rayos X de Mg K α (E = 1253,6 eV, 300,0 W). El barrido general de los espectros se realizó con la energía de paso de 190 eV.

En todos los espectros descritos en este trabajo las energías de enlace se corrigieron por la referencia C 1s a 284,8 eV y se usó el software Multipak para calcular la composición atómica de los espectros generales y para realizar las deconvoluciones a través de las cuales se determinan las diferentes especies y las

áreas de los picos en análisis. Estos análisis tienen una precisión de $\pm 10\%$ y las energías de unión tienen un error en el intervalo de $\pm 0,1$ eV.^{8,13}

En los estudios de XPS presentados a lo largo de esta tesis, se trabajó con las muestras por triplicados, inicialmente se realizó el barrido general, realizado simplemente para corroborar que las muestras de un mismo tipo, se comportaran de manera similar, posteriormente se realizaron los estudios de alta resolución y de los espectros de multiregión se extrajo la composición química en porcentaje atómico de cada una de las muestras de estudio. Por último, en los elementos que se requiere información más específica, en cuanto a tipo de enlaces o especies químicas involucradas, se realizaron sus respectivas deconvoluciones.

II.2.2.3 ToF SIMS

La espectrometría de masa (SIMS), se aplica para medir los niveles de trazas de todos los elementos de la tabla periódica permitiendo conocer las distribuciones laterales y en profundidad de los mismos. Requiere una cámara de UHV para su análisis, sin embargo ésta provee una información única que puede ser complementaria a los resultados obtenidos por el XPS.¹⁴⁻¹⁷

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de dos moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. La técnica de detección de iones se basa en el fenómeno conocido como desbastado (*sputtering*) de partículas centradas en un blanco, que son bombardeadas por iones, átomos o moléculas. Dependiendo del intervalo de energía de la partícula primaria, ocurren colisiones elásticas e inelásticas:

- En el intervalo de los keV, las interacciones dominantes son las *elásticas*.
- Las colisiones *inelásticas* aumentan como aumenta la energía. Estas son más comunes en el intervalo de energía de los MeV.

El proceso de dispersión produce iones secundarios en el rango de las energías cinéticas traslacionales. Las distribuciones de energía son distintas para iones atómicos o moleculares. La eficiencia de ionización del SIMS es definida como la fracción de los átomos esparcidos que se vuelven ionizados. La eficiencia varía con respecto al elemento de análisis en varios órdenes de magnitud. Las influencias más obvias son el potencial de ionización y la afinidad electrónica de los iones negativos.¹⁴

La SIMS presenta tres variantes: 1) Estático donde una baja corriente de iones se utiliza para actuar sobre la superficie y liberar los iones, moléculas y agrupaciones moleculares, se aplica generalmente para el análisis de sub monocapas. 2) Dinámica una mayor corriente de iones se traduce a una tasa de pulverización más rápida y produce un rendimiento mucho mayor de los iones, con lo que crea una mejor dinámica; en esta los compuestos orgánicos son efectivamente destruidos y por tal no se obtiene información de diagnóstico sino que su análisis es cuantitativo y da información de la composición en función de la profundidad debajo de la

superficie y 3) Imaging cada pixel representa un espectro completo de masas, permite el análisis posterior a la realización de mapas y para profundizar a cerca de la composición química de la región de interés.

El método estático es llamado el ToF-SIMS, que es una de las técnicas superficiales más sensible e induce a una mínima destrucción de las superficies, en este mediante la interacción de haces de partículas generalmente de C o Ga, se bombardea la superficie para desalojar a las partículas de liberación de iones (+/-) y compuestos moleculares. Las partículas que se encuentran más próximas al lugar del impacto del haz, tienden a disociar iones, las partículas que se encuentran más alejadas o partículas secundarias tienden a ser los compuestos moleculares, comúnmente de un tamaño mucho mayor de fragmentos de macromoléculas orgánicas.

Las partículas son aceleradas en una trayectoria de vuelo en su camino hacia un detector, un espectrómetro de masas detecta los iones con un valor prefijado de la relación carga/masa (m/z), presentando las cuentas por unidad de tiempo de dichas especies. Esta técnica presenta una sensibilidad muy elevada ya que es posible medir el tiempo en una escala de nanosegundos, es posible producir una masa de resolución de 0.00X unidades de la masa atómica, es decir uno por mil la masa de un protón.

Condiciones de Ensayo

Cada estudio se hizo por triplicado para los diferentes tipos de muestras y se usó un TOF-SIMS IV (ION-TOF, Munster, Germany) a una presión de $5 \cdot 10^{-9}$ mbar, bombardeado con una fuente pulsada de iones de bismuto metálico líquido (Bi^{3+}) con 25 KeV de energía. La duración de los pulsos ha sido de 20 ns, 0.3 pA de corriente de iones pulsada para un bombardeo menor de $1 \cdot 10^{13}$ iones/cm².

Las medidas se han realizado con un tiempo de adquisición de datos de 10s y un tiempo de resolución TDC de 200 ps. La neutralización de carga se ha obtenido mediante un flujo de electrones de baja energía (20 eV). El espectro de iones secundarios se ha obtenido a partir del rastreo aleatorio de la superficie en áreas de $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$, para asegurar la homogeneidad de las lecturas. Los iones secundarios se han emitido con 2 kV de voltaje y se han post-acelerado con una energía cinética de 10 keV justo antes de alcanzar el detector. El espectro de masas se ha adquirido con el ION-TOF Ion Spec e Ion image software.

II.2.2.4 TÉCNICA DE SUSTITUCIÓN DEL COMPLEJO DE ZINC

El principio de funcionamiento de esta técnica se muestra en la *Figura II 9* y consiste en mezclar 500 ml de 4 mol/l de una solución de cloruro de amonio y 250 ml de 0.4 mol/l de solución de cloruro de zinc, ajustando el pH a 6.9 usando una solución de hidróxido de amonio al 30% vol. Seguidamente se ajusta la mezcla a 1000 ml con agua desionizada. Siguiendo la *Figura II 9 a)* La muestra metálica se coloca inmersa en la solución por 5 min, b) durante la inmersión los complejos de zinc se forman sobre la película de óxido superficial, posterior a la inmersión se lava la muestra 3 veces en agua desionizada por periodos de 10 minutos por vez, para luego secarla en un desecador durante 1 hora, c) las muestras son inmersas en 10 ml de 2.42 mol/l de ácido nítrico durante 10 min d) en este momento son liberados al medio los iones de zinc.

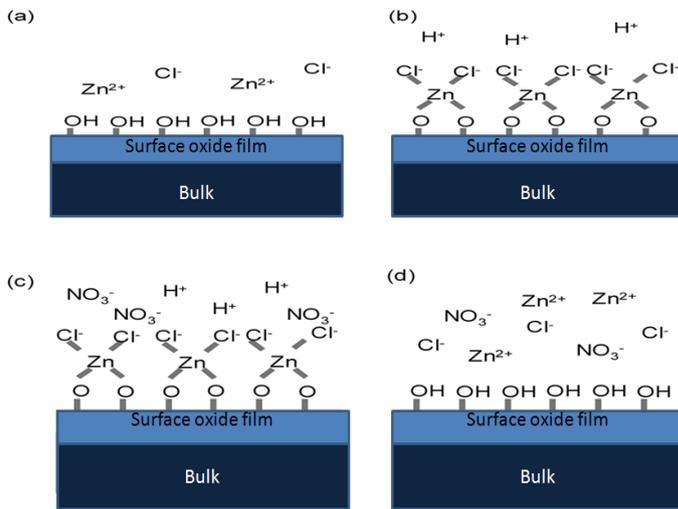


Figura II 9 Técnica de Sustitución del Complejo de Zn

desexcitación de los átomos neutros e iones en el interior de un plasma, se producen emisiones de radiación electromagnética en la zona del UV-visible. Estas radiaciones, características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda y finalmente se mide su intensidad. La selección de la longitud de onda permite determinar el metal cualitativamente, y la intensidad de la radiación emitida proporciona la información cuantitativa.

La concentración del zinc en la solución obtenida mediante ICP-OES corresponderá a la cantidad de hidroxilos activos sobre la superficie de la muestra.

Una vez obtenida la concentración de iones de zinc liberados en la solución, se calcula la cantidad de grupos hidroxilos activos por unidad de área (C_{OH} en N°/nm^2) siguiendo la ecuación II 7

$$C_{OH} = (C_{Zn} \times 10^{-6} \times V \times A \times 2) / (M \times S) \quad \text{Ecuación II 7}$$

donde:

C_{Zn} = Concentración de iones de Zinc (ppb)

V = Volumen de ácido nítrico (L)

S = Área de la superficie de la muestra (nm^2)

A = N^o de Avogadro (6.02×10^{23})

M = Peso molecular del Zinc (62,75)

Condiciones de Ensayo

Para la cuantificación de la densidad de los hidroxilos activos sobre la superficie, se analizaron por ICP-OES 10 ml de ácido nítrico que contiene el zinc enlazado a los OH⁻ de cada una las muestras.

Adicionalmente se analizó como control positivo la solución de cloruro de zinc y como control negativo la solución de ácido nítrico.

II.2.2.5 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA –VISIBLE (NANODROP)

La espectrofotometría de ultravioleta-visible es una técnica de medición de concentración de masa de elementos y compuestos (especies) químicos, cuyo principio es la interacción entre la energía electromagnética con la materia.¹⁸

En forma más específica la espectrofotometría ultravioleta -visible se fundamenta en medir la radiación monocromática absorbida por un elemento ó molécula causante de desplazamientos electrónicos a capas superiores, estas transiciones determinan la región del espectro en la que tiene lugar la absorción.

La ley fundamental en la que se basan los métodos espectrofotométricos es la de Bouguer-Beer, Lambert y Beer y establece:

a) La relación entre la intensidad de la luz transmitida o energía radiante (I) y la energía radiante incidente (I_0) es una función del espesor de la muestra (b) a través del medio adsorbente, de acuerdo a:

$$\mathbf{A = abc} \qquad \qquad \qquad \mathbf{Ecuación II 8}$$

donde:

A =absorbancia

a =absortividad

b = espesor de la muestra

c = concentración

b) La cantidad de energía electromagnética monocromática absorbida por un elemento es directamente proporcional a la concentración de las especies que adsorben y a la longitud de la trayectoria de la muestra para un conjunto de condiciones instrumentales establecidas.

Entonces:

$$\mathbf{A = \log(I_0/I)} \qquad \qquad \qquad \mathbf{Ecuación II 9}$$

$$\mathbf{T = (I/ I_0)} \qquad \qquad \qquad \mathbf{Ecuación II 10}$$

donde:

T = transmitancia, por tanto:

$$\mathbf{A = -\log (T)} \qquad \qquad \qquad \mathbf{Ecuación II 11}$$

La proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración únicamente se cumple a concentraciones bajas. En la deducción de la ley de Lambert-Beer no se ha considerado que la absortividad varía con el índice de refracción, que a su vez depende de la concentración. En la práctica, para concentraciones inferiores a 10^{-3} M el índice de refracción es esencialmente constante

Condiciones de Ensayo

El equipo utilizado para realizar el espectro de absorción, es el espectrofotómetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 de Thermo Fisher Scientific. Los componentes básicos son: una fuente de radiación xenón, un sistema que permite seleccionar una banda estrecha de longitudes de onda, una gota de 2µl al final de la fibra óptica un detector, y un sistema de tratamiento y lectura de la señal.

Para el análisis de un analito individual se comenzó por el establecimiento de una curva de calibrado a partir de disoluciones de concentraciones conocidas, sometidas al mismo tratamiento que la muestra. Esta curva, fue ajustada a una línea recta para disoluciones diluidas, permitiendo deducir la concentración.

II.2.2.6 ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA (FLUORIMETRÍA)

La fluorimetría o espectrofotometría de fluorescencia; es un tipo de espectroscopia electromagnética, que analiza la fluorescencia de una muestra. Esto involucra el uso de un haz de luz comúnmente de ultravioleta, que excita a los electrones en las moléculas de ciertos componentes y causa la emisión de luz; típicamente, pero no necesariamente, luz visible. Su técnica complementaria es el espectro de absorción

Esta técnica utiliza como instrumento de medición el fluorímetro, el cual consta de una fuente de luz y de un sistema de selección de longitud de onda de excitación. Cuando la muestra es excitada con radiación de energía apropiada emite radiación en todas las direcciones del espacio. No obstante la luz emitida se detecta mejor en ángulo recto con respecto al haz de excitación ya que se evitan problemas de dispersión de la luz y también el haz de luz excitante que es de mucha mayor intensidad que el haz de luz emitida. La luz emitida es recogida seleccionando una longitud de onda apropiada y conducida a un detector donde queda registrada por sistemas similares a los de un espectrofotómetro de absorción.

Condiciones de Ensayo

Se tomaron triplicados de 50 µl de cada tipo de muestra, teniendo en cuenta la esta será una medición indirecta donde la fluorescencia emitida se correlaciona con la densidad de péptido que NO fue adherida a la muestra. Para la medición de la fluorescencia se utilizó un equipo de Multi Detection Microplate Reader FI x800 de BioTek, y para la adquisición y manejo de datos se usó el BioTek's Gen 5 Software. La longitud de excitación de onda de excitación fue 490nm y de emisión 520nm.

II.2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR

II.2.3.1 INMUNOFUORESCENCIA

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación a una longitud de onda característica permitiendo su cuantificación. Las moléculas de un colorante fluorescente adsorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) en luz de menor energía (longitud de onda más larga)

Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característico; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos o más características al mismo tiempo (fluorescencia de dos o más colores). La Inmunofluorescencia se utiliza esencialmente en la detección de autoanticuerpos y anticuerpos contra antígenos de superficie de células y tejidos. Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes.

Condiciones de Ensayo

En este proyecto se utilizó para la tinción de los núcleos, DAPI (azul) se prepararon las muestras por triplicados y el conteo de la cantidad de células sobre cada muestra se hizo con, mediante la adquisición de las imágenes en un microscopio de fluorescencia y mediante el software Image J se tomaron aleatoriamente al menos 4 fotos de cada imagen.

II.2.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Esta técnica proporciona una resolución de pocos nanómetros y puede operar con magnificaciones desde 10 a 1.000.000 de veces. Produce información con respecto a la topografía y composición química de una superficie.

Utiliza fuente de electrones, con un spot size de ≈ 5 nm, con energía de pocas centenas de eV hasta 30 keV. Los electrones penetran en la superficie de la muestra e interactúan con ella, dando como resultado la emisión de electrones y fotones de la muestra y la imagen de SEM es producida por la colección de los electrones secundarios emitidos. El haz de electrones forma una línea que barre la muestra con alta velocidad, con diámetro de 5-10 nm (cañón termoiónico) o 0,5-2 nm (emisión de campo).

Las imágenes pueden ser tomadas en diferentes modos: electrones secundarios, electrones retro dispersados (backscattering) y mapeamiento de elementos por rayos-X. Los Electrones secundarios son producidos cuando un electrón incidente tiene energía suficiente para arrancar un electrón de las capas internas del átomo de la muestra y un electrón de una capa superior decae emitiendo un electrón secundario. Un mismo electrón incidente puede producir varios electrones secundarios. La producción de los electrones secundarios está relacionada con la topografía de la muestra, debido su baja energía, 5 eV, siendo que solamente los electrones secundarios próximos a la superficie (< 10 nm) pueden salir de la muestra y ser colectados

Electrones retro dispersados son producidos cuando el electrón incidente interactúa con el núcleo de un átomo de la muestra y es entonces retro dispersado. La producción de electrones retro dispersados varía directamente con el número atómico de la muestra. Los elementos de mayor número atómico aparecen más brillantes que los elementos de menor número atómico, permitiendo así diferenciar partes de la muestra con diferentes números atómicos promedios.¹⁹

Condiciones de Ensayo

Esta técnica se utilizó para evaluar el proceso de adhesión celular. Se prepararon las muestras por triplicado y las células adheridas, fueron fijadas y deshidratadas antes de su análisis. Se uso un equipo de SEM marca JEOL, modelo JSM 6400, equipado con un espectrómetro de energía dispersa de rayos X, OXFORD, posteriormente mediante el Software Image J, se estimó el área de cada una de las células.

II.2.3.3 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Es una medida de detección bioquímica de la Lactato Deshidrogenasa (LDH), que es una enzima presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y que se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o moribundas que se han visto afectadas por un agente de lisado. El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas. El Kit de LDH proporciona un método colorimétrico que permite la medición de la actividad de la LDH utilizando un cocktail de reactivos que contiene lactato, NAD⁺, diaphrose e INT. La enzima LDH, cataliza la reducción de NAD⁺ a NADH en presencia de L-lactato, mientras que la formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolium INT se

reduce hasta un producto de formazan rojo. La cantidad e intensidad de color debido al formazan solubilizado puede medirse espectrofotométricamente a 490 nm.²⁰

Condiciones de Ensayo

Mediante esta técnica, se hicieron medidas de proliferación, mediante la elaboración de una recta patrón de concentración celular vs intensidad de color. Se utilizó el Kit LDH de Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) que emplea lactato de sodio y de INT como colorante de indicador de NADH generado a partir de la catálisis LDH y se hizo la medición de absorbancia a una longitud de onda de 492nm.

II.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las técnicas iniciales del análisis de varianza fueron desarrolladas por el estadístico R.A. Fisher en los años 1920 y 1930 y es algunas veces conocido como "Anova de Fisher" o "análisis de varianza de Fisher", debido al uso de la distribución F de Fisher como parte del contraste de hipótesis.

Para esta tesis se ha realizado un análisis de varianza (ANOVA, **AN**alysis **O**f **VA**riance, según terminología inglesa) que es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables.

Se han realizado comparaciones estadísticas con niveles significativos del 5% o inferiores, en particular los datos de cada grupo fueron promediados y comparados utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) de mediciones repetidas y un *post hoc* empleando el test de Tukey para la comparación de los factores que resultasen significativos entre los diferentes grupos de resultados.

II.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Jones, F. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surface Science Reports* **42**, 75-205 (2001).
2. Ratner, B. D. Chapter 8 Characterization of biomaterial surfaces. Cardiovascular Pathology. *Elsevier Inc.* **2**, 87-100 (2004).
3. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, J. E. L. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. (London, 2004).
4. ISO 4287:1997 Geometrical Product Specifications (GPS) - Surface texture: Profile method - Terms, definitions and surface texture parameters. *International Organization for Standardization* 23 (1997).
5. Lobo, A. O. *et al.* Fast Functionalization of Vertically Aligned Multiwalled Carbon Nanotubes Using Oxygen Plasma. *Materials Letters* **70**, 89-93 (2012).
6. Zhao, G. *et al.* High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of biomedical materials research. Part A* **74**, 49-58 (2005).
7. Skoog, D. A. & Leary, J. J. *Análisis Instrumental*.
8. D. Briggs and M.P. Seah, J. W. and S. *Practical Surface Analysis by Auger and Photoelectron Spectroscopy*. 533 (1983).
9. Jeurgens, L. Angle-Resolved XPS and in - situ Ellipsometry Analysis of Oxide Films and Their Interfaces. *Advanced Materials* (2005).
10. John F. Moulder, William F. Stickle, Peter E. Sobol, K. D. B. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. (1992).
11. Cumpson, P. Angle-resolved XPS and AES: Depth-resolution Limits and a General Comparison of Properties of Depth-profile Reconstruction Methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **73**, 25-52 (1995).
12. Gunter, P. Surface Roughness Effects in Quantitative XPS: Magic Angle for Determining Overlayer Thickness. *Applied Surface Science* **115**, 342-346 (1997).
13. Briggs, D. *et al.* *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. Surface and Interface Analysis* **3**, (Perkin-Elmer Corp., Physical Electronics Division, Eden Prairie: Minnesota, 1979).
14. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. & Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, J. E. L. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 851 (British Library Cataloguing in Publication Data: Oxford, U.K, 2004).
15. Pérez del Pino, Á. Coloración del Titanio Mediante el Tratamiento Superficial de Oxidación por Láser. 35-54 (2003).
16. De, D., Aplicada, S. & Av, N. Espectrometría de Masas de Iones Secundarios: Aportaciones a la Técnica y Caracterización de Capas Finas de a-C□: H y de a-Si□: H. (1993).
17. Jacek, G. *New Trends and Potentialities of ToF-Sims in Surface Studies*. (Nova Science Publisher: New York, 2007).
18. Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer. (2008).
19. Criado, D. & Materiales, Q. D. Técnicas de caracterización y aplicaciones.

20. Cytotoxy Detection Kit Plus (LDH). *Roche* (2006).at <www.roche-applied-science.com>

CAPÍTULO III.

Caracterización Físico-Química de las Superficies de CoCr Activadas.

<i>CAPÍTULO III.</i>	75
<i>Caracterización Físico-Química de las Superficies de CoCr Activadas.</i>	75
III.1 INTRODUCCIÓN.	79
III.1.1 PLASMA CLEANING	79
III.1.2 ATAQUE QUÍMICO	80
III.2 OBJETIVOS.....	81
III.2.1 OBJETIVO GENERAL.	81
III.2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.....	81
III.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
III.3.1 MATERIALES.....	82
III.3.2 MÉTODOS.....	82
III.3.2.1 PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE.....	83
III.3.2.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.	83
III.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	84
III.4.1. CARACTERIZACIÓN DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN DE UNA MUESTRA SIN TRATAMIENTO.....	84
III.4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIMPIEZA.	87
III.4.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE GRUPOS HIDROXILOS EN SUPERFICIE.....	93
III.4.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CAPA DE ÓXIDOS SUPERFICIALES.	96
III.4.5 ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE LA ACTIVACIÓN SUPERFICIAL A TRAVÉS DE UN PÉPTIDO FLUORESCENTE.	99
III.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	102
III.6 BIBLIOGRAFÍA	104

Índice de Tablas del Capítulo III

Tabla III 1 Composición Química de la Aleación de CoCr (% peso).82

Tabla III 2 Composición Química de la Superficie de CoCr por ARXPS (% atómico)
.....85

Tabla III 3 Rugosidad de la Aleación de CoCr88

Tabla III 4 Valores de la Medición Estática de Ángulo de Contacto89

Tabla III 5 Composición Química en Porcentaje Atómico de las Superficies de CoCr Activadas (XPS)......91

Tabla III 6 Composición Química en Porcentaje Atómico de las Especies de C 1s por XPS92

*Tabla III 7 Especies de Oxígeno Determinadas por Alta Resolución mediante XPS.*95

Tabla III 8 Parámetros para la deconvolución de los elementos metálicos mayoritarios de la aleación de CoCr por XPS96

Tabla III 9 Composición Química de la Capa de Óxido de la Aleación de CoCr por XPS.97

Tabla III 10 Intensidades de los Fragmentos de Moléculas del Espectro Positivo de ToF SIMS......98

Índice de Figuras del Capítulo III

Figura III 1 ARXPS CoCr......85

Figura III 2 Concentración Atómica de los Grupos Hidroxilos y de los Óxidos Metálicos por ARXPS86

Figura III 3 Medida de Ángulo de Contacto y Energía Superficial......89

Figura III 4 Barrido Panorámico mediante XPS de CoCr Activado.90

Figura III 5 Espectro de C1s para las diferentes muestras de CoCr Activadas.91

Figura III 6 Alta resolución del Espectro de C 1s mediante XPS.92

Figura III 7 Superposición de los Espectros de O1s para las Muestras de CoCr Activadas94

Figura III 8 Alta Resolución de los Espectros de O 1s de las Muestras de CoCr Activadas94

Figura III 9 Concentración Normalizada de los Grupos de OH-act sobre la Superficie de CoCr.95

Figura III 11 Deconvolución de los Espectros de Cr 2p.97

Figura III 10 Deconvolución de los Espectros de Co 2p97

Figura III 12 Espectro Positivo de ToF SIMS de las Muestras de CoCr.98

Figura III 13 Imágenes de Fluorescencia para la Estabilidad del Pasivado 100

Figura III 14 Estabilidad de la Activación Superficial......101

III.1 INTRODUCCIÓN.

Como se ha mencionado en el estado del arte, el proceso de biofuncionalización empleado para el desarrollo de esta tesis, involucra tres etapas:

- Limpieza y Activación de la Superficie.
- Silanización.
- Inmovilización de Biomoléculas.

A lo largo de este capítulo se desarrollará la caracterización y optimización de la fase de limpieza y activación, la cual tiene como meta remover los contaminantes provenientes del contacto de las superficies con la atmósfera y simultáneamente, se busca generar superficies altamente reactivas.

Dentro de los diferentes métodos de limpieza y activación se usarán:

- Plasma Cleaning.
- Ataque químico, con ácido nítrico.

III.1.1 PLASMA CLEANING

Consiste en la eliminación de impurezas y contaminantes de la superficie, mediante el uso del plasma de energía creado a partir de gases como el argón y el oxígeno, así como de mezclas de aire, hidrógeno y nitrógeno.

El plasma se crea mediante el uso de voltajes de alta frecuencia (de 8 a 12 MHz.) para ionizar el gas que se encuentra a baja presión (normalmente en torno a la presión atmosférica 1/1.000). Si la superficie a limpiar está compuesta por materiales fácilmente oxidables, se usan gases inertes, y el plasma activará los átomos e iones capaces de romper los contaminantes orgánicos, que serán otra vez evaporados y evacuados de la cámara durante el proceso. La mayoría de estos subproductos son pequeñas cantidades de gases inofensivos como el dióxido de carbono y vapor de agua con pequeñas cantidades de monóxido de carbono y otros hidrocarburos. El tipo de interacción entre el plasma y la superficie de la muestra depende de parámetros como son la intensidad y la frecuencia usada para excitar el plasma, el tipo de gas ionizado, la presión y la velocidad del flujo de gas, el tipo de muestra y el tiempo de exposición.

La ventaja que tiene el tratamiento con plasma es que solo modifica una capa muy superficial, en el orden de pocos nanómetros, siendo la misma una modificación uniforme, que deja invariables las propiedades del bulk.¹

En este estudio el gas a ionizar utilizado será el oxígeno el cual posee la capacidad de eliminar la contaminación, formando dióxido de carbono, oxidando y activando la superficie, con la introducción de grupos hidroxilos. La luz ultravioleta generada en el plasma de oxígeno (PO), es muy eficaz en la ruptura de la mayoría de los enlaces orgánicos de los contaminantes de la superficie (CH, CC, C=C, CO y CN).² Las especies de oxígeno creadas en el plasma (O_2^+ , O_2 , O_3 , O , O^+ , O^-) reaccionan con los contaminantes orgánicos, formando H_2O , CO , CO_2 .²⁻⁴ Estos compuestos tienen presiones de vapor relativamente altas y son evacuados y eliminados de la cámara durante el proceso.

III.1.2 ATAQUE QUÍMICO

Por la referencia bibliográfica, el proceso de limpieza y activación de la aleación de CoCr puede realizarse con ácido nítrico,^{5,6} que es un ácido poderosamente oxidante y ha sido reportado que reacciona con muchos materiales orgánicos oxidantes y sus estados de oxidación más altos, donde la superficie de los óxidos reacciona fácilmente con la humedad del ambiente y con ello se forman grupos hidroxilos sobre la superficie.⁷

Paralelamente se tiene que la pasivación de las aleaciones de CoCr para implantes médicos, al igual que en la industria de los aceros inoxidable en la industria este proceso se hace con ácido nítrico o cítrico. Este tratamiento ha sido aprobado por la ASTM F86^{5,6,8} y la bibliografía revela que estos ataques químicos tienden a formar una superficie resistente a la corrosión mejorando el contenido de oxígeno y cromo en superficie para reducir la corrosión, mediante la formación de una película fina y transparente de óxido de cromo. Esta capa se considera que es la que imparte resistencia a la corrosión a los materiales de los implantes de CoCr.⁹⁻¹¹

La resistencia a la corrosión de las aleaciones que contienen cromo, es debida a la existencia de una capa natural de óxido metálico sobre la superficie de la aleación. Los componentes principales de esta capa de óxido son el óxido de cobalto y el óxido de cromo, mayoritariamente en su forma de Cr_2O_3 ,¹⁰ lo cual es útil en el caso de aplicaciones en implantes, debido a que el óxido de cromo es más resistente a la lixiviación por fluidos corporales que el óxido de cobalto y adicionalmente la resistencia a la corrosión de la aleación depende de la continuidad, el grosor y el contenido de este óxido.¹¹

Ahora bien, caracterizar las modificaciones superficiales y determinar cómo las mismas afectan la activación de las superficies, no es un proceso sencillo, ya que se deben estudiar contaminantes de muy bajo peso molecular y que constituyen una capa de orden nanométrico; por ello se realizó un exhaustiva búsqueda bibliográfica y aun cuando existen numerosas técnicas de caracterización superficial, se seleccionaron las que tenían una alta sensibilidad para realizar mediciones a nivel de nanómetros y que al mismo tiempo eran de fácil acceso al grupo de investigación.

III.2 OBJETIVOS.

III.2.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el proceso de activación superficial para la aleación de CoCr ASTM F1537 utilizada en aplicaciones óseas, seleccionando el mejor tratamiento en términos de introducción de grupos activos en superficie (grupos hidroxilos), grado de limpieza superficial y composición química de la capa de óxidos superficial.

En este estudio se evaluarán procesos tales como el ataque químico mediante ácido nítrico y el tratamiento de plasma de oxígeno, a través de técnicas de caracterización tanto físicas como químicas, de las capas entre 0 nm y 10 nm.

III.2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.

Determinación del grado de limpieza obtenido en cada proceso de activación.

La presencia de contaminantes en superficie puede reducir o enmascarar los grupos activos en superficie y por tanto, aquellos procesos de activación que limpien de una forma eficaz serán los que producirán unos mejores resultados. Para llevar a cabo este objetivo se procedió a:

- La búsqueda de técnicas de caracterización superficial que permitan identificar la presencia de contaminantes en superficie.
- La caracterización físico-química y la cuantificación del grado de contaminantes antes y después del proceso de activación.

Determinación de la densidad de grupos activos (grupos OH⁻) introducidos en la superficie metálica en cada proceso de activación.

Los procesos de activación que introduzcan un mayor relación OH⁻/óxido serán los que producirán los mejores resultados en el proceso de silanización posterior. A priori, a aquella superficie que presente una mayor densidad de grupos hidroxilos activos (OH-act) se unirá una mayor cantidad de organosilanos.

Caracterización química de la capa de óxidos superficial antes y después del proceso de activación.

Es importante conocer si los procesos de activación utilizados pueden afectar a la capa de óxidos superficial. La modificación de esta capa protectora tanto en términos de composición química y/o espesor podrá afectar de una forma notable a las propiedades como la resistencia a la corrosión, liberación de iones o citotoxicidad.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS.

III.3.1 MATERIALES.

En todos los ensayos efectuados, se utilizaron triplicados de cada una de las muestras descritas a continuación. Se utilizó una aleación de CoCr comercial aprobada por la ASTM F1537, para aplicaciones biomédicas (Zapp Medical Alloys GmbH) con las siguientes características:

Las muestras de CoCr analizadas en este capítulo fueron:

- | | |
|---|------|
| 1. Aleación de CoCr sin tratamiento | CoCr |
| 2. Aleación de CoCr con Plasma de Oxígeno | CoPO |
| 3. Aleación de CoCr con Ácido Nítrico | CoAN |

Tabla III 1 Composición Química de la Aleación de CoCr (% peso).

C	Co	Cr	Mo	N	Fe	S	Ni	Mn	P	Si
0.042	65.90	27.36	5.17	0.193	0.25	0.0003	0.17	0.47	0.004	0.38

Preparación de las muestras.

La preparación de las muestras consistió en cortar de una barra de CoCr de 12 mm de diámetro, discos de 2 mm de espesor. Posteriormente fueron sometidos a un proceso de pulido especular, para lo cual fue necesario desbastarlas con papel de SiC desde P240 hasta P1200. Seguidamente se pulieron con papel de SiC P2500 y P4000 y se les dio un acabado tipo espejo con un paño de terciopelo y una solución de alfa alúmina de 1 y 0.5 μm .

Para eliminar las impurezas provenientes del desbastado, el pulido y los solventes orgánicos e inorgánicos presentes sobre la capa superficial de las muestras, las mismas se colocaron en un baño de ultrasonido por cinco minutos para cada uno de los diferentes disolventes: ciclohexano, isopropanol, etanol, agua y acetona. Finalmente fueron secadas con aire a presión (ASTM 86).^{5,6}

III.3.2 MÉTODOS.

Para determinar los parámetros de medición, al tratarse de una investigación de tipo experimental, se determinaron las variables del proceso, considerándose como:

Variable independiente: los tratamientos usados (Plasma de oxígeno y ataque químico).

Variable dependiente: la activación de las superficies, la cual es evaluada en términos de mojabilidad, energía superficial, densidad de los grupos funcionales reactivos sobre la superficie y modificación de la composición química de la superficie.

Adicionalmente se consideró como variable interviniente la rugosidad; ya que si los tratamientos de modificación superficial alteran la rugosidad de la superficie, ésta podría ser otro factor influyente en la activación superficial.

III.3.2.1 PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE.

Para la limpieza y activación de las superficies, como se ha descrito anteriormente se utilizarán dos mecanismos diferentes 1) plasma de oxígeno^{1,4,12-15} y 2) ataque químico usando ácido nítrico.^{5,6,9-11}

Plasma de Oxígeno.

Se usó un equipo de Plasma Cleaning (Harrick Scientific Corporation, modelo PDC-002). Se introdujeron las muestras en la cámara y luego de la purga de oxígeno y alto vacío (3 veces), las muestras fueron expuestas a una radiación de baja frecuencia electromagnética (entre 8 y 12 MHz) a razón de 30 segundos por cada muestra.

Ácido Nítrico.

Se colocaron los discos de CoCr en un vaso de precipitados y se añadió ácido nítrico a 65% hasta cubrirlos completamente, el recipiente se tapó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante una hora bajo la campana. Después se limpiaron los discos de la siguiente manera:

- 3 lavados con agua destilada.
- 3 lavados con etanol.
- 3 lavados con acetona.

Finalmente se secaron con N₂.

III.3.2.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.

Para la evaluación física de las superficies, se cuenta con diversas técnicas entre las cuales se usaron:

- El ángulo de contacto, para evaluar la mojabilidad y la energía superficial, por ser una técnica cualitativa sencilla, que de forma rápida y sencilla, determina si se han efectuado cambios sobre la muestra.
- La interferometría de luz blanca, para la rugosidad ya que es una técnica de fácil manejo que permite cuantificar rugosidades a nivel nanométrico.

Para el análisis químico elemental se usaron técnicas de caracterización en el rango de 0-10 nm, entre ellas se seleccionaron:

- ToF SIMS: debido a que es una técnica de caracterización en estado sólido que permite detectar la presencia de fragmentos de las moléculas a profundidades entre 0-5nm, y hace posible detectar fragmentos de moléculas que conforman la estructura química básica de la contaminación de la capa superficial.¹⁶
- XPS: porque realiza un análisis a profundidades entre 3-10nm, que mediante un barrido general arroja la composición química en porcentaje atómico de la capa superficial, de una manera lo suficientemente sensible como para identificar y cuantificar el grado de contaminación a través de la detección del carbono y del oxígeno; a su vez con un estudio de alta resolución es posible determinar estados de oxidación, electronegatividad de los ligandos y tipos de enlaces.

- ARXPS, es una variante del XPS, que mediante la modificación del ángulo de incidencia, se incrementa la sensibilidad de la técnica y se obtiene información a diferentes profundidades.

- Técnica de Sustitución del Complejo de Zinc: siendo considerada en esta tesis una técnica complementaria, ayuda a determinar de manera indirecta la densidad de los grupos OH⁻ activos sobre la superficie, arrojando información acerca del proceso de activación superficial.

A lo largo del capítulo II se detallaron las condiciones de ensayo para cada una de las técnicas utilizadas en la caracterización físico-química de las aleaciones estudiadas. Y a continuación se discutirán los resultados obtenidos experimentalmente y el fundamento bibliográfico en el cual se apoyan cada uno de ellos.

III.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

III.4.1. CARACTERIZACIÓN DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN DE UNA MUESTRA SIN TRATAMIENTO.

Previamente a la caracterización del proceso de activación, es necesario conocer cuál es el punto de partida; es decir, las características que poseen las muestras antes de ser tratadas, y con ello observar la contaminación superficial.

Según Mani et al., quienes trabajaron sobre una aleación de CoCrWNi, la adsorción de hidrocarburos contaminantes sobre la superficie de los metales, se efectúa al dejarse el material pocos segundos en contacto atmosférico.¹⁷ También otros autores confirman que las superficies en contacto con el aire son susceptibles de contaminación por los compuestos existentes en la atmósfera (hidrocarburos, CO o CO₂) y si no se eliminan puede afectar a la eficacia de los posteriores pasos de la modificación superficial.¹⁷⁻²⁰ Por tal razón, es importante encontrar técnicas de análisis químico para evaluar la naturaleza de la composición química superficial y métodos adecuados para eliminar eficazmente tales impurezas.

Ahora bien, se sabe que los equipos de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X están optimizados a 45°. No obstante a lo largo de esta tesis se desea estudiar capas muy superficiales y dentro de las misma se requiere evaluar varios parámetros, entre ellos el porcentaje de carbono proveniente de la contaminación, lo tipos de enlace (OH⁻, O²⁻, Si-O-metal, entre otros) y la naturaleza de la capa de óxidos. Por tal motivo se considero viable realizar un estudio de ángulo variable (ARXPS), por medio del cual se aumenta la sensibilidad de la técnica y permitirá definir el ángulo de incidencia óptimo para los estudios.

Una vez realizado este estudio se tiene que con la espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X, a diferentes ángulos de incidencia (ARXPS) se determinó la naturaleza de la contaminación y se cuantificó el porcentaje atómico de los contaminantes a diferentes niveles de la capa superficial del material.(Figura III 1)

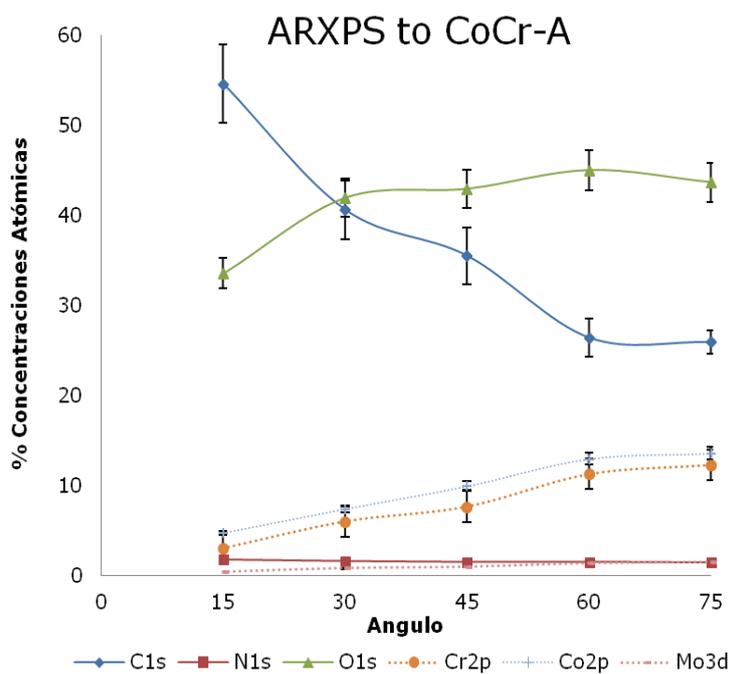


Figura III 1 ARXPS CoCr

Al mismo tiempo, este estudio permitió definir ¿cuál es el nivel de penetración óptimo para realizar las mediciones? Ya que se desea tener una fracción de la capa superficial en la cual puedan ser detectados, tanto los componentes superficiales provenientes de la contaminación, la naturaleza de los enlaces, los elementos que conforman la capa de óxido más cercana al bulk, además de determinar si la rugosidad afecta las mediciones a niveles muy superficiales.

El registro de espectros a diferentes ángulos que se muestra en la *Figura III 1*, permitió obtener información de modo no destructivo, de capas situadas entre la parte más externa de la superficie a 15° (hasta 3 nm) y las que se encuentran a mayores profundidades a 75° (hasta 10 nm). De allí, que con esta técnica se consiguió aumentar la sensibilidad y ver a ángulos muy pequeños, elementos contaminantes de muy bajo peso molecular presentes en la capa más superficial, viéndose esta contaminación reflejada mayoritariamente en las concentraciones de carbono y oxígeno.

Tabla III 2 Composición Química de la Superficie de CoCr por ARXPS (% atómico)

Ángulo	C 1s	N 1s	O 1s	Si 2s	Cr 2p	Co 2p	Mo 3d
15°	55	2	34	1	3	5	0
30°	40	2	42	1	6	7	1
45°	35	2	43	0	8	10	1
60°	26	2	45	1	11	13	1
75°	26	1	44	1	12	14	1

En la *Figura III 1* y en la *Tabla III 2* se muestra el análisis químico a través del ARXPS de una muestra de CoCr limpia tal cual como se describió en el apartado III.3.1, en la preparación de muestras. En ellos se observa la presencia de un elevado porcentaje de carbono y trazas de nitrógeno, silicio y azufre, confirmando con ello la existencia de la contaminación superficial a pesar del proceso inicial de limpieza con ciclohexano, isopropanol, etanol, agua y acetona.^{17,19,21}

Los datos en porcentaje atómico de este estudio (*Tabla III 2*), exhiben contaminantes a profundidades lo suficientemente pequeñas (15°), donde se puede notar que el 55% de la composición atómica corresponde al carbono (C 1s) y al ir aumentando los ángulos de incidencia este elemento va disminuyendo, mostrando diferencias significativas en cada uno de los niveles de profundidad estudiados.

En función de lo anterior se puede afirmar que el ARXPS es una técnica adecuada para la caracterización química de la capa de contaminación de las muestras, ya que es lo suficientemente sensible y superficial para detectar la presencia de carbono y oxígeno a niveles superficiales.

El alto contenido de C en la capa más externa imposibilita el estudio a este nivel de otros elementos ya que los enmascara, por tanto un estudio a 15° solo permite determinar la presencia de contaminación sobre la muestra, sin poder analizar a profundidad otros factores de la activación superficial como lo son la presencia de grupos hidroxilos enlazados al metal, la detección de óxidos y en el caso del estudio de las capas silanizadas los enlaces metal-O-Si. Adicionalmente ha sido reportado que para pequeños ángulos, la rugosidad y la morfología de la muestra pueden afectar a la fiabilidad de los resultados.^{22,23}

Con respecto a la evaluación del oxígeno, se tiene que para ángulos entre 30° y 75°, su concentración es prácticamente constante con valores entre 42% y 45%, teniendo en cuenta que al incrementarse la penetración se tiene mayor información del bulk. Este oxígeno puede estar enlazado, formando diferentes especies que pueden ser determinadas mediante un estudio de alta resolución y que podrán indicar la presencia de grupos de hidroxilos y de óxidos metálicos. Por tanto, a este nivel se podrían determinar los enlaces metal-OH y Si-O-metal en las muestras silanizadas.

En función de los elementos metálicos, los resultados confirman que a mayores ángulos de incidencia se consigue una mayor penetración, y esto se ve reflejado ya que a los 60° y 75° aumenta significativamente la concentración atómica Cr 2p y Co 2p, lo cual sugiere que a esta penetración la mayor parte analizada corresponde a la capa elementos metálicos y sus correspondientes óxidos.

Por otra parte, para un eficiente proceso de modificación superficial, existen autores que han reportado que se requiere del incremento de la relación que existe entre los grupos hidroxilos de la superficie activada y los óxidos metálicos ($\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$), ya que esto indica que ha ocurrido un incremento en los OH^- y un decrecimiento de los O^{2-} .²⁴⁻²⁶

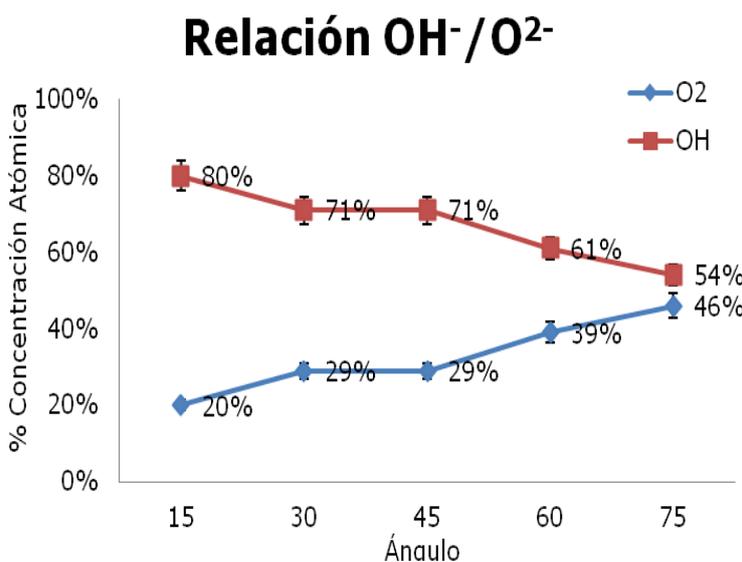


Figura III 2 Concentración Atómica de los Grupos Hidroxilos y de los Óxidos Metálicos por ARXPS

Con el fin de determinar el ángulo que permita medir tanto la contaminación, caracterizar el proceso de activación en función de la relación $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$ y determinar los enlaces típicos del proceso de silanización, se realizó la alta resolución del espectro del O 1s para cada uno de los ángulos de incidencia. Esto permitió conocer la concentración atómica de las especies de hidroxilos

y óxidos para con ello determinar la profundidad óptima de medición.

Tal cual como se muestra en la *Figura III 2* y como era de esperarse, a priori se puede ver que los grupos hidroxilos predominaron en la capa más superficial y los óxidos en la capa más cercana del bulk, sin embargo, debe recordarse que en la capa externa la información del O 1s y de los enlaces con los metales se ve enmascarada por la contaminación del carbono. Además la rugosidad puede afectar la fiabilidad de la medición. Por tanto, si excluyen los 15°, se tiene que la mejor relación $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$ se da entre 30° y 45° grados, ya que es allí donde se tiene la mayor concentración del OH^- y los más bajos porcentajes de O^{2-} .

Entre 30° y 45° se seleccionó el nivel de mayor penetración (45°), ya que al estar más cerca del bulk, es idóneo para estudiar los compuestos metálicos, la capa de óxidos y los grupos hidroxilos que se forman mediante la activación superficial y posteriormente será útil para la determinación de los enlaces Si-O-metal.

Adicionalmente, como se ha comentado al inicio de este apartado, el equipo está optimizado por diseño para trabajar a 45° y existen estudios que indican que este ángulo de incidencia (45°) es óptimo para el análisis de capas superficiales, lo cual pasa a ser una razón más para definir que todos los estudios de XPS que se muestren en este proyecto serán realizados a 45°. ^{22,23}

III.4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIMPIEZA.

Como quedó comprobado en el ítem anterior, la capa superficial de las aleaciones posee una delgada película de óxido, y una gran cantidad de contaminación en la capa más superficial; y como se ha comentado al inicio, por medio de tratamientos de activación se busca eliminar las impurezas en la superficie.

Para ello se usaron 2 tratamientos: plasma de oxígeno ^{1,4,12-15} y ataque químico con ácido nítrico, ^{5,6,9-11} con el fin de seleccionar el más eficiente en función de:

- 1) Las propiedades físicas: incremento de la energía superficial y mayor hidrofiliidad de las superficies.
- 2) Las propiedades químicas: disminución de la concentración atómica de carbonos, proveniente de la contaminación superficial ¹⁴ y formación de grupos OH^- activos sobre la superficie que darán lugar a los enlaces con los silanos. ^{24,25}

Adicionalmente se incluyó un estudio de modificación de la nanorugosidad, ya que se debía determinar si ésta era una variable que afectaba los resultados de la activación superficial.

Para la evaluación se realizaron varios ensayos:

- 1) Se estudió la rugosidad superficial, que es una variable interviniente en el proceso de activación superficial, que puede afectar los resultados de los tratamientos superficiales.
- 2) Para la caracterización física, se evaluaron la mojabilidad y la energía superficial; ya que en un sólido estos parámetros dependen de su composición química y pueden verse alterados en función de tratamientos superficiales.
- 3) Para la caracterización química de los contaminantes presentes en superficie se realizó un análisis a través del XPS, con el objeto de observar cómo los

tratamientos de limpieza modifican la cantidad de carbonos adsorbidos de la contaminación atmosférica.^{17,19,21} Mediante esta técnica se puede conocer semicuantitativamente el porcentaje de carbono presente en la superficie al mismo tiempo que mediante un estudio de alta resolución se pueden determinar las especies y los enlaces químicos que se han roto o adicionado.

Resultados de Interferometría de Luz Blanca.

Los parámetros establecidos para el estudio de la rugosidad de las muestras, se exhiben en la *Tabla III 3* y los resultados indican que las muestras presentan una rugosidad media (R_a) < 500nm. Por tanto, además de no presentar diferencias estadísticamente significativas, todas pueden ser consideradas como superficies lisas o mínimamente rugosas.^{27,28}

Con lo expuesto anteriormente se puede concluir que **la rugosidad de las superficies no intervendrá en los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos efectuados.**

Aun cuando se tiene que tanto la muestra control como las muestras tratadas, pueden ser consideradas superficies lisas. Al observar la *Tabla III 3* es útil analizar el valor de R_{ku} , ya que teóricamente si este dato es igual a 3, se considera que la muestra es estocástica, con una distribución homogénea entre valles y picos.²⁹ De lo que se deduce que los tratamientos superficiales homogenizan la nanorugosidad de las muestras ya que tanto las muestras con plasma como las tratadas con ácido nítrico tienen un valor tendiente a 3 y mucho más bajo que el de la muestra control (25.7).

Tabla III 3 Rugosidad de la Aleación de CoCr

Parámetros	CoCr	CoPO	CoAN
R_a (nm)	20.1 ± 4.9	13.6 ± 2.1	24.7 ± 6.6
R_{ku}	25.7 ± 5.9	3.7 ± 0.4	5.5 ± 2.7
R_q (nm)	16.0 ± 14.0	17.2 ± 2.3	30.4 ± 7.9

Resultados del Ángulo de Contacto.

Las variables a considerar para la caracterización física de las superficies fueron la mojabilidad y la energía superficial. La mojabilidad es la capacidad que tiene un líquido de extenderse sobre un sólido. Ésta depende de las interacciones intermoleculares entre las moléculas superficiales de ambos. Las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido provocan que el líquido se extienda por la superficie, mientras que las cohesivas del líquido hacen que éste se abulte y tienda a evitarla. Por tanto, la mojabilidad se puede determinar a partir del ángulo que el líquido forma en la superficie de contacto con el sólido, y es a esto lo que se le ha denominado ángulo de contacto y está determinado por la resultante de las fuerzas adhesivas y cohesivas. Como la tendencia de una gota a expandirse en una superficie plana aumenta con la disminución del ángulo de contacto, este ángulo proporciona una medida de la inversa de la mojabilidad.^{30,31}

Un ángulo de contacto pequeño (< 90°) indica que la mojabilidad es muy alta, y el fluido se extenderá sobre la superficie; ángulos de contacto grandes (> 90°) significan que la mojabilidad es baja y el fluido disminuirá el contacto con la superficie, formando una gota compacta. Según lo expuesto en la bibliografía las mediciones de ángulo de contacto realizadas con agua ultra pura para aleaciones de

cobalto y en superficies pulidas poseen un ángulo de contacto, cuyo valor se ubica en 73.3 ± 7.7 .³²

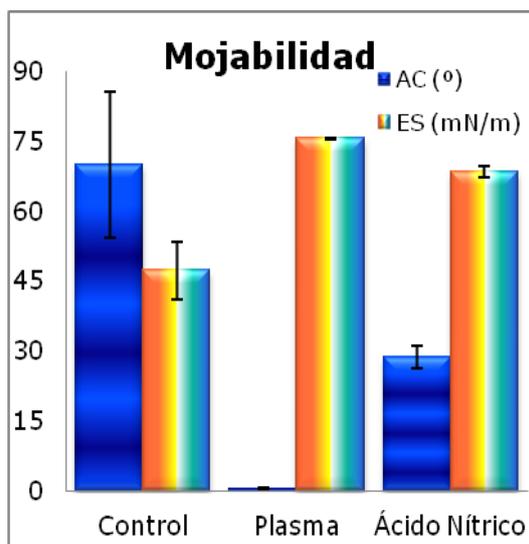


Figura III 3 Medida de Ángulo de Contacto y Energía Superficial

Los resultados de este estudio se muestran en la *Tabla III 4* y en la *Figura III 3* y comprueban que los diversos tratamientos de activación modifican la superficie, debido a que la aleación de CoCr sin tratamiento previo, produce un ángulo de contacto $\approx 70^\circ$. Para las muestras tratadas con plasma se consiguen superficies súper hidrofílicas con un ángulo tendiente a 0° y para las atacadas con ácido nítrico $\theta \approx 29^\circ$.^{17,33,34} Este aumento de la mojabilidad es producto de dos fenómenos 1) la incorporación de radicales sobre la superficie, lo cual es un indicativo de la activación superficial y 2) eliminación de impurezas, consiguiéndose de esta manera mejorar la limpieza superficial.

Adicionalmente un ángulo $\leq 5^\circ$ indica la capacidad de humectación inmediata, lo cual es consistente con la idea planteada por Zhao, que expone que en estos casos la superficie se encuentra perfectamente limpia, con enlaces químicos insaturados y con un estado de energía más alto.³⁵

Tabla III 4 Valores de la Medición Estática de Ángulo de Contacto

	CoCr	CoPO	CoAN
AC (°)	69.9 ± 15.6	0.5 ± 0.1	28.6 ± 2.5
ES (mN/m)	47.3 ± 6.2	75.5 ± 0.2	68.3 ± 1.2
Componente dispersiva	38.1 ± 2.3	36.6 ± 0.5	37.2 ± 0.9
Componente polar	9.2 ± 7.3	38.9 ± 0.4	31.1 ± 1.4

Respecto a la energía superficial se puede interpretar como una fuerza por unidad de longitud (se mide en $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) y depende de la magnitud de las fuerzas intermoleculares en el seno del líquido. La superficie de un sólido es un lugar energético porque los átomos que la forman tienen enlaces rotos, es una zona del material donde los átomos que la forman buscarán la estabilidad y por ello tenderán a reaccionar con el medio exterior. Cada superficie tiene una energía libre de superficie característica y hace referencia a la cantidad de energía que se necesita para crear una nueva superficie. Cuanto mayor sea su valor, más tendencia tendrá a reaccionar con el medio exterior.³⁶

De los resultados obtenidos se corroboró que a mayor energía superficial, menor ángulo de contacto, confirmándose la teoría de que el decrecimiento de los valores del ángulo de contacto y el incremento de la energía superficial están asociados tanto a la remoción de la contaminación superficial, como a la formación de grupos hidrofílicos (OH^- , O_2^+ , O_2^- , O^+ , O^-) sobre la superficie.^{12,15,37} Al mismo tiempo un mayor valor el incremento de la energía superficial es un indicativo de que las superficies tratadas son más reactivas y están mejor acondicionadas para reaccionar con el medio exterior y por ende se espera obtener mejores resultados en la siguiente fase del proceso de biofuncionalización.

La teoría Owens Wendt divide la energía de la superficie (ES) en dos componentes: energía de superficie debido a las interacciones dispersivas y la energía de superficie debido a las interacciones polares. Esta teoría se deriva de la combinación de relación de Young, que relaciona el ángulo de contacto con las energías superficiales del sólido y del líquido y a la tensión de la interfaz. Los datos experimentales se muestran en la *Tabla III 4* y se tiene para la muestra sin tratamiento un valor $ES \approx 47$ mN/m y en las superficies activadas se alcanzan valores de hasta ≈ 75 mN/m para las muestras con plasma de oxígeno y ≈ 68 mN/m para los discos atacados químicamente. El incremento de la energía superficial es un indicativo de que las muestras han sido activadas y sobre ellas están presente grupos funcionales.¹⁴

De la *Tabla III 4* puede notarse que la variabilidad de la mojabilidad tiene una relación directa con los cambios experimentados por la componente polar; por tanto, mientras más hidrofílica es la superficie, más alto es el valor de la componente polar, al contrario del comportamiento presentado por la componente dispersiva, que no muestra diferencias estadísticamente significativas.³⁸

De acuerdo con los resultados, **el plasma de oxígeno es más efectivo que el ataque con ácido nítrico en términos de mayor mojabilidad y mayor energía superficial.**

Como mediante el ángulo de contacto no se consigue ningún tipo de información de la naturaleza química ni de la composición de las especies presentes sobre la superficie, no se puede dilucidar cual tratamiento es más efectivo en términos de limpieza e inclusión de iones radicales. Por este motivo, se procedió a usar el XPS; ya que ésta es una técnica que permite evaluar el grado de limpieza de una forma semicuantitativa, analizando así la eficiencia de ambos tratamientos, en función de porcentaje de carbono y oxígeno y determinando el tipo de enlaces químicos para cada uno de ellos.

Resultados de XPS.

Para la caracterización química de la capa superficial de cada una de las muestras se les realizó un barrido general (survey o panorámico), mediante el cual se determinó su composición química en porcentaje atómico (*Figura III 4* y *Tabla III 5*).

Al observar la *Figura III 4*, se ve como los picos de mayor intensidad corresponden al oxígeno y al carbono, siendo éste un excelente resultado, que confirma ha sido adecuada la selección del XPS como técnica de caracterización, ya que 1) para el estudio de la contaminación se requiere identificar las especies de carbono

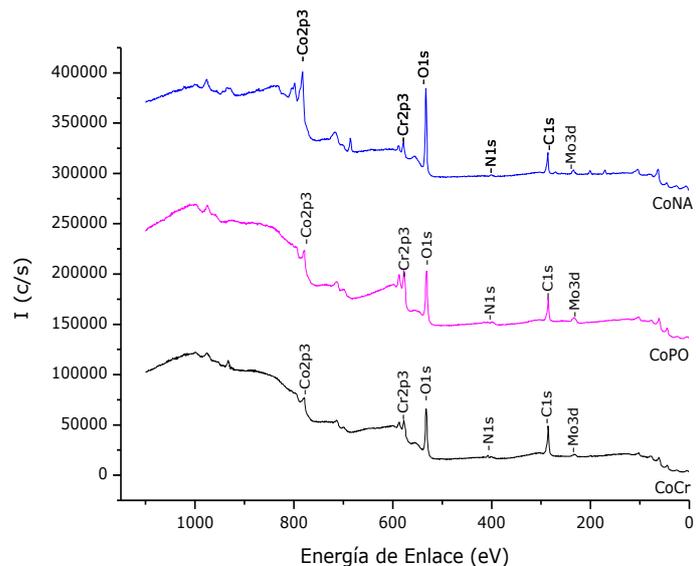


Figura III 4 Barrido Panorámico mediante XPS de CoCr Activado.

presentes en la superficie y 2) para la activación superficial es necesario conocer la densidad de los grupos hidroxilos y de los óxidos en superficie, estos pueden ser determinados dentro de las especies del oxígeno, mediante un estudio de alta resolución del espectro O 1s.

Tabla III 5 Composición Química en Porcentaje Atómico de las Superficies de CoCr Activadas (XPS).

	CoCr	CoCr+ PO	CoCr+AN
C1s	48±2.2	22±0.2	36±0.4
N1s	2±0.2	2±0.1	4±0.3
O1s	42±2.3	56±0.4	49±0.3
Si2p	0±0.0	0±0.0	0±0.0
S2p	0±0.0	1±0.2	0±0.0
Cl2p	0±0.0	1±0.1	0±0.0
Cr2p	4±0.0	1±0.0	6±0.2
Co2p	3±0.3	16±0.2	3±0.0
Mo3d	1±0.0	1±0.0	2±0.0

En la *Tabla III 5* se presenta la composición química en porcentaje atómico, extraída de los espectros de multiregión de los estudios de alta resolución efectuados sobre cada una de las muestras. En la misma puede observarse que existen ciertos elementos que aparecen a causa de la contaminación, tal es el caso del C, del Cl y el N. Como ya se ha explicado la contaminación del carbono es proveniente del contacto de las superficies con el medio atmosférico y en cuanto a la contaminación del cloro puede provenir del uso del MilliQ para la obtención del agua. También se observa un incremento de N 1s en las muestras atacadas químicamente, debido a que éstas fueron tratadas con ácido nítrico.

Aunado a lo anterior, los resultados demuestran una clara reducción de la contaminación del carbono en las superficies tratadas. Las diferencias son estadísticamente significativas e indican que ambos tratamientos son capaces de limpiar, resultando ser más efectivo el plasma de oxígeno en términos de reducción de los carbonos, porque la muestra control tiene un 48% de C 1s, el ácido nítrico ha descendido a 36% y con el plasma de oxígeno se consiguió el valor más bajo 22%.

Luego del barrido general se realizó un estudio de alta resolución del C 1s, con el fin de profundizar en el estudio de los enlaces de carbono presentes, la naturaleza

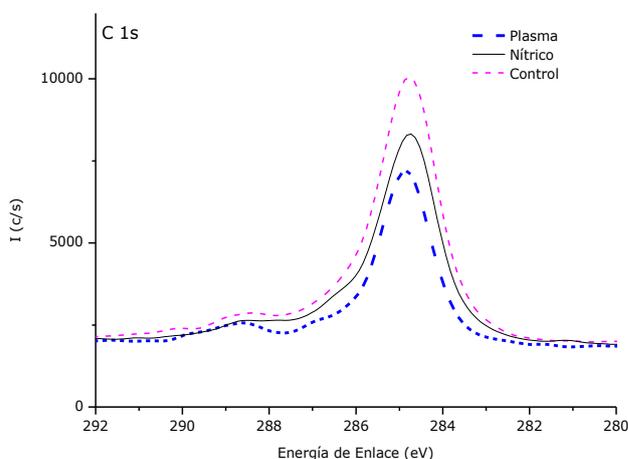


Figura III 5 Espectro de C1s para las diferentes muestras de CoCr Activadas.

química de los enlaces y conocer cuáles de ellos se destruyen y cuales permanecen después de los tratamientos superficiales empleados. Esta información es útil para determinar cómo cada uno de los tratamientos realiza el proceso de limpieza y activación.

La superposición de los espectros de C1s de las muestras de estudio se presentan en la *Figura III 5*, donde queda clara la disminución del área en las muestras tratadas; ya que el porcentaje atómico

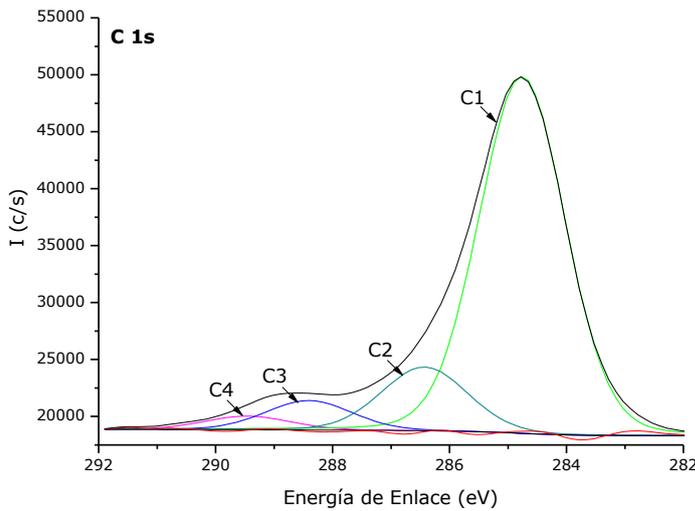


Figura III 6 Alta resolución del Espectro de C 1s mediante XPS.

calculado mediante esta técnica se basa en el área de cada uno de los espectros a evaluar.

La deconvolución de los espectros se realizó utilizando sustracción de fondo tipo Shirley, con un máximo de 50 iteraciones, empleando sumas asimétricas de funciones gaussianas-lorentzianas y como variables de ajuste se consideró el ancho de pico a media altura, el área y el valor de la energía de cada uno de ellos (Figura III 6).

Aunado a esto al tratarse de muestras metálicas en el momento de la adquisición de la señal, puede darse un desplazamiento en las energías de enlace, por tanto se realizó la calibración con el pico de C1s a 284.8 eV.

La Figura III 6 representa la deconvolución del espectro de C 1s de una muestra de CoCr sin tratamiento, donde se muestran cuatro contribuciones de diferentes especies de carbonos. La sumatoria de área de cada contribución ha de ser igual al área total del espectro de C 1s, por tanto la sumatoria de las áreas de los cuatro picos (C1, C2, C3 y C4) ha de ser igual al área total del espectro y el error producto de las deconvoluciones se ve reflejado en la línea roja que aparece sobrepuesta en la línea base.

Tabla III 6 Composición Química en Porcentaje Atómico de las Especies de C 1s por XPS

Pico	Enlace	CoCr	CoPO	CoAN	BE (eV)
C 1s		48±2.2	22±0.2	36±0.4	
C1	C-H, C-C	29	18	29	284.9 ± 0.4
C2	C=O, C-OH	9	2	4	286.2 ± 0.5
C3	C-O, N-C=O	5	0	0	287.2 ± 0.5
C4	N-O-C=O	5	2	3	289.3 ± 0.5
(C2+C3+C4)/C1		0.66	0.22	0.24	

Las contribuciones de C1, C2, C3 y C4 se presentan en la Tabla III 6 y los porcentajes de cada uno de ellos están en función de la totalidad de los elementos analizados, es decir la suma de C1+C2+C3+C4 ha de ser igual al valor del C 1s para cada una de las muestras. Las contribuciones del carbono son comparables con los picos identificados por otros autores, donde C1 corresponde a los carbonos alifáticos y los picos C2, C3 y C4 fueron atribuidos a especies de carbonos de carácter hidrofílico.

Como se puede ver a un nivel de energía de enlace de 286.2 eV se tiene C=O y C-OH, a 287.2 eV se ubican C-O y N-C=O y por último a 289.3 eV se le atribuye N-O-C=O.^{14,24,25,39-42}

Sabiendo que la contaminación ambiental es la principal responsable de la presencia de los carbonos sobre la superficie, además del descenso del contenido de carbono, se puede observar que en las muestras tratadas con plasma de oxígeno, se produce una disminución significativa de 29% de la muestra control a 18% con plasma (C1); y para las atacadas con ácido nítrico, la disminución se presentó para C2, C3 y C4.

De lo que se puede deducir que el plasma de oxígeno es más eficaz en la disminución del C 1s (survey), por romper enlaces del tipo C-H y/o C-C, dejando especies más polares sobre las muestras, lo cual conlleva a superficies más hidrofílicas.

El hecho de eliminarse especies de carbonos diferente puede deberse a que se trabaja con diferentes mecanismos, en el plasma de oxígeno se realiza la activación de la superficie mediante un proceso de combustión fría y en el ácido nítrico se ataca químicamente en solución.

En el momento de analizar **los ratios entre C2+C3+C4 y el carbono alifático (C1), se determina que ambos tratamientos tienen la misma eficiencia en términos de remoción de carbonos**; ya que la muestra control presenta un cociente de 0.66 mientras que las muestras tratadas exhiben un valor similar, siendo 0.22 para el plasma y 0.24 para el nítrico.

Por lo expuesto anteriormente se consideró conveniente, antes de seleccionar el método más efectivo en cuanto a limpieza y activación, estudiar otros factores, tales como la densidad de grupos OH⁻ sobre la superficie y la composición de la capa de óxido, ya que estas variables pueden afectar la activación superficial.

III.4.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE GRUPOS HIDROXILOS EN SUPERFICIE.

Los metales se encuentran cubiertos por una película de óxido, que contiene grupos hidroxilos (OH⁻) dentro y sobre la superficie, estos OH⁻ juegan un papel preponderante para este estudio, debido a que son ellos los que propician las interacciones iniciales de las reacciones químicas futuras; sin embargo solo los grupos OH⁻, que se encuentran en la parte más superficial de la película de óxido, son los que tienen la capacidad de reaccionar fácilmente con los silanos.²⁴⁻²⁶ Una mayor cantidad de OH⁻ permite mayor número de enlaces del tipo Si-O-metal, lo cual conllevará a una mejor adhesión de los péptidos.

Por esta razón es necesario determinar las especies de oxígeno presentes en la capa superficial y con ello conocer la densidad de los OH⁻.

Resultados de XPS.

Para la determinación de las diferentes especies de oxígeno (óxidos y OH⁻), presentes en la capa superficial, se procedió a realizar un estudio de XPS de la alta resolución sobre el espectro del O 1s.

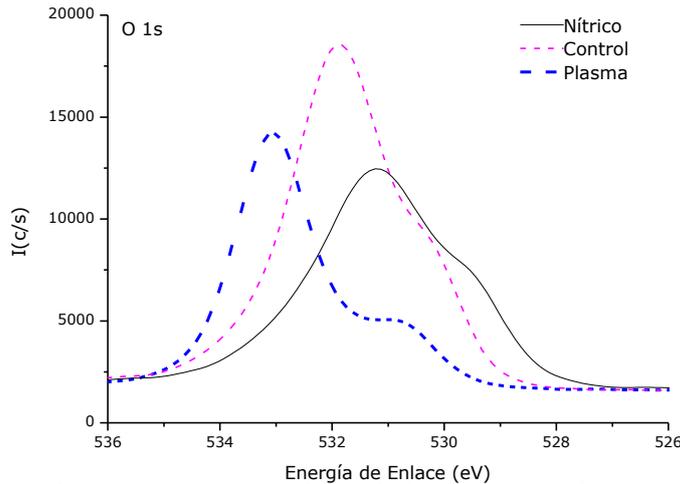


Figura III 7 Superposición de los Espectros de O1s para las Muestras de CoCr Activadas

el espectro de O 1s posee al menos 3 picos, correspondientes a O^{2-} , OH^- y a agua absorbida,^{7,10,17,23-26,42,43} y se percibe un aumento considerable del pico de hidroxilos para la muestra tratada con ácido nítrico. Siguiendo las líneas punteadas, los picos parecen estar desplazados, pero estas pequeñas variaciones en los niveles de energía de enlace corresponden a la sensibilidad de la técnica y a las líneas "shake up" típicas del efecto vibracional de los electrones, en el momento de la medición.

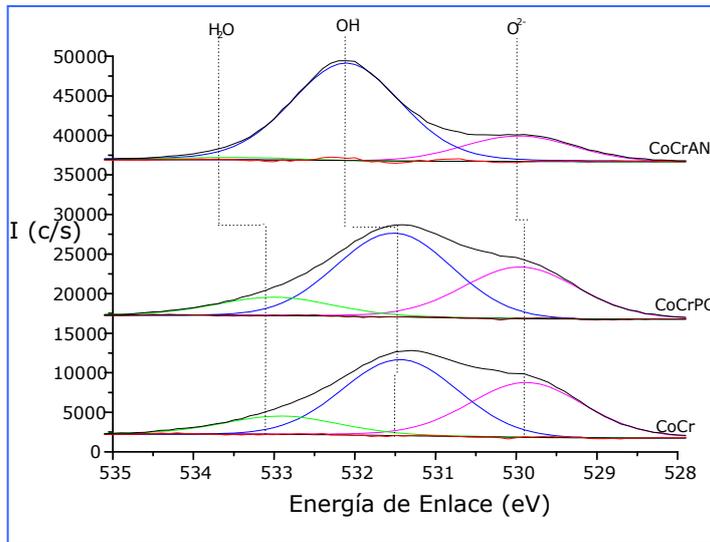


Figura III 8 Alta Resolución de los Espectros de O 1s de las Muestras de CoCr Activadas

En la Tabla III 7, se puede observar los porcentajes atómicos de estas especies de oxígeno para cada tipo de muestra y queda claro que ambos tratamientos aumentan el porcentaje total de oxígeno pasando de una muestra control a 42% a una muestra con ácido nítrico con 49% y el valor más alto para la tratada con plasma de oxígeno de 56% (panorámico). Sin embargo, una mayor proporción de O 1s, no implica necesariamente mayor cantidad de grupos OH^- . De lo cual si se analiza al detalle la Tabla III 7, con la deconvolución se concluye que ambos tratamientos cumplen con el objetivo de la activación, debido a que partiendo de una muestra control con un 19% de OH^- , se produjo un aumento a 27% en el caso del plasma y 35% para el ácido nítrico. Para confirmar esta tendencia, se realizó el cociente entre los hidroxilos y los óxidos tal como se muestra en la Tabla III 7, teniendo que **la mejor relación OH^-/O^{2-} la consiguen las muestras tratadas con ácido nítrico (3.38) en comparación con las de plasma de oxígeno (1.33) lo que comprueba que el ataque químico proporciona un proceso de activación superficial más eficiente.**

La Figura III 7 muestra la superposición de los espectros de O1s para cada una de las muestras de CoCr y en ella se puede observar, que además de presentar áreas diferentes, también hay modificaciones en la forma de cada uno de los espectros, por la inclusión o eliminación de especies de oxígeno.

Al realizar el análisis de cada uno de los tratamientos efectuados se obtiene la Figura III 8, en la cual del

En la Tabla III 7, se puede observar los porcentajes atómicos de estas especies de oxígeno para cada tipo de muestra y queda claro que ambos tratamientos aumentan el porcentaje total de oxígeno pasando de una muestra control a 42% a una muestra con ácido nítrico con 49% y el valor más alto para la tratada con plasma de oxígeno de 56% (panorámico).

Sin embargo, una mayor proporción de O 1s, no implica necesariamente mayor cantidad de grupos OH^- . De lo cual si se analiza al detalle la Tabla III 7, con

Tabla III 7 Especies de Oxígeno Determinadas por Alta Resolución mediante XPS

	CoCr	CoPO	CoAN	BE (eV)
O1s	42\pm2.3	56\pm0.4	49\pm0.3	
O²⁻	15	20	10	530.1 \pm 0.4
OH⁻	19	27	35	531.5 \pm 0.5
H₂O	8	9	4	533.1 \pm 0.5
OH⁻/O²⁻	1.27	1.33	3.38	

Resultados de la Técnica de Sustitución del Complejo de Zinc.

Existen trabajos previos en los que se estudian el efecto de grupos OH⁻ en las superficies de los metales y proponen realizar una estimación de la concentración de los grupos hidroxilos activos (OH-act),^{24,25,44} que son los que se encuentran en la parte más superficial de la película de óxido, ya que son éstos los que tienen la capacidad de reaccionar fácilmente con los silanos. Para ello hacen uso de una técnica complementaria, llamada técnica de sustitución del complejo de zinc (TCZ).

En este proyecto se ha considerado la TCZ como una técnica complementaria, debido a que sus resultados no pueden ser comparados directamente con los resultados de XPS o ToF SIMS, porque trabajan bajo diferentes condiciones: en el XPS las muestras se estudian en ultra alto vacío y en la TCZ las muestras se encuentran inmersas en una solución líquida. Adicionalmente aun cuando se está trabajando con superficies que pueden ser consideradas lisas, en esta técnica la nanorugosidad de las muestras puede originar una sobre estimación de las concentraciones de los grupos OH-act.

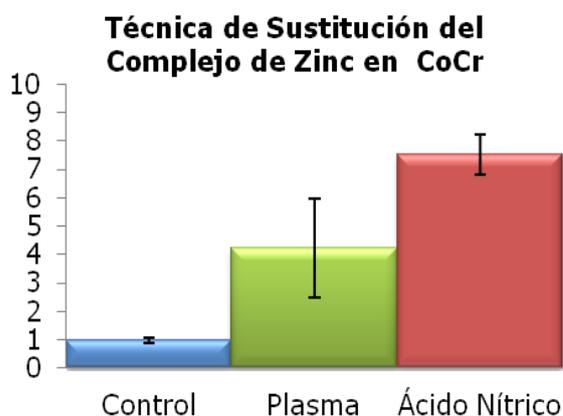


Figura III 9 Concentración Normalizada de los Grupos de OH-act sobre la Superficie de CoCr.

La *Figura III 9* muestra de manera comparativa la concentración de los grupos OH-act (C_{OH}) por unidad de área para cada tipo de muestra. Los datos de esta gráfica fueron normalizados, partiendo de una muestra control de CoCr que exhibió una C_{OH} de 339/nm². En la misma es notorio que el incremento de las C_{OH}/nm² es más favorable para la CoAN con diferencias estadísticamente significativas.

Aún cuando la información obtenida a través de esta técnica es simplemente orientativa, porque los mismos autores que la plantean, afirman que es muy difícil distinguir con precisión la densidad de los grupos hidroxilos activo, **los resultados obtenidos han servido para corroborar lo descrito para el XPS, y poder concluir que el mejor método de activación para la aleación de CoCr es el ácido nítrico.**

III.4.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CAPA DE ÓXIDOS SUPERFICIALES.

En cuanto a la caracterización química de la capa de óxido, es conveniente saber que las aleaciones de CoCr se utilizan como biomateriales debido a su resistencia a la corrosión, resistencia al desgaste y resistencia a la fatiga.²⁶

La resistencia a la corrosión de la aleación, no solo depende del espesor de la capa de óxido y de la homogeneidad de la misma, sino que a su vez juega un rol muy importante la naturaleza de las especies de óxidos metálicos. Por tanto, es relevante estudiar si los tratamientos superficiales de plasma de oxígeno o ácido nítrico causan cambios sobre la película de óxido; ya que una modificación de las misma puede alterar el comportamiento en término de liberación de iones, resistencia a la corrosión y resistencia al desgaste entre otros factores.

Por ejemplo, es sabido que los óxidos de cromo son más resistentes que los óxidos de cobalto a la lixiviación de iones de liberación y a la corrosión cuando el metal se encuentra en contacto con los fluidos corporales,¹¹ de donde se deduce que idealmente es más conveniente trabajar en implantes óseos con una capa rica en óxidos de cromo.

Aunado a esto Matinlinna et al., afirman que en las superficies de CoCrMo el principal responsable de los enlaces metal-silicio es el Cr₂O₃.¹⁹

Resultados de XPS.

La determinación de la presencia de las diferentes especies de óxidos metálicos, en la capa superficial se realizó mediante un estudio de alta resolución por XPS de los espectros de los elementos metálicos mayoritarios (Cr 2p y Co 2p). Los espectros fueron analizados por separado y en ellos se determinó tanto la proporción del elemento metálico, como de los óxidos constituyentes.

En el momento de realizar las deconvoluciones de cada uno de los espectros se tomó en consideración el orbital que tiene un mayor factor de respuesta, debido a que éste es el que genera un pico de mayor intensidad, resultando que para ambos elementos, la mayor intensidad la genera el orbital 2p. Ahora bien, dado que estos metales poseen dobletes (2p_{1/2} y 2p_{3/2}), para su adecuada cuantificación se fijó en el software la relación de áreas entre picos y las distancias entre los niveles de energía de enlace de los orbitales en eV, estos son valores teóricos establecidos para una correcta deconvolución de los espectros y se muestran en la *Tabla III 8*.^{23,45}

Tabla III 8 Parámetros para la deconvolución de los elementos metálicos mayoritarios de la aleación de CoCr por XPS

Espectro	Orbitales		Relación de Áreas	Δ (eV)
Cr2p	1/2	3/2	1:2	9.20
Co2p	1/2	3/2	1:2	14.97

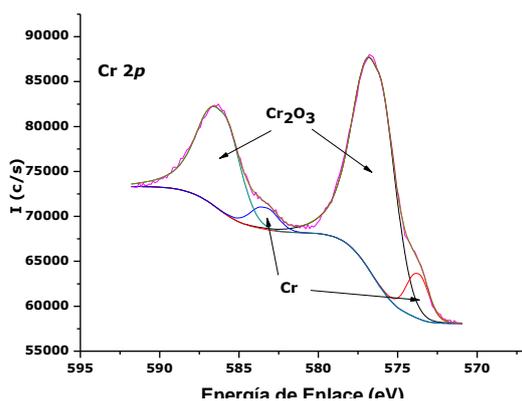


Figura III 11 Deconvolución de los Espectros de Cr 2p.

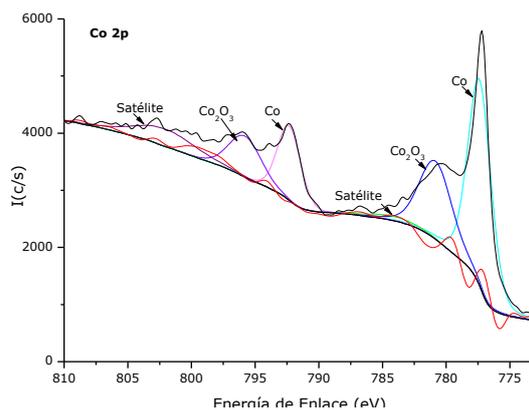


Figura III 10 Deconvolución de los Espectros de Co 2p

Las deconvoluciones de los espectros de Co 2p y de Cr 2p que se muestran en las *Figura III 10* y *Figura III 11* se realizaron sobre una muestra atacada químicamente con ácido nítrico y los valores de la energía de enlace para cada una de las especies coinciden con los reportados en la bibliografía^{17,19,23,25,26,43,45-48} y se muestran en la *Tabla III 9*.

Tabla III 9 Composición Química de la Capa de Óxido de la Aleación de CoCr por XPS.

	Control	Plasma	Ácido Nítrico	B.E. (eV)	
Cr2p	4±0.0	1±0.0	6±0.2		
Cr	0.4	0.1	0.6	574.5	±0.5
Cr₂O₃	3.6	0.9	5.4	576.5	±0.4
Co2p	3±0.2	16±0.2	3±0.0		
Co	1.7	0	1.3	777.4	±0.1
Co₂O₃ y Co₃O₄	1.3	16	1.7	779.9	±0.5
Cr_xO_y/Co_xO_y	2.77	0.06	3.17		
Metal	30	0	21		
Óxido	70	100	79		

Una visión global de la *Tabla III 9* permite definir que ambos tratamientos generan un incremento de la capa de óxido, pasando de una muestra control con 70% de óxidos sobre la superficie a una muestra con nítrico con un 79% y una muestra tratada con plasma de oxígeno con un 100%. De lo anteriormente expresado se deduce que la capa de óxido de las muestras tratadas con plasma de oxígeno posee un espesor mayor o igual a los 10 nm; ya que ésta es la penetración máxima del XPS.

Ahora bien, en el momento de estudiar la capa de óxido superficial que recubre las muestras, no solo se debe determinar el espesor, sino que es de mayor importancia detectar los tipos de óxidos presente y si los tratamientos empleados han modificado la composición química de la superficie.

Por tanto vale la pena resaltar, que el plasma de oxígeno produce un considerable aumento de Co 2p pasando de 3% a 16% y un decrecimiento del Cr 2p de 4% a un 1% después de la activación. En el caso de los óxidos de Co, el pico de Co₂O₃, podría estarse viendo influido por una contribución de la espinela Co₃O₄. Por su parte, el ácido nítrico exhibe leves incrementos en los porcentajes del óxido metálico (Cr₂O₃).¹¹

Como ambos tratamientos incrementaron la capa de óxido, se requirió realizar **una ratio entre los óxidos de cromo y los óxidos de cobaltos (Cr_xO_y/Co_xO_y), sus**

resultados corroboran que el plasma de oxígeno disminuye la relación de Cr_xO_y/Co_xO_y de 2.77 a 0.06 y con el ataque con ácido nítrico, la relación de Cr_xO_y/Co_xO_y es similar a la muestra control (3.17), siendo este un valor óptimo, ya que según estudios de ultrapasivación realizados sobre aleaciones de CoCr, el valor idóneo para aplicaciones médicas ha de ser igual a 3.¹¹

Resultados de ToF SIMS.

Los resultados anteriores fueron corroborados, mediante el ToF SIMS, y se muestran en la *Figura III 12*, donde se muestran los picos principales son $Cr^+(m/z \approx 52)$ y $Co^+(m/z \approx 59)$, sin embargo en el espectro aparecen los isótopos del Cr a $m/z \approx 52$ y 53 , al igual que un isótopo del Co a $m/z \approx 60$. Si se observa la muestra tratada con plasma incrementa la intensidad del pico del Co y disminuye la del Cr, lo cual confirma la tendencia mostrada a través del XPS.⁴⁹⁻⁵³

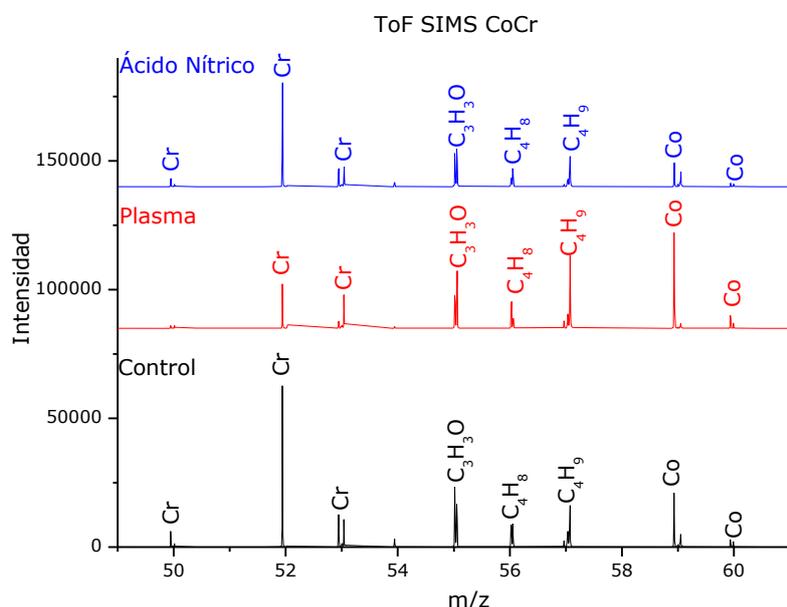


Figura III 12 Espectro Positivo de ToF SIMS de las Muestras de CoCr.

Realizando una comparación entre la intensidad de los picos (Cr^+/Co^+), se tiene que la muestra control arrojó un cociente de 3.1, la muestras tratadas con ácido nítrico 4.9, sin embargo para las tratadas con plasma esta ratio decreció a 0.5, afirmando que el tratamiento con plasma modifica la composición química de la capa superficial de las muestras (*Tabla III 10*).

Tabla III 10 Intensidades de los Fragmentos de Moléculas del Espectro Positivo de ToF SIMS

	Control	Plasma	Ácido Nítrico	m/z
Cr^+	77652	21487	55745	52
Co^+	25081	46741	11344	59
CrO^+	10601	5669	8144	68
Mo^+	1846	683	797	98
$Cr2^+$	3631	1538	2070	104
$Cr2O^+$	3320	683	2863	120
$Cr2O3^+$	6339	3892	2911	152
Cr^+/Co^+	3.1	0.46	4.91	

Es por ello que de acuerdo a los resultados obtenidos, el ataque con ácido nítrico representa un tratamiento apropiado para ser usado en la aleación de CoCr; ya que es eficiente en términos de limpieza, formación de OH-act, posee mayoritariamente Cr_2O_3 , (siendo este óxido el principal encargado de los enlaces metal-silano)⁵⁴ y aunado a esto tiene una mejor relación de Cr_xO_y/Co_xO_y .¹¹

En cuanto al incremento del cobalto en las muestras tratadas con plasma de oxígeno, existen estudios anteriores que buscaban mejorar las propiedades tribológicas de una aleación de CoCr, oxidando la superficie mediante el uso de oxígeno y tratamientos de temperatura.

Por ejemplo, Fowler et al., encontraron que la oxidación de las muestras a temperaturas sobre 400 ° C, tiende hacia el crecimiento de una capa de óxido exterior, rica en Co. En este mismo estudio ellos encontraron que la oxidación a 25°C muestra una disminución continua en el contenido de Cr cerca de la superficie a partir del valor mayor de 14% a un valor del orden de 5% después de 1200 L de O₂.⁵⁵

Aunque el mecanismo de formación de capas mezcla de óxidos (Cr_xO_y y Co_xO_y) no está claro, algunos autores sugieren que la estructura de óxido observada es una consecuencia de la competencia entre la preferencia del Cr para oxidarse debido a su mayor potencial de oxidación y a las difusividades diferentes de Co y Cr en la estructura de óxidos.

III.4.5 ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE LA ACTIVACIÓN SUPERFICIAL A TRAVÉS DE UN PÉPTIDO FLUORESCENTE.

Para corroborar la eficiencia del proceso de activación, se diseñó un ensayo de estabilidad química y mecánica, este estudio surgió de la hipótesis de que un incremento en la cantidad de grupos hidroxilos sobre la superficie, ha de producir un aumento en la densidad de péptido adheridos, en otras palabras, mientras más OH⁻ se inserten en la capa superficial de las muestras, más cantidad de péptidos se adhieren.

El mismo consistió en enlazar un péptido fluorescente (Carboxyl Fluorescein-CGGGRGD), a diferentes superficies a través de dos mecanismos: 1) Fisorción (muestra + péptido) y 2) quimisorción (muestra + silano + péptido). Una vez añadido el péptido a las superficies, las mismas fueron sumergidas en una solución de PBS (pH 7) y colocadas en un baño de ultrasonidos por 1h y 2h con el fin de evaluar la intensidad de fluorescencia y con ello comprobar la efectividad de los grupos OH⁻ en términos de inmovilización de biomoléculas.

El silano usado para el enlace químico de la secuencia peptídica fue cloropropil trietoxi silano (CPTES) y la medición de la intensidad de fluorescencia fue cuantificada a través del software Image J. una mayor intensidad de fluorescencia implica una mayor cantidad de péptido adherido en la superficie.

Para este ensayo se usaron triplicados de las siguientes muestras:

- CoCr sin tratamientos (control)
- CoCr + péptido (fisorción)
- CoPO + péptido(fisorción)
- CoAN + péptido(fisorción)
- CoPO + CPTES + péptido (quimisorción)
- CoAN + CPTES + péptido (quimisorción)

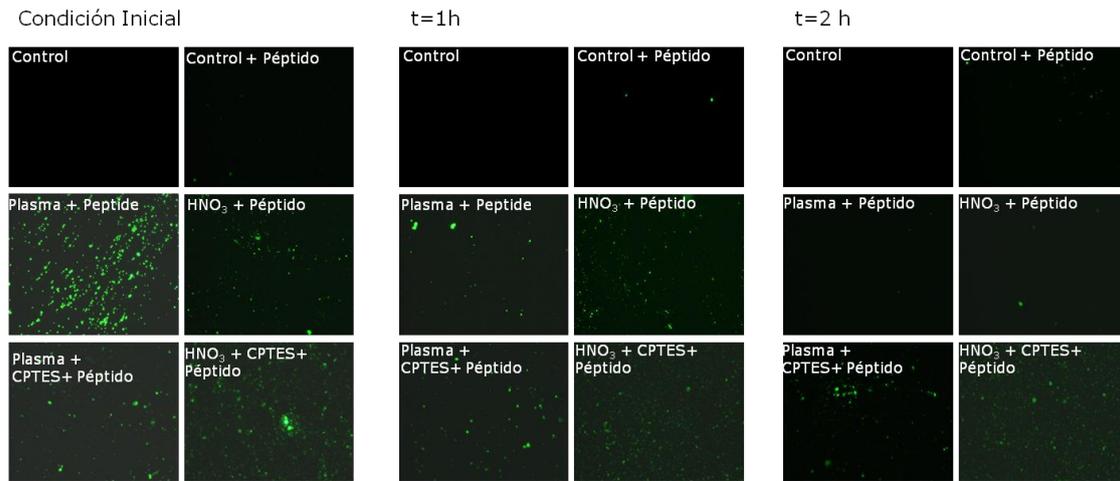


Figura III 13 Imágenes de Fluorescencia para la Estabilidad del Pasivado

Una vez realizado el ensayo se tomaron en un microscopio de fluorescencia las imágenes mostradas en la *Figura III 13*, donde se puede apreciar que inicialmente la muestra que exhibe una mayor fluorescencia es la de plasma con péptido fisisorbido. Sin embargo, como era de esperarse, luego de los baños de ultrasonido, al no poseer un enlace covalente, el péptido se ha despegado de la superficie. Esto demuestra que este enlace no es estable, siendo este resultado similar para todas las muestras, cuya adhesión peptídica se dio por fisisorción, lo cual justifica el uso de la silanización como proceso intermedio para la unión de las biomoléculas a las superficie metálica.

Con respecto a las muestras donde el enlace se realizó por quimisorción, ubicadas en la parte inferior de *Figura III 13*, se observa que desde un primer momento ($t=0h$) las muestras activadas con ácido nítrico presentaron una mayor intensidad de fluorescencia. Al mismo tiempo se observa que aún después de las 2 h de ultrasonido se perciben fluorescencia sobre las muestras, lo cual indica la presencia del péptido.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada una de las imágenes, se presenta en la *Figura III 14*, donde se puede ver que a tiempo 0h la muestra con plasma+péptido tiene una adhesión de péptido superior al resto de las muestras. Sin embargo todas las muestras al ser sometidas a una hora de ultrasonido pierden gran porcentaje de fluorescencia, mostrando el cambio más drástico la muestra de plasma+péptido. Esto implica que gran parte del péptido se encontraba fisisorbido y no estaba enlazado covalentemente a las superficies.

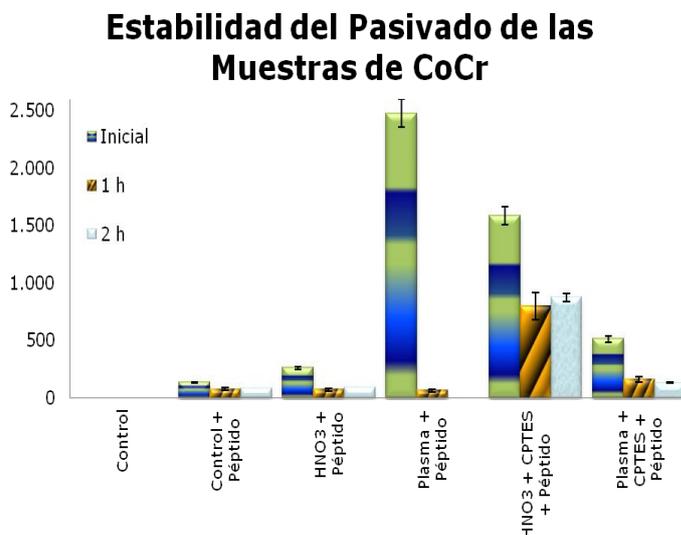


Figura III 14 Estabilidad de la Activación Superficial.

No obstante, se observan que entre 1h y 2h todas las

muestras excepto el (CoPO+péptido), presentan un comportamiento estable. No obstante, las que exhiben mayor intensidad de fluorescencia y por ende mayor cantidad de péptido en superficie son las que se trataron con CPTES (quimisorción).

Al analizar las muestras silanizadas, es evidente que las muestras activadas con ácido nítrico, además de ser más estables, presentan un mejor resultado por poseer mayor intensidad de fluorescencia.

Por tanto, *si la activación superficial se está realizando con el objetivo de mejorar las características superficiales de las muestras para la posterior inmovilización de biomoléculas, de este ensayo se deduce que el mejor resultado se obtiene mediante la quimisorción sobre las muestras activadas con ácido nítrico y se comprueba la hipótesis que a mayor cantidad de OH⁻ en superficie, mejor adhesión de las secuencias peptídicas.*

III.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

En función de los objetivos específicos planteados en este capítulo se puede concluir que en cuanto a:

1) Determinación del grado de limpieza obtenido en cada proceso de activación.

- La espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS), es una técnica lo suficientemente sensible y específica para detectar los átomos de carbono y oxígeno procedente de los contaminantes en superficie, siendo la determinación del porcentaje de C 1s un criterio útil para estudiar la eficacia de los diferentes métodos de activación.

- Las superficies metálicas al estar en contacto con el ambiente, se contaminan y su composición química refleja un alto contenido de carbonos alifáticos, lo cual justifica el uso de tratamientos de limpieza de la superficie. En este estudio tanto el plasma de oxígeno (PO) como el ataque químico con ácido nítrico (AN) disminuyen la contaminación superficial en términos de decrecimiento del porcentaje atómico de carbonos en superficie; ya que de un valor inicial de 48% pasa a 22% con PO y a 36% para el AN (*Tabla III 5*). Hay que enfatizar que se está trabajando con valores absolutos en función del contenido total en la muestra, por ende pueden compararse entre sí, siempre y cuando las condiciones de ensayo sean iguales.

- El plasma de oxígeno mostró mayor capacidad para la remoción del C 1s. Sin embargo la relación de carbonos ($C2+C3+C4/C1$) tanto para plasma como para nítrico fue similar 0.22 y 0.24 respectivamente, lo cual indica que ambos tratamientos son eficientes en términos de limpieza. (*Tabla III 6*).

2) Determinación de la densidad de grupos activos (grupos OH⁻) introducidos en la superficie metálica en cada proceso de activación.

- De acuerdo con los resultados de XPS, el PO es el método que introduce una mayor cantidad de oxígeno en superficie, ocasionando un aumento de un 42% a un 56% (*Tabla III 7*). No obstante este elemento puede estar en forma de iones positivos (O^+ , O^{2+} , O_2^+), iones negativos (O^- , O^{2-} , O_3) o formando enlaces con otros elementos (H_2O , óxidos, OH^-). Por tanto es necesario saber qué porcentaje de átomos están enlazados formando grupos hidroxilos.

- Mediante la deconvolución de los espectros de O 1s, se obtienen al menos tres contribuciones (O^{2-} , OH^- y H_2O). Se ha realizado un cociente (OH^-/O^{2-}) entre el oxígeno que forma los grupos hidroxilos y los que están enlazados formando óxidos; los resultados obtenidos se presentan en la *Tabla III 7* (CoCr: 1.27, CoPO: 1.33 y CoAN: 3.38) y con ellos se confirma que a pesar de que el PO produce una mayor cantidad de oxígeno, es el AN el que introduce una mayor cantidad de grupos hidroxilos en superficie, y demostró ser el mejor tratamiento en cuanto a activación por poseer una mejor relación OH^-/O^{2-} .

- La técnica de sustitución del complejo de zinc, ha corroborado el resultado anterior, ya que en el momento de realizar la cuantificación de la densidad de grupos OH-act en superficie el mayor valor de C_{OH}/nm^2 , fue el de las muestras tratadas con AN (ver *Figura III 9*).

- Con el fin de confirmar la eficiencia del proceso de activación, se diseñó un estudio de estabilidad de un péptido fluorescente, adherido por quimisorción

(activación+silanización+péptido) y/o fisisorción (activación+péptido). En este estudio se pone de manifiesto que el mejor resultado se obtiene mediante la quimisorción y se da sobre las muestras activadas con ácido nítrico (*Figura III 13* y *Figura III 14*).

3) Caracterización química de la capa de óxidos superficial antes y después del proceso de activación.

- Los resultados de XPS muestran que ambos métodos de activación aumentan el espesor de la capa de óxidos (CoCr:70%, CoPO:100% y CoAN:79%), siendo ésta mayor en el caso de del plasma de oxígeno (*Tabla III 9*); en este mismo análisis, se puede apreciar que el PO produce un decrecimiento del Cr 2p de un 4% a un 1% y paralelamente introduce un considerable aumento del Co 2p, pasando de 3% de la muestra control a 16%, en la muestra tratada con plasma. Por su parte el AN exhibe leves incrementos en los porcentajes del óxido Cr₂O₃.

- En función de los resultados de XPS se calcularon las ratios de Cr_xO_y/Co_xO_y, y sus resultados corroboran que el plasma de oxígeno modifica la composición química de la capa superficial; ya que disminuye la relación de Cr_xO_y/Co_xO_y de 2.77 a 0.06. Sin embargo, con el ataque con ácido nítrico, la relación de Cr_xO_y/Co_xO_y es 3.17 la cual es similar a la muestra control (*Tabla III 9*); siendo este un excelente resultado, porque bibliográficamente se encuentra documentado que un valor de 3 para esta ratio es idóneo para las aleaciones de CoCr usadas en aplicaciones biomédicas. Adicionalmente esto indica que en la capa más superficial se tiene mayoritariamente Cr₂O₃, el cual ha sido reportado como un óxido muy resistente a la lixiviación cuando está en contacto de fluidos corporales.

Los resultados de ToF SIMS corroboran lo obtenido mediante el XPS, ya que como puede verse en la *Tabla III 10*, al realizar la ratio Cr⁺/Co⁺, se tiene que la muestra control arrojó un cociente de 3.1, la muestras tratadas con ácido nítrico 4.9. No obstante, para las tratadas con plasma esta ratio decreció a 0.5, afirmando que el tratamiento con plasma modifica la composición química de la capa superficial de las muestras.

Este hecho es importante, ya que la naturaleza química de la capa de óxidos superficiales tiene una relación directa con las propiedades de resistencia a la corrosión, liberación de iones, citotoxicidad o adsorción de proteínas.

Entonces de la caracterización físico-química de las superficies activadas se concluye que:

- **Para elegir un método de activación interesa aquel que limpie e introduzca grupos hidroxilos, sin modificar la naturaleza de la capa de óxidos superficiales. Los resultados refuerzan la utilización del ataque ácido frente al plasma de oxígeno.**

- **Mediante el ensayo de fluorescencia se valida la hipótesis de que el método de activación que introduce una mayor densidad de grupos hidroxilos en superficie (en este caso el ácido nítrico), será susceptible de unir una mayor cantidad de organosilanos y por ende mayor cantidad de péptido.**

III.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Junkar, I., Vesel, A., Cvelbar, U., Mozetič, M. & Strnad, S. Influence of Oxygen and Nitrogen Plasma Treatment on Polyethylene Terephthalate (PET) Polymers. *Vacuum* **84**, 83-85 (2009).
2. Takada, T. & Wordsworth, K. Surface Modification and Characterization of Carbon Black with Oxygen Plasma. *Carbon* **34**, 1087-1091 (1996).
3. Vane, R. A. Oxidative Cleaning Method and Apparatus for Electron Microscopes Using an Air Plasma as an Oxygen Radical Source.pdf. 8 (2000).
4. Thomas C, I., Fischione, P. E., O'Keefe, C., Guruz, M. U. & Dravid, V. P. Plasma Cleaning and Its Applications for Electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* **5**, 26-135 (1999).
5. Puleo, D. A. Biochemical Surface Modification of Co-Cr-Mo. *Biomaterials* **17**, 217-222 (1996).
6. Kilpadi, D. V. *et al.* Effect of Surface Treatment on Unalloyed Titanium Implants: Spectroscopic Analyses. *John Wiley & Sons, Inc.* (1997).
7. Hanawa, T. Review: A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *J Periodontal & Implant Science* 263-272 (2011).
8. Martin, H. J., Schulz, K. H., Bumgardner, J. D. & Walters, K. B. XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **23**, 6645-51 (2007).
9. Montero-Ocampo, M., Hidalgo Badillo, J. A. & Montero-Ocampo, C. EIS study of the electrochemical behavior of the Co-Cr- Mo alloy in borate solutions. *Society* 25900-25900 (2006).
10. Lin, H. Changes in the Surface Oxide Composition of Co-Cr-Mo Implant Alloy by Macrophage Cells and their Released Reactive Chemical Species. *Biomaterials* **25**, 1233-1238 (2004).
11. Salvati, L. & Yang, X. Ultrapasivación de una Aleación con contenido de Cromo. (2011).
12. Chu, P., Chen, J. & Wang, L. Plasma-surface Modification of Biomaterials. *Materials Science and Engineering R* **36**, 143-206 (2002).
13. Lobo, A. O. *et al.* Fast Functionalization of Vertically Aligned Multiwalled Carbon Nanotubes Using Oxygen Plasma. *Materials Letters* **70**, 89-93 (2012).
14. Cvelbar, U. *et al.* Oxygen Plasma Functionalization of Poly(p-phenylene sulphide). *Applied Surface Science* **253**, 8669-8673 (2007).
15. Huang, N. *et al.* Plasma Surface Modification of Biomaterials Applied for Cardiovascular Devices. *The 30th International Conference on Plasma Science, 2003. ICOPS 2003. IEEE Conference Record - Abstracts.* **36**, 439 (2002).
16. Vickerman, J. C. & Briggs, D. *ToF-SIMS Surface Analysis by Mass Spectrometry*. 789 (IM Publications and Surface Spectra Limited: 2001).
17. Mani, G., Feldman, M. D., Oh, S. & Agrawal, C. M. Surface Modification of Cobalt-Chromium-Tungsten-Nickel Alloy Using Octadecyltrichlorosilanes. *Applied Surface Science* **255**, 5961-5970 (2009).

18. Xiao, S. J. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-72 (1997).
19. Matinlinna, J. P. *et al.* Surface Analysis of Co-Cr-Mo Alloy and Ti Substrates Silanized with Trialkoxysilanes and Silane Mixtures. *Surface and Interface Analysis* **36**, 246-253 (2004).
20. Fabio, V. *et al.* *Improving Biocompatibility of Implantable Metals by Nanoscale Modification of Surfaces: An Overview of Strategies, Fabrication Methods, and Challenges*. 996-1006 (2009).doi:10.1002/sml.200801186
21. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M.Wieland, B. Keller, H. S. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly -Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-872 (2007).
22. Cumpson, P. Angle-resolved XPS and AES: Depth-resolution Limits and a General Comparison of Properties of Depth-profile Reconstruction Methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **73**, 25-52 (1995).
23. Briggs, D. *et al.* *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. Surface and Interface Analysis* **3**, (Perkin-Elmer Corp., Physical Electronics Division, Eden Prairie: Minnesota, 1979).
24. Sakamoto, H. *et al.* Effect of active hydroxyl groups on the interfacial bond strength of titanium with segmented polyurethane through gamma-mercapto propyl trimethoxysilane. *Dental materials journal* **27**, 81-92 (2008).
25. Tanaka, Y. *et al.* Active Hydroxyl Groups on Surface Oxide Film of Titanium, 316L Stainless Steel, and Cobalt-Chromium-Molybdenum Alloy and Its Effect on the Immobilization of Poly(Ethylene Glycol). *Materials Transactions* **49**, 805-811 (2008).
26. Hanawa, T., Hiromoto, S. & Asami, K. Characterization of the Surface Oxide Film of a Co-Cr-Mo Alloy After Being Located in Quasi-biological Environments Using XPS. *Applied Surface Science* **183**, 68-75 (2001).
27. Pegueroles Neyra, M. Interactions Between Titanium Surfaces and Biological Components. 263 (2009).
28. Wennerberg, A. & Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research* **20 Suppl 4**, 172-84 (2009).
29. Cohen, D. K. Glossary of Surface Texture Parameters. 39
30. Lévy, É. *Diccionario de física*. 537 (AKAL: 1993).
31. Shafrin, E. G. & Zisman, W. A. Constitutive Relations in the Wetting of Low Energy Surfaces and the Theory of the Retraction Method of Preparing Monolayers. *U.S Naval Research Laboratory* **1046**, 519-524 (1957).
32. Niinomi, M. Recent Research and Development in Titanium Alloys for Biomedical Applications and Healthcare Goods. *Science and Technology of Advanced Materials* **4**, 445-454 (2003).
33. Pegueroles, M. & Aparicio, C. Influencia del Proceso de Esterilización en la Mojabilidad del Titanio Modificado Superficialmente. *Materials Research* **12**, 80-87 (2005).

34. López Requejo, S. Propiedades Superficiales del Ti c.p., Esterilizado y Rugoso para Aplicaciones Biomédicas. 5-68 (2005).at <<http://hdl.handle.net/2099.1/5210>>
35. Zhao, G. *et al.* High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of biomedical materials research. Part A* **74**, 49-58 (2005).
36. Gonzalez Colominas, M. Optimización de aleaciones B-Ti con Bajo Módulo Elástico, para Aplicaciones Biomédicas. (2011).
37. Méndez-Vilas, A., Donoso, M. G., González-Carrasco, J. L. & González-Martín, M. L. Looking at the micro-topography of polished and blasted Ti-based biomaterials using atomic force microscopy and contact angle goniometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **52**, 157-66 (2006).
38. Arciniegas, M. Desarrollo de Nuevas Aleaciones de Ti Libres de Niquel para Aplicaciones Biomédicas. 299 (2008).
39. Landoulsi, J. *et al.* Silanization with APTES for Controlling the Interactions Between Stainless Steel and Biocomponents: Reality vs Expectation. *Biomaterials - Physics and Chemistry*, **5**, 99-126 (2011).
40. Xiao, S.-jun, Textor, M., Spencer, N. D., Sigrist, H. & Neucha, C.- Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Peptides* **7463**, 5507-5516 (2007).
41. Tlili, C. *et al.* A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. *Materials Science and Engineering: C* **28**, 861-868 (2008).
42. Iucci, G., Battocchio, C., Dettin, M., Ghezzi, F. & Polzonetti, G. An XPS Study on the Covalent Immobilization of Adhesion Peptides on a Glass Surface. *Solid State Sciences* **12**, 1861-1865 (2010).
43. Kocijan, A., Milosev, I. & Pihlar, B. Cobalt-based Alloys for Orthopaedic Applications Studied by Electrochemical and XPS Analysis. *Journal of materials science. Materials in medicine* **15**, 643-50 (2004).
44. Hanawa, T. *et al.* Amount of Hydroxyl Radical on Calcium-Ion-Implanted Titanium and Point of Zero Charge of Constituent Oxide of the Surface-Modified Layer. *Journal of materials science. Materials in medicine* **9**, 89-92 (1998).
45. John F. Moulder, William F. Stickle, Peter E. Sobol, K. D. B. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. (1992).
46. D. Briggs and M.P. Seah, J. W. and S. *Practical Surface Analysis by Auger and Photoelectron Spectroscopy*. 533 (1983).
47. Barr, T. L. An ESCA Study of the Termination of the Passivation of Elemental Metals. *The Journal of Physical Chemistry* **82**, 1801-1810 (1978).
48. Osakabe, Y., Tsuchiya, H. & Fujimoto, S. Characterization of Passive Films Formed on Co and Co-Cr Alloys. *Engineering* 600
49. Rossi, A., Elsener, B., Hähner, G., Textor, M. & Spencer, N. D. XPS, AES and ToF-SIMS investigation of surface films and the role of inclusions on pitting corrosion in austenitic stainless steels. *Surface and Interface Analysis* **29**, 460-467 (2000).

50. Aubriet, F., Poleunis, C. & Bertrand, P. Capabilities of static TOF-SIMS in the Differentiation of First-row Transition Metal Oxides. *Journal of mass spectrometry: JMS* **36**, 641-51 (2001).
51. Taylor, G. J. Supernova Confetti in Meteorites. Planetary. *Science Research Discoveries* (2010).at <[http://www.psr.d.hawaii.edu/Nov10 /supernova-nanoparticles.html](http://www.psr.d.hawaii.edu/Nov10/supernova-nanoparticles.html) (25/06/2012).>
52. Agency., B. N. E. S. . I. A. E. Water chemistry of nuclear reactor systems. *The conference organized by the British Nuclear Energy Society and held in Bournemouth* 568 (2000).
53. Yamada, H. *et al.* Analysis By Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy or Nuclear Products In Hydrogen Penetration Through Palladium. *Tenth International Conference on Cold Fusion* (2003).
54. Matinlinna, J. P., Ozcan, M., Lassila, L. V. J. & Vallittu, P. K. The Effect of a 3-MethacryloxypropyltrimethoxySilane and Vinyltriisopropoxysilane Blend and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the Shear Bond Strength of Ccomposite Resin to Titanium Metal. *Dental materials official publication of the Academy of Dental Materials* **20**, 804-813 (2004).
55. Fowler, D. E. & Rogozik, J. Oxidation of a Cobalt Chromium Alloy: An X-Ray Photoemission Spectroscopy Study. *J. Vac. Sci. Technol.* **6**, 928-932 (1998).

CAPÍTULO IV.

Caracterización Físico-Química del Proceso de Silanización de la Aleación de CoCr.

<i>CAPÍTULO IV</i>	109
<i>Caracterización Físico-Química del Proceso de Silanización</i>	109
IV.1 INTRODUCCIÓN	113
IV.1.1 OBJETIVOS.....	116
IV.1.1.1 OBJETIVO GENERAL.	116
IV.1.1.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.....	116
IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS	117
IV.2.1 MATERIALES.	117
IV.2.2 MÉTODOS	117
IV.2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	117
IV.2.2.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.....	117
IV.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	117
IV.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.	117
IV.3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.	118
IV.3.3 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS MUESTRAS SILANIZADAS.....	125
IV.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SUPERFICIES SILANIZADAS, EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	128
IV.5 BIBLIOGRAFÍA.....	130

Índice de Tablas del Capítulo III

Tabla IV 1 Alta Resolución por XPS de las Muestras de CoCr Silanizadas. 120
 Tabla IV 2 Estabilidad Química, Térmica y Mecánica de las Muestras de CoCr Silanizadas 127

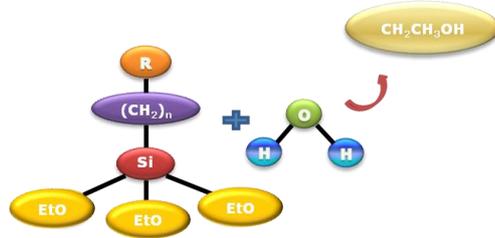
Índice de Figuras del Capítulo III

Figura IV 1 Hidrólisis del Silano 113
 Figura IV 2 Enlace del Silano con la Superficie Inorgánica 113
 Figura IV 3 Estructura Química de los Silanos Estudiados..... 114
 Figura IV 4 Enlaces APTES-Maleimido 114
 Figura IV 5 Enlaces APTES-Maleimido-Biomolécula 114
 Figura IV 6 Mojabilidad de las Superficies de CoCr Silanizadas 118
 Figura IV 7 Espectro Positivo de ToF SIMS de las Muestras de CoCr Silanizadas 119
 Figura IV 8 Espectro Negativo del ToF SIMS de las Muestras de CoCr Silanizadas 119
 Figura IV 9 Barrido General de las Muestras de CoCr Silanizadas 120
 Figura IV 10 Causas del Decrecimiento de Cl/Si. 121
 Figura IV 12 Grupo Imida. 124
 Figura IV 11 Deconvolución del Espectro de N 1s de las Muestras de CoCr silanizadas. 124
 Figura IV 13 Polimerización del APTES+Maleimido 124
 Figura IV 14 Estabilidad de la Mojabilidad de las Muestras de CoCr Silanizadas ... 126

IV.1 INTRODUCCIÓN

Una vez activadas las superficies, la siguiente etapa es conseguir desarrollar una interfaz de conexión entre las superficies de biomateriales y el sistema biológico, lo cual puede conseguirse mediante diferentes técnicas, siendo la silanización una de las más populares.¹

a)Hidrólisis



b) Condensación

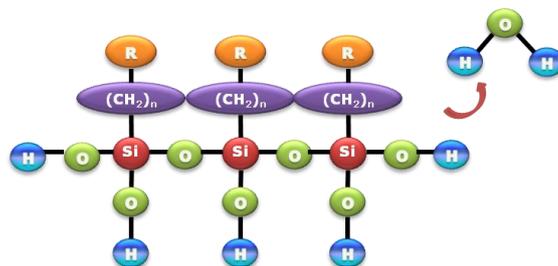


Figura IV 1 Hidrólisis del Silano

En el diseño de trabajo de esta tesis, la silanización consiste en una reacción química entre organosilanos funcionales y grupos hidroxilo (OH^-), superficiales del metal, ya que el silano en solución tiende a hidrolizarse, produciendo enlaces -Si-O- , conocidos como silanoles. Estos son intermediarios altamente reactivos y son los responsables de la formación del enlace con el sustrato. Los silanoles se condensan con otros silanoles para formar siloxanos (-Si-O-Si-) o una cadena de silanos polimerizada (Figura IV 1).²

Finalmente el silano condensado entra en contacto con la superficie previamente activada y enriquecida en grupos OH^- activos. (Figura IV 2) En una fase inicial los grupos OH^- del silano forman uniones de hidrógeno con los hidroxilos activos sobre la superficie. Estas uniones son débiles, por tanto el oxígeno que esta enlazado a la superficie metálica busca enlazarse con el Si para formar un enlace covalente de -Si-O-metal y se libera una molécula de agua.²

En la silanización de las superficies metálicas, lo que se genera finalmente es la deposición de una capa o de múltiples capas de silanos. Sin embargo, los estudios sobre el grado de recubrimiento, la orientación y organización de la capa resultante hasta el presente no están totalmente resueltos. A nivel de organización dicha capa puede crecer de manera uniforme o en forma de islas, resultando islas de moléculas de silanos con un relativo alineamiento y orientación vertical de las cadenas.³

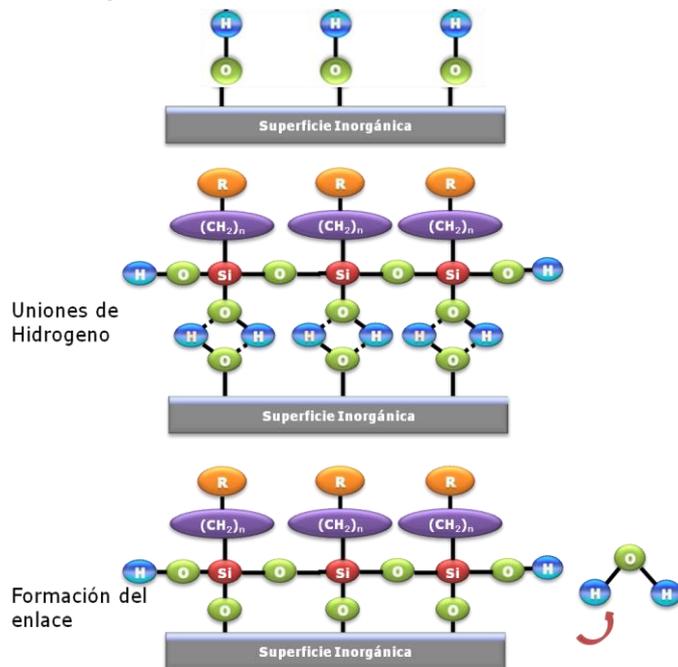


Figura IV 2 Enlace del Silano con la Superficie Inorgánica

Tal como se mencionó en el

capítulo I, en este trabajo se usarán 3 organosilanos diferentes (*Figura IV 3*):

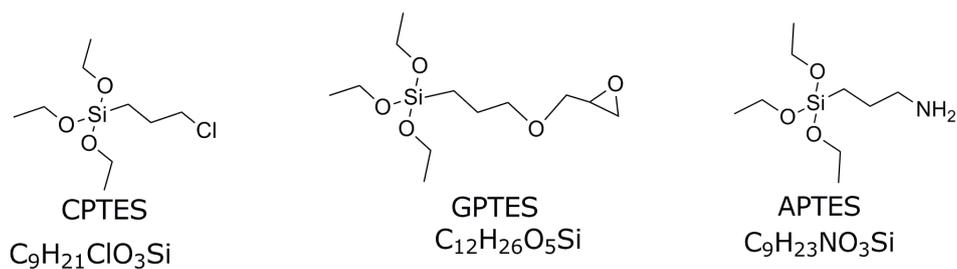


Figura IV 3 Estructura Química de los Silanos Estudiados

- 1) 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES), el cual fue seleccionado por que proporciona una fácil interacción a pH básico con las biomoléculas y es fácilmente detectable, mediante el cloro de su grupo organofuncional.^{4,5}
- 2) 3-glicidoxipropil-trietoxi-silano (GPTES), cuyo grupo funcional es un grupo epoxi, que le proporciona una elevada reactividad hacia los grupos nucleófilos y es altamente reactivo a pH alto y/o neutro, lo cual lo hace interesante a la hora de inmovilizar biomoléculas, ya que evita su desnaturalización.^{5,6}
- 3) 3-aminopropil-trietoxi-silano (APTES) es uno de los más estudiados y es muy bien conocido por su capacidad de enlazar biomoléculas a pH neutro.⁷

En el caso de las muestras silanizadas con APTES, se tiene que este organosilano tiene como organofuncional un grupo amina (NH_2) y con el objeto de conseguir un enlace de la biomolécula a través de los carbonos, se procedió a usar un crosslinker (N-Succinimidyl 3-maleimido-propionate) tal como se ve en la *Figura IV 4*.

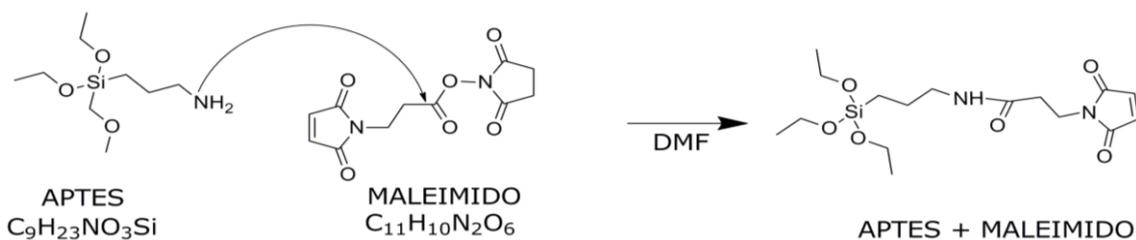


Figura IV 4 Enlaces APTES-Maleimido

El hecho de usar este agente entrecruzante (maleimido) sobre las muestras con APTES, se justifica, si se prevé que se desea unir las biomoléculas a través del tío de la cisteína con un carbono del silano y no con una amina. De tal manera que en el momento de la caracterización de la inmovilización de las biomoléculas mediante el XPS un enlace C-S indicará la unión de la biomolécula a los silanos y en el caso específico de las muestras silanizadas con APTES, este enlace lo logrará el maleimido (*Figura IV 5*).⁸

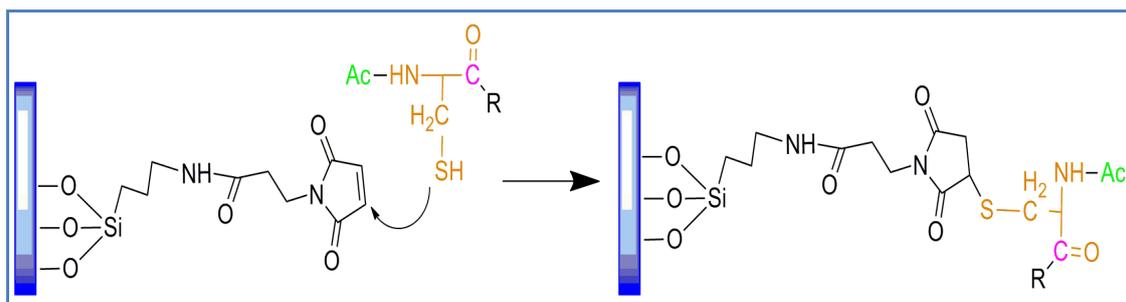


Figura IV 5 Enlaces APTES-Maleimido-Biomolécula

La selección del mejor silano estará basada en estudios de estabilidad química, térmica y mecánica; con el objeto de usar esto como una estrategia para inferir la presencia de enlaces covalente entre el metal y los silanos, mediante la determinación del porcentaje de silicio adherido sobre las superficies y por la presencia de enlace Si-O-metal.

Por tanto dentro de los parámetros de medición del proceso de silanización, se han de considerar como variables: el enlace covalente del silicio con los OH⁻ unidos al metal (Si-O-metal) y la estabilidad de dicha unión tras un ensayo de estabilidad térmica, química y mecánica.

A lo largo de este capítulo se detallará el procedimiento de caracterización físico-química de las superficies silanizadas, se presentaran los resultados experimentales obtenidos y su respectiva discusión.

IV.1.1 OBJETIVOS.

IV.1.1.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el proceso de silanización para la aleación de CoCr ASTM F1537 previamente activada y seleccionar el mejor organosilano en términos de porcentajes de silano adherido y estabilidad de la unión silano-metal.

En este estudio se utilizarán tres organosilanos:

- CPTES
- GPTES
- APTES + Maleimido

IV.1.1.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

- **Caracterización físico-química del proceso de silanización obtenido para cada organosilano estudiado**

A priori, aquellas superficies metálicas que presentan un mayor porcentaje de organosilanos adheridos, serán las más susceptibles a enlazar mayor cantidad de biomoléculas y por tanto de obtener una mejor respuesta celular.

Para conseguir este objetivo se procedió a:

- La búsqueda de técnicas de caracterización superficial que permitan identificar la presencia de los organosilanos en superficie.
- La caracterización físico-química y cuantificación del silicio presente en las superficies silanizadas, antes y después del proceso de silanización
- **Determinación de la estabilidad térmica, química y mecánica de la unión silano-metal**

Los procesos de silanización deben formar enlaces covalentes o lo suficientemente fuertes, por tanto si se demuestra que son estables térmica, química y mecánicamente, se podría garantizar que se ha creado una interfaz eficiente para la unión metal-silano-biomolécula.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1 MATERIALES.

Se emplearon 3 silanos sobre una aleación comercial de CoCr aprobada por la ASTM F1537, previamente activada con ácido nítrico; la nomenclatura usada para cada tipo de muestra fue:

- Aleación de CoCr con CPTES CoC
- Aleación de CoCr con GPTES CoG
- Aleación de CoCr con APTES +Maleimido CoAM

Para cada uno de los ensayos, se utilizaron triplicados de cada una de las muestras.

IV.2.2 MÉTODOS

IV.2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para la silanización, se colocaron las muestras previamente activadas en un matraz erlenmeyer creando una atmósfera inerte de nitrógeno, se le añadió un disolvente (pentano), una base (N,N-Diisopropyletilamina (DIPEA)), y el organosilano. Posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente, y en agitación constante durante una hora. Luego se lavaron con agua, etanol y acetona, se secaron con nitrógeno y finalmente se conservaron en el desecador, para la posterior inmovilización de las biomoléculas.

Para enlazar el crosslinker, las muestras silanizadas con APTES fueron colocadas en una atmósfera inerte, donde se cubrieron con una solución de N,N-Dimetilformamida (DMF) y maleimido a una concentración de 2mg/ml. Las mismas se dejaron a temperatura ambiente, con agitación constante durante una hora. Seguidamente se lavaron con DMF, agua, etanol y acetona, luego se secaron y se conservaron en el desecador hasta la adhesión de las biomoléculas.^{9,10}

IV.2.2.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.

Las técnicas utilizadas para la caracterización físico-química empleadas en este capítulo fueron XPS, ángulo de contacto estático y ToF SIMS. Tanto el principio de funcionamiento, como las condiciones de ensayo de cada una de ellas fueron descritas en el capítulo II.

IV.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

IV.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.

Resultados de Ángulo de Contacto.

Para la caracterización física de las capas silanizadas se utilizó la técnica de ángulo de contacto, que permite conocer cualitativamente si se han efectuado modificaciones superficiales.

La *Figura IV 6* muestra, como luego del proceso de silanización todas las superficies pasaron de un ángulo de contacto de aproximadamente 34° a valores superiores a los 65° , lo cual comprueba que hubo una modificación superficial y que la silanización consigue modificar la hidrofiliicidad de las superficies.¹¹ Del mismo modo se puede observar que el crosslinker también produce cambios sobre la superficie silanizada con APTES; ya que el ángulo decrece de $\approx 89^\circ$ a $\approx 73^\circ$.

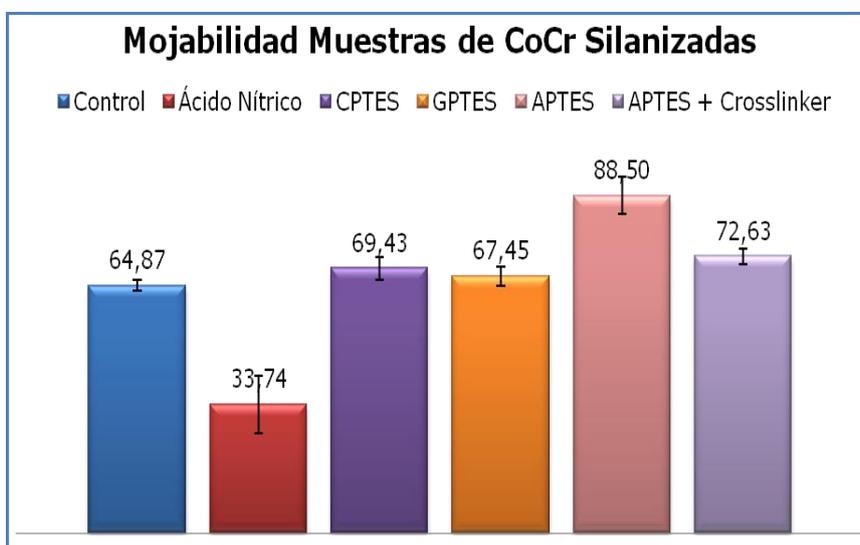


Figura IV 6 Mojabilidad de las Superficies de CoCr Silanizadas

En función de los resultados, se puede deducir que el proceso de silanización originó una modificación superficial y que la misma se ha dado de manera homogénea sobre todas las superficies, ya que la gota se ha colocado de manera aleatoria, en diferentes puntos de las muestras y todas ellas arrojan resultados similares.

Aun cuando se trabajó con silanos que poseen distintos grupos funcionales (cloro, grupo epoxi y grupo amina), según los resultados obtenidos mediante el ángulo de contacto, parece que todos modifican la mojabilidad, sin embargo, con estos resultados no se puede inferir, ¿cuál de ellos es más eficiente?, debido a que esta técnica, no proporciona información química, ni con ella se puede determinar la manera cómo se han enlazado los silanos a la superficie. Por tanto, se procedió a utilizar técnicas de caracterización química de las superficies, para determinar la presencia de cada uno de los silanos y poder conocer la forma como los mismos se han enlazado la superficie.

IV.3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.

Resultados de ToF SIMS.

Para la caracterización química de las superficies se utilizó el ToF SIMS, ya que esta técnica es capaz de estimar fragmentos de los compuestos químicos que se encuentran en la capa más superficial de la muestras (entre 0 y 5nm). Para ello se realizó una comparación entre muestras sin tratamiento y muestras silanizadas (*Figura IV 8* y *Figura IV 7*).

En función a los resultados obtenidos, se pudo determinar la efectividad del proceso de silanización, mediante la identificación de porciones de moléculas o del organosilano, tales como Si^+ , Si-O^+ y O-Si-O^- .

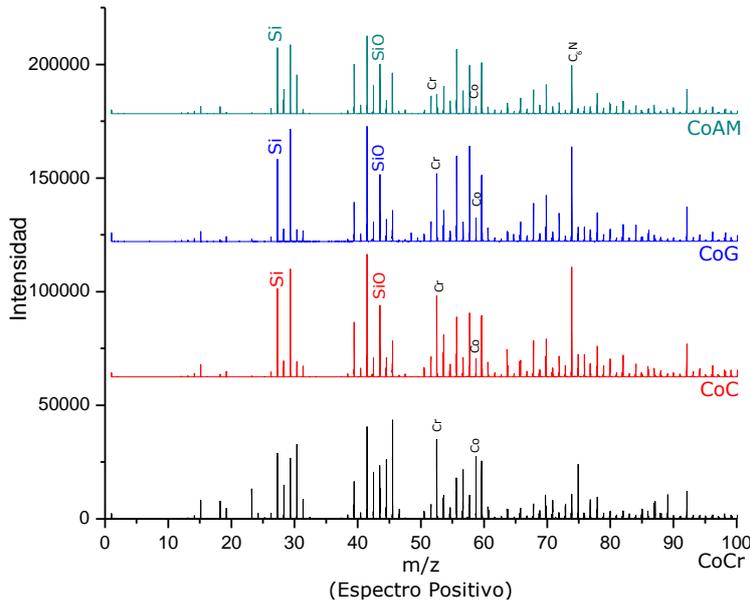


Figura IV 7 Espectro Positivo de ToF SIMS de las Muestras de CoCr Silanizadas

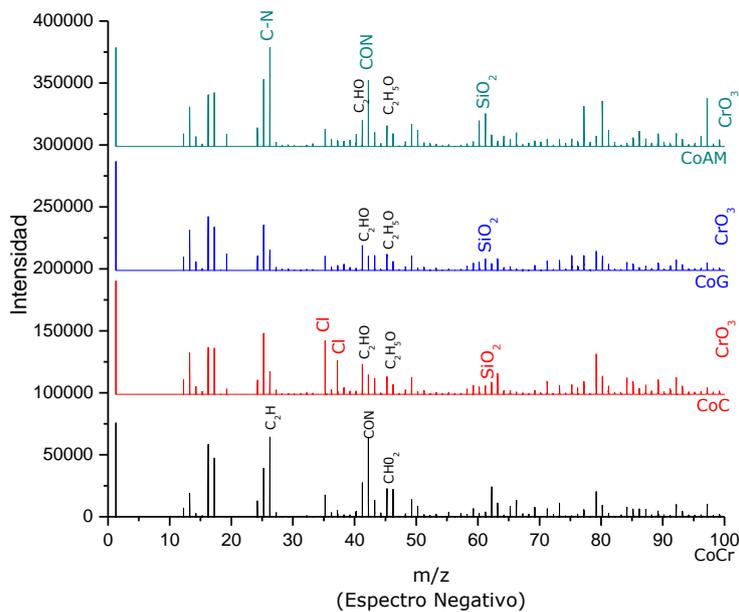


Figura IV 8 Espectro Negativo del ToF SIMS de las Muestras de CoCr Silanizadas

Como puede observarse en el espectro positivo (Figura IV 7), todas las muestras silanizadas exhiben la presencia de Si^+ y Si-O^+ ($m/z \approx 28$ y 44 respectivamente). Al mismo tiempo se puede notar la disminución de la intensidad de los picos de Cr^+ ($m/z \approx 53$) y de Co^+ ($m/z \approx 59$), atribuida al recubrimiento que hace el silano sobre la superficie.¹²⁻²⁰

Para el espectro negativo (Figura IV 8), se detecta la presencia de los organosilanos en superficie, mediante la presencia de O-Si-O^- ($m/z \approx 60$). Adicionalmente en este espectro, se confirma la presencia del CPTES por el Cl^- ($m/z \approx 35$ y 37) y del APTES+Ma por el incremento de los picos correspondientes a CN^- ($m/z \approx 26$) y CON^- ($m/z \approx 42$), los cuales son enlaces que se encuentran presentes en el crosslinker. También puede notarse en el espectro la presencia de O^- ($m/z \approx 16$), OH^- ($m/z \approx 17$) CrO_3^- ($m/z \approx 100$) y de especies orgánicas ($m/z \approx 42$ y 45).^{14,18,19,21}

La identificación de fragmentos de organosilanos, confirma de la presencia de los mismos en la superficie, lo cual ya sugiere un buen resultado, sin embargo, esta técnica no permite determinar si se encuentran fisiorbidos o enlazados covalentemente, por tanto, continúa sin esclarecerse, ¿de qué manera se encuentran enlazados los organosilanos a las superficies?

Resultados de XPS.

Con el fin de profundizar el tipo de enlace y de obtener medidas semicuantitativas, se realizó un análisis de XPS, haciendo inicialmente un barrido general (Figura IV 9).

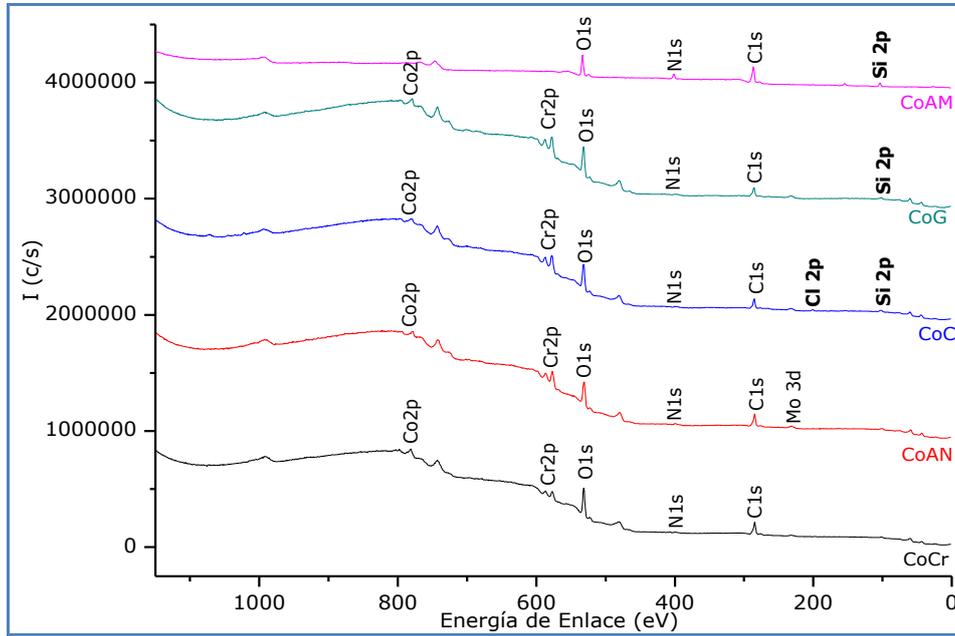


Figura IV 9 Barrido General de las Muestras de CoCr Silanizadas

Tabla IV 1 Alta Resolución por XPS de las Muestras de CoCr Silanizadas.

PICOS		CoCr	CoAN	CoC	CoG	CoAM	B.E.
C1s		48±2.2	36±0.4	34±2.6	33±1.7	59±3.1	
C-H, C-C	C1	29	29	27	20	30	284.6 ± 0.2
C=O, C-OH	C2	9	4	4	7	20	285.9 ± 0.2
C-O, N-C=O	C3	5	0	1	3	5	287.6 ± 0.2
Al ₂ O ₃ , COOH, Grupo Imida	C4	5	3	2	3	4	288.6 ± 0.4
N1s		2±0.3	4±0.3	2±0.3	2±0.2	9±0.7	
CrN, -C=NH	N1	0.6	1.2	1.4	0.9	0.0	397.6 ± 0.1
NCO, C-N, NH ₂ , Grupo Imida	N2	1.4	2.8	0.6	1.1	9.0	400.3 ± 0.5
O1s		42±2.3	49±0.3	41±1.8	44±0.9	25±1.7	
O ²⁻ ,	O1	15	10	20	20	1	29.9 ± 0.2
OH ⁻ , Si-O-Metal	O2	19	35	15	16	7	531.2 ± 0.1
H ₂ O, -C-O, C=O	O3	8	4	6	8	18	532.6 ± 0.5
Si2s		0±0.0	0±0.0	3±0.3	2±0.1	7±0.5	152.5 ± 0.3
Cl2p		0±0.0	0±0.0	2±0.1	0±0.0	0±0.0	199.9 ± 0.0
Cr2p		4±0.0	6±0.2	12±0.8	14±0.6	0±0.0	
Co2p		3±0.3	3±0.0	5±0.2	4±0.0	0±0.0	
Mo3d		1±0.0	2±0.0	1±0.0	1±0.0	0±0.0	
O2/Si				5.00	8.00	1.00	
Cl/Si				0.67			
N2/Si						1.29	

Si se observa la *Tabla IV 1*, se tiene en las líneas con fondo sombreado la composición química en porcentaje atómico de las muestras a estudiar, la cual representa la media de los valores obtenidos de los espectros de multiregión.

Las líneas con fondo en blanco, representan los análisis de los estudios de alta resolución para los elementos seleccionados (C 1s, O 1s y N 1s)

Pico de Si 2s.

El criterio para identificar la presencia del organosilano sobre las superficies silanizadas, es mediante la detección de silicio. Los resultados arrojan la presencia de silicio a un nivel de energía de enlace de 152.5 ± 0.3 eV, valor para el cual el Si es tetravalente. A priori, parece que para el caso del APTES+Ma, la silanización ha sido mejor (7% de Si 2p), si se compara con los otros silanos (CPTES: 3% y GPTES: 2%). Cabe destacar que aun cuando el pico que emite mayor intensidad es el correspondiente al Si 2p, la señal de silicio que se analizó fue el Si 2s debido a que el espectro de Si 2p emite su señal a 99 eV y el Co 3s a 101 eV, motivo por el cual la información del Si y del Co en este rango de de energía de enlace pueden verse solapadas.

Ya que el pico que se tomó fue el Si 2s, la señal obtenida solo permite determinar la presencia de silicio sobre la superficie, no obstante, no tiene la resolución suficiente como para ser analizada a través de un estudio de alta resolución. Por tanto y en función de que las muestras sin silanizar no exhiben la presencia de Si 2s, se ha considerado que la presencia del silicio es debida al proceso de silanización.

Pico de Cl 2p

Con respecto Cl 2p, este elemento aparece en las muestras silanizadas con CPTES, debido a que este organosilano contiene cloro en su organosilano funcional, por tanto, su presencia indica la presencia de este silano en superficie. Para evaluar la efectividad del CPTES se realizó el cociente entre el Cl y el Si (silicio enlazado al metal), teniendo que la relación teórica Cl/Si =1, sin embargo experimentalmente se calculó dicha ratio y arrojó un valor de 0.67. La explicación de la disminución de este cociente hipotéticamente podría deberse a que independiente o paralelamente este ocurriendo:

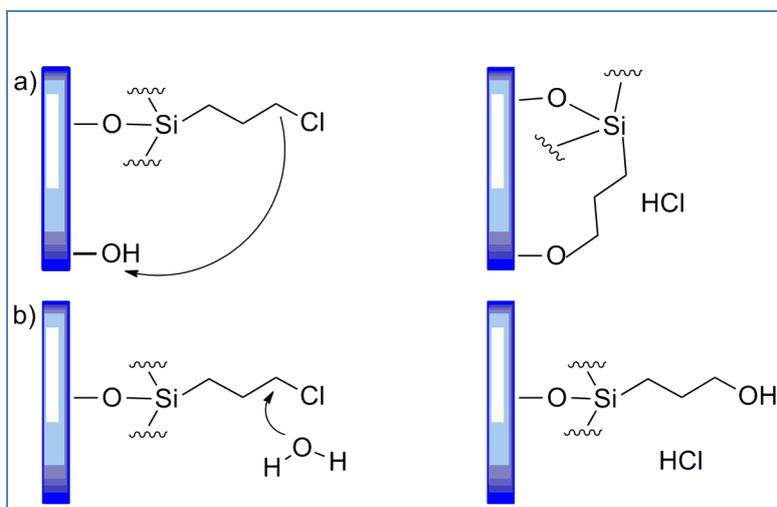


Figura IV 10 Causas del Decrecimiento de Cl/Si.

1) Al enlazarse los silanos, algunos OH-act quedan libres y reaccionan con el Cl, efectuando un ataque nucleófilo y formando un enlace C-O con la consecuente liberación de HCl (*Figura IV 10.a*).

2) No se ha conseguido trabajar en un ambiente 100% anhídrido, por fallas en el proceso de manipulación de los reactivos en el laboratorio y por la presencia de agua absorbida en la superficie de las muestras, por tanto, el agua puede contribuir a ataques nucleófilos, originando enlaces C-OH y liberación de HCl (*Figura IV 10.b*).

De lo cual se puede decir que **el proceso de silanización a través del CPTES, presenta una efectividad de aproximadamente 67%, en función de la ratio Cl/Si.**

Cabe la pena destacar, que aún cuando el pico de Silicio que produce mayor resolución es el Si 2p, por tratarse de una aleación de CoCr, éste no puede ser utilizado, ya que se solapa con el pico de Co 3s; por tanto se está analizando el pico de Si 2s, lo cual puede traer como consecuencia una menor precisión de la medición.

Con el objeto de profundizar en el tipo de enlaces presentes sobre las superficies silanizadas se realizó un estudio de alta resolución del N 1s, C 1s y O 1s. Se considero el N 1s porque el APTES posee una amina (NH₂) y el maleimido contiene enlaces N-C, por tanto, aunque las muestras no hayan sido silanizadas, se han observados trazas de N 1s, indicando un incremento de éste la presencia del APTES+Ma.

Paralelamente también se analizaron por alta resolución el C 1s y O 1s, porque las cadenas carbonadas que conforman los silanos contienen ambos elementos y el enlace Si-O-metal puede ser detectado en el espectro del O 1s. Los resultados tanto del espectro de multiregiones como de la alta resolución se presentan en la *Tabla IV 1*, donde en la franja sombreada se presenta el porcentaje atómico para cada elemento (survey) y en las filas sin color de fondo, se presentan los resultados de las diferentes contribuciones o aportaciones obtenidas en las deconvoluciones de cada uno de los elementos anteriormente mencionados.

Pico de O 1s.

Los picos presentes en la deconvolución del espectro de O1s fueron presentados en el capítulo II, *Figura II.9*, en donde se presentaron al menos 3 contribuciones de diferentes especies de oxígeno.

Para el caso de las muestras silanizadas cada una de las contribuciones de los diferentes picos de oxígeno (O1, O2 y O3), pueden contener una o más especies, que al tener energía de enlaces tan cercanas, no se pueden deconvolucionar por separado.

Por ejemplo resultados mostrados en la *Tabla IV 1*, permiten determinar que a ≈ 529.9 eV (O1) además de los óxidos se tienen contribuciones provenientes del silano, por tanto, la asignación de la especie de oxígeno a este nivel de energía de enlace, se diferencia según la etapa de cada muestra, teniendo que para una muestra activada corresponde solo a los óxidos, sin embargo para una muestra silanizada, se atribuye tanto los óxidos como los enlaces O-Si.^{7,10,21-26}

La aparición del enlace O-Si, es un excelente resultado, ya que como puede observarse en las *Figura IV 1* y *Figura IV 2*, a partir del proceso de condensación de

los silanos, ya se ha formado este tipo de enlaces y que el mismo se mantiene hasta el momento que ocurre el enlace covalente O-Si-metal.

El nivel de enlace del segundo pico (O2 ubicado a ≈ 531.2 eV), como se mencionó en el capítulo I se asocia a los grupos hidroxilos (**OH-metal**) para las muestras sin silanos, y en las muestras silanizadas tienen también una contribución los grupos carboxilos de los enlaces O=C-N (propios del APTES y al Maleimido)^{7,21,22,24} y del enlace Si-**O-metal**,²⁷ cuya aparición indica que el silano, no solo, está sobre la superficie; sino que el mismo se encuentra enlazado al metal, cumpliéndose de este modo el objetivo del proceso de silanización.

El pico en O3 aumenta notoriamente en CoAM, por la gran cantidad de enlaces C=O propios del maleimido.²⁴

En condiciones ideales, donde se estima la formación de monocapas de silanos, cada órgano silano reacciona con un grupo hidroxilo del metal (ver *Figura IV 2*). Por tal razón se propone efectuar que el cociente entre los porcentajes atómicos de **O2/Si**, como una forma de realizar una valoración sobre el rendimiento del proceso de silanización; ya que O2 corresponde a los enlaces **OH-metal** y **Si-O-metal** y el Si es atribuido al silicio enlazado a la superficie (**Si-O-metal**).

Cada silano debe reaccionar con un OH⁻, por tanto el valor teórico de la ratio propuesta es igual a 1. Por lo cual experimentalmente si el resultado de este cociente se acerca a la unidad, significa que prácticamente todos los átomos de silicio están enlazados con el metal de la forma Si-O-metal, y por tanto se han consumido todos los grupos hidroxilos que habían en la superficie, en este caso el rendimiento de la reacción de silanización ha sido total. En la *Tabla IV 1* se aprecia que el cociente para APTES+Ma es 1.00 para el resto de los silanos se tiene que el CPTES posee un valor de 5.00 que es inferior al del GPTES (8.00).

De lo cual en función de la relación O2/Si el mejor resultado es presentado en las muestras silanizadas con APTES+Ma.

Obviamente pueden existir factores que afecten esta afirmación, no obstante a nivel experimental, cuanto más pequeño sea este cociente, significará una mayor efectividad del proceso. Por el contrario, si este cociente es muy grande, implica que hay grupos hidroxilos que no han reaccionado con los organosilanos, por tanto el proceso de silanización no ha sido completo, ya sea por que la concentración inicial de silano ha sido insuficiente o bien han quedado grupos OH⁻ sin reaccionar por diferentes causas (hidrólisis, estabilidad química-mecánica de los enlaces, entre otros).

Pico de N 1s.

De los organosilanos utilizados solo el APTES y el crosslinker poseen nitrógeno, por tanto un incremento de este pico para estas muestras, sugiere la presencia del silano sobre la superficie.

Sin embargo, para profundizar en los resultados se realizó la deconvolución del N 1s, presentando en la *Figura IV 11* la deconvolución de la muestra de CoCr tratada con ácido nítrico.

Si se observan los resultados, las muestras control, CPTES y GPTES contienen un bajo porcentaje de nitrógeno (2%) y el mismo procede de la contaminación. Sin embargo, es notorio el incremento del porcentaje atómico para las muestras de

CoAM (9%), en el pico de ≈ 400 eV, que corresponde a la presencia del grupo imida (Figura IV 12), presente en el maleimido y se encuentra constituido por dos grupos carbonilos enlazados al nitrógeno.^{2,7,10,21,22,28}

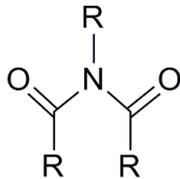


Figura IV 12 Grupo Imida.

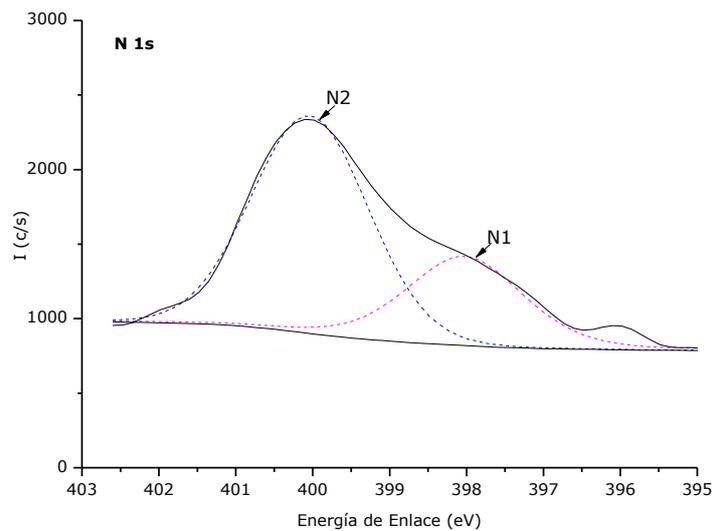


Figura IV 11 Deconvolución del Espectro de N 1s de las Muestras de CoCr silanizadas.

Al observar la Tabla IV 1, el grupo imida corresponde al pico N2 y la contaminación proveniente de la atmósfera y a los residuos del tratamiento con ácido nítrico, son los que originan el pico N1 (Figura IV 11). Lo cual confirma que el aumento del nitrógeno es debido al proceso de la silanización.

Con el objeto de cuantificar estos resultados se realizó la ratio N/Si que teóricamente para el APTES con maleimido es igual a 2. En este estudio, para dicha ratio se consideró el nitrógeno proveniente del APTES+Ma (N2) y el silicio asociado a los órganos silanos. El **cociente de N2/Si fue de 1.29, aun cuando es un valor menor al esperado, una revisión bibliográfica, arrojó que existen otros autores, que también presentan valores inferiores para este cociente y lo atribuyen a un proceso de polimerización.**^{10,22,26}

Por ejemplo, David et han adjudicado este decrecimiento a la polimerización lateral, que disminuye la concentración de los grupos de aminas libres sobre la superficie,²² en sus trabajos encontraron una relación de 1.20 lo cual es similar a lo obtenido en este estudio.

Ahora bien, ¿en qué consiste dicha polimerización?

El proceso de polimerización es debido a que algunas aminas del APTES no han reaccionado con el crosslinker y se enlazan por un carbono del maleimido, teniéndose en este momento una relación de 2Si:3 N (Figura IV 13).

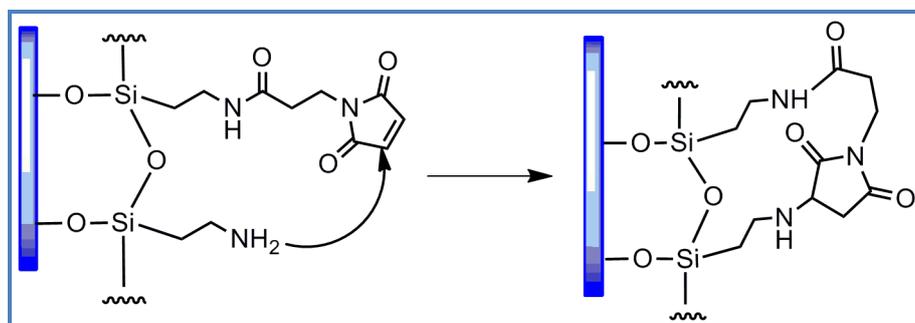


Figura IV 13 Polimerización del APTES+Maleimido

No obstante al correlacionar los resultados de la ratio O_2/Si , con los del cociente N_2/Si_2 , se podría decir hipotéticamente, que el enlace del APTES con la superficie activada ha sido altamente eficiente, ya que O_2/Si fue 1. Sin embargo algunos grupos aminos del silano no interaccionaron con el crosslinker, permitiendo la polimerización cruzada ($N_2/Si=1.29$), disminuyendo con ello la eficiencia del proceso. Es conveniente saber que si se da una polimerización con el crosslinker, es un efecto no deseado, porque se observaría la presencia de gran cantidad de silano pero no toda ella tiene la posibilidad de reaccionar con las biomoléculas.

Pico de C 1s.

La deconvolución del pico de C 1s es mostrada en el capítulo III y como puede apreciarse en la *Tabla IV 1* la mayor parte del carbono detectado pertenece a la contaminación existente (C1 a 284.6 eV). No obstante, en las muestras de CoAM, se aprecia un aumento considerable del carbono enlazado de las formas: C-H, debido a que este organosilano con el crosslinker añadido tiene una mayor longitud de su cadena carbonada. Adicionalmente también refleja un incremento en el C2 (C=O), ya que tanto el APTES como el maleimido poseen este tipo de enlaces (*Figura IV 4*).^{7,10,21-24,29-32}

Por tanto, del estudio de XPS se puede extraer como conclusión que:

1) Es posible detectar la presencia de los organosilanos por medio de la aparición del pico de Si 2s el silicio, lo cual sugiere un enlace entre el silano y las superficies activadas.

2) Al mismo tiempo que en términos de densidad de silano y ratio O_2/Si , el APTES+Ma es el que arroja los mejores resultados, ya que tiene un valor igual a la unidad, lo cual implica que por cada OH de la superficie ocurrió la unión con un silicio de los organosilanos.

3) En el caso de las muestras silanizadas con CPTES, además de la presencia del Si 2s, se confirma la presencia del silano, mediante la aparición del pico de Cl 2p no obstante, el hecho no garantiza un ambiente 100% anhídrico, o una baja concentración de silanos en superficie produciendo una disminución de la efectividad del proceso de silanización, la cual se ve reflejada en una relación O_2/Si superior a 1 (5.00) y en términos de una ratio Cl/Si , menor a 1 (0.67).

4) Para la muestra silanizada con GPTES, al poseer un epoxy como grupo funcional, su efectividad solo pudo ser evaluada en función de la ratio O_2/Si , de lo cual se deduce, que aun cuando sobre la superficie se encuentra presente el silano, al establecer comparaciones con el resto de los silanos, ésta es la que arroja el peor comportamiento por tener el mayor valor de O_2/Si (8.00)

IV.3.3 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS MUESTRAS SILANIZADAS.

Puesto que los resultados del proceso de silanización difieren en porcentajes de Si para cada silano y en vista que no se pudo efectuar un estudio de alta resolución de este elemento, se procedió a realizar un ensayo de estabilidad térmica, química y mecánica, ya que la técnica de XPS mide enlaces de tipo iónico y covalente. Si un enlace permanece luego de este estudio de estabilidad el mismo puede ser

considerado, de tipo covalente, por tanto se tomó como criterio de selección del organosilano la presencia de enlaces covalentes producto de la silanización en términos de la estabilidad del porcentaje de Si 2s, luego del ensayo de estabilidad.

El diseño del ensayo consistió en:

- Sumergir las muestras silanizadas en una solución tampón de fosfato salino (PBS), que es una solución acuosa y salina con cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, donde los grupos fosfato mantienen el pH estable (pH 7). La osmolaridad coincide con la del cuerpo humano (isotónico), motivo por el cual es usada en investigaciones biológicas.
- Simultáneamente las muestras se colocaron a 37 °C, para simular la temperatura corporal y se les aplicó agitación constante a 150 rpm, durante 24 horas para evaluar su estabilidad mecánica.

La caracterización físico-química de este ensayo, se hizo mediante la evaluación de las modificaciones de hidrofiliicidad a través del ángulo de contacto y de la composición química de las superficies por medio del XPS.

Resultados de Ángulo de Contacto.

Hipotéticamente, una vez que las muestras silanizadas han sido sometidas a condiciones químicas, térmicas y mecánicas similares al organismo, la cantidad de silano que no se encuentre enlazado a la superficie se desprenderá con lo cual la mojabilidad superficial debería cambiar. Sin embargo, si el silano se encuentra enlazado covalentemente al metal, las superficies silanizadas han de poseer una mojabilidad similar antes y después del ensayo y diferente a la muestra activada con ácido nítrico.

La caracterización física, se muestra en la *Figura IV 14*, donde puede verse que

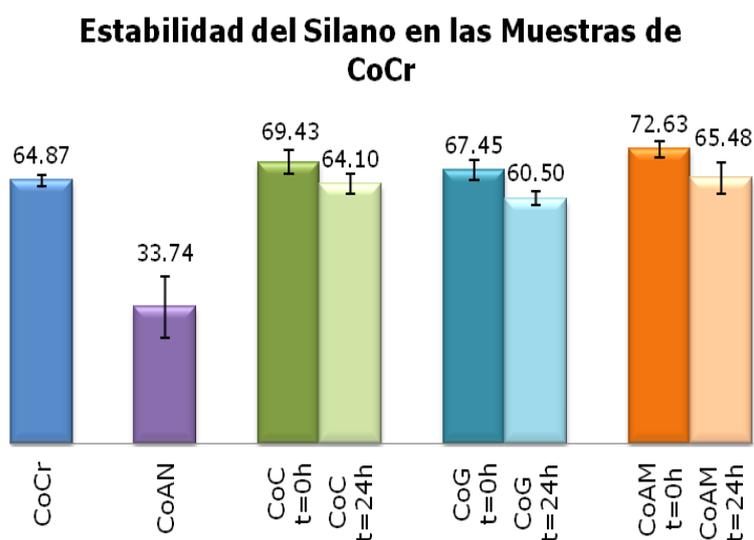


Figura IV 14 Estabilidad de la Mojabilidad de las Muestras de CoCr Silanizadas

después de 24 h todas las muestras, exhiben una pequeña disminución del ángulo de contacto, pero continúan siendo menos hidrofílicas que la muestra activada con ácido nítrico, lo cual sugiere que la modificación superficial efectuada por la silanización, se mantiene presente luego de ser sometida a las condiciones de ensayo.

Resultados de XPS

Con respecto a la caracterización química de la estabilidad de los organosilanos, se analizaron las muestras mediante el XPS, en este caso solo se tomaron en consideración los elementos que componen a los silanos, obteniéndose los resultados en porcentajes atómicos de la *Tabla IV 2*.

Tabla IV 2 Estabilidad Química, Térmica y Mecánica de las Muestras de CoCr Silanizadas

	C1s	N1s	O1s	Si2s	Cl2p
CPTES	42 \pm 3.2	3 \pm 0.4	49 \pm 3.6	3 \pm 0.4	2 \pm 0.3
CPTES 24	48 \pm 1.6	1 \pm 0.1	48 \pm 1.5	2 \pm 0.1	1 \pm 0.1
GPTES	41 \pm 3.8	2 \pm 0.3	55 \pm 4.1	2 \pm 0.3	
GPTES 24	46 \pm 1.2	2 \pm 0.1	50 \pm 2.3	2 \pm 0.1	
APTES CL	59 \pm 3.7	10 \pm 0.6	24 \pm 1.5	7 \pm 0.5	
APTES CL 24	58 \pm 3.1	8 \pm 0.4	27 \pm 1.4	7 \pm 0.4	

Tal como puede verse en la *Tabla IV 2* y al analizar los resultados, pareciera que las muestras de CoAM, presentan mejores resultados en términos de cantidad de silano (7%), el cual además, permanece estable luego del ensayo de estabilidad. De igual manera puede verse que tanto CoC como CoG luego de 24 h también contienen Si 2s, lo cual es un indicador que todas las muestras continúan estando silanizadas y han soportado las condiciones del ensayo de estabilidad.

Un indicador de que el silano se encuentra enlazado covalentemente es que luego del ensayo de estabilidad continúa apareciendo el pico Si 2s, lo cual permite deducir que el proceso ha sido eficiente y se han conseguido los enlaces de O-Si-O y Si-O-metal, ya que con ello se demuestra que el enlace del silano al metal es estable.

En conclusión de este análisis se tiene que si bien es cierto que tanto el CPTES como el GPTES poseen prácticamente el mismo porcentaje de Si, después de las 24 horas, también es obvio que el CPTES muestra un comportamiento menos estable, ya que ha perdido más de la mitad del Si enlazado en su superficie. **Por lo anteriormente expuesto, aun cuando se ha demostrado que los tres silanos se han enlazado en las superficie, en función de la estabilidad de los enlaces de O-Si-O, Si-O-metal para las siguientes fases de la modificación biomimética de las superficies, se descartará el uso del CPTES sobre la aleación de CoCr.**

IV.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SUPERFICIES SILANIZADAS, EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

Del proceso de caracterización físico-química de las aleaciones de CoCr silanizadas, en función de los objetivos específicos planteados se puede concluir que:

1) Caracterización físico-química del proceso de silanización obtenido para cada organosilano estudiado

- La espectroscopia de rayos X (XPS), ha sido una excelente técnica para la caracterización química de las superficies silanizadas; ya que por medio de ella fue posible detectar los átomos de Si y los enlaces siloxanos (Si-O-metal), producto del proceso de silanización (ver *Figura IV 2*).

- Para la caracterización física de las muestras silanizadas, se determinó la mojabilidad de las mismas, donde se partió de una muestra activada con ácido nítrico (AN), cuyo valor de ángulo de contacto fue de $\approx 34^\circ$. Luego del proceso de silanización todas las superficies arrojaron valores superiores a los 65° , lo cual comprueba que hubo una modificación superficial, sin importar los grupos funcionales de cada organosilano (cloro, grupo epoxi y grupo amina) y que la silanización consigue modificar la hidrofiliidad de las superficies. Del mismo modo se puede observar que el crosslinker también produce cambios sobre la superficie silanizada con APTES; ya que el ángulo decrece de $\approx 89^\circ$ a $\approx 73^\circ$ (*Figura IV 6*). Adicionalmente se puede dilucidar que la silanización se ha producido de manera homogénea sobre cada una de las superficies; ya que aun cuando la gota ha sido colocada aleatoriamente en diferentes puntos de las muestras, todas ellas arrojan resultados similares.

- Por medio del ToF SIMS se pudo determinar la efectividad del proceso de silanización, ya que al estarse midiendo a una profundidad entre 0 y 5nm de la capa superficial, se lograron detectar fragmentos de los organosilanos (Si^+ , Si-O^+ y O-Si-O^-) y para las muestras silanizadas con CPTES, se observó la presencia del Cl^- que es el grupo funcional de éste organosilano; estos resultados indican la presencia de los silanos sobre la superficie de las muestras. (*Figura IV 7* y *Figura IV 8*), más no dan información acerca del enlace del silano con la superficie

- Para profundizar en el tipo de enlace y obtener medidas semicuantitativas, se analizaron las muestras mediante XPS. El criterio para determinar la presencia de los órganos silanos, fue la presencia del Si 2s, donde resultó que el proceso más eficiente fue la silanización de las muestras con APTES+Ma, ya que: 1) Presentó una mayor concentración en porcentaje atómico de Si 2s (APTES+Ma: 7%, CPTES 3% y GPTES 2%) y 2) En condiciones ideales por cada grupo hidroxilo del metal debe reaccionar un organosilano; por ende la relación entre los OH^- de las superficies activadas (detectados en el pico O2) y el Si de los silanos, ha de ser igual a 1. En esta tesis realizando la ratio O2/Si se obtuvo: CoAM: 1.00, CoC: 5.00 y CoG: 8.00, donde es evidente que el mejor resultado lo presentan las muestras silanizadas con APTES+Ma, ver *Tabla IV 1*.

2) Determinación de la estabilidad térmica, química y mecánica de la unión silano-metal.

Se diseñó un experimento que permitió evaluar la estabilidad de los silanos, una vez enlazados al metal. Si un enlace permanece luego de un estudio de estabilidad química, térmica y mecánica, puede ser considerado de tipo covalente y se tomó como criterio de selección la estabilidad de la mojabilidad y de la presencia de los enlaces Si-O-Metal producto de la silanización. Los resultados obtenidos permiten afirmar que en la aleación de CoCr el GPTES y el APTES+Ma, son organosilanos que se adhieren sobre la superficie, con enlaces que son estables térmica, química y mecánicamente.

Por lo expuesto anteriormente se puede concluir que el proceso de silanización produce modificaciones físicas de las superficies, ya que modifica la mojabilidad de las muestra aumentando el ángulo de contacto de las mismas. Al mismo tiempo mediante la caracterización química se deduce que los tres silanos se adhieren sobre las superficies, no obstante demostraron ser más estables el APTES+Ma y el GPTES, en términos de cantidad de silicio y estabilidad del mismo.

IV.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo-Hernández, M. Characterization of Biofunctional Thin Films Deposited by Activated Vapor Silanization. *Journal Materials Res.* **23**, 1931-1939 (2008).
2. Plueddemann, E. P. Silane Coupling Agents: Connecting Across Boundaries. 235 (1982).at <<http://www.gelest.com/goods/pdf/couplingagents.pdf>>
3. Maoz, R. & Quint, P. Hydrogen-bonded multilayers of self-assembling silanes: structure elucidation by combined Fourier transform infra-red spectroscopy and X-ray scattering techniques. *Supramolecular Science* **2**, 9-24 (1995).
4. Godoy, M., Sevilla, P. & Gil, F. J. Unión de péptidos a superficies de titanio para la mejora de la osteointegración. *Biomecánica* **17**, 60-68 (2009).
5. Sevilla, P., Godoy, M., Salvagni, E., Rodríguez, D. & Gil, F. J. Biofunctionalization of titanium surfaces for osseointegration process improvement. *Journal of Physics: Conference Series 252 012009* **252**, 6 (2010).
6. Han, Y. Label-free detection of biomolecules by a field-effect transistor microarray biosensor with bio-functionalized gate surfaces. *Institute of Bio- and Nanosystem jùl (Berichte des Forschungszentrums Julich)* 159 (2006).
7. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M.Wieland, B. Keller, H. S. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg – Gly – Asp – Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. **8**, 867-872 (2007).
8. Pierce NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers. 1-8at <<http://www.piercenet.com>>
9. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M.Wieland, B. Keller, H. S. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg–Gly –Asp–Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-872 (2007).
10. Xiao, S.-jun, Textor, M., Spencer, N. D., Sigrist, H. & Neucha, C.- Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Peptides* **7463**, 5507-5516 (2007).
11. Pesek, J. J. & Matyska, M. T. Methods for the Modification and Characterization of Oxide Surfaces. *Interface Science* **117**, 103-117 (1997).
12. Bexell, U. L. F. Surface Characterisation Using ToF-SIMS, AES and XPS of Silane Films and Organic Coatings Deposited on Metal Substrates. (2003).
13. Rossi, A., Elsener, B., Hähner, G., Textor, M. & Spencer, N. D. XPS, AES and ToF-SIMS investigation of surface films and the role of inclusions on pitting corrosion in austenitic stainless steels. *Surface and Interface Analysis* **29**, 460-467 (2000).
14. Aubriet, F., Poleunis, C. & Bertrand, P. Capabilities of static TOF-SIMS in the Differentiation of First-row Transition Metal Oxides. *Journal of mass spectrometry: JMS* **36**, 641-51 (2001).
15. Taylor, G. J. Supernova Confetti in Meteorites. Planetary. *Science Research Discoveries* (2010).at <<http://www.psr.d.hawaii.edu/Nov10 /supernova-nanoparticles.html> (25/06/2012).>

16. Agency., B. N. E. S. . I. A. E. Water chemistry of nuclear reactor systems. *The conference organized by the British Nuclear Energy Society and held in Bournemouth* 568 (2000).
17. Yamada, H. *et al.* Analysis By Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy of Nuclear Products In Hydrogen Penetration Through Palladium. *Tenth International Conference on Cold Fusion* (2003).
18. Lewis, a C. & Heard, P. J. The effects of Calcium Phosphate Deposition Upon Corrosion of CoCr Alloys and the Potential for Implant Failure. *Journal of biomedical materials research. Part A* **75**, 365-73 (2005).
19. Tognazzi, A. *et al.* ToF-SIMS investigation of ancient ceramics from the Quartaia Site, Tuscany (Italy). *Surface and Interface Analysis* n/a-n/a (2010).doi:10.1002/sia.3286
20. Hirokawa, K., Li, Z. & Tanaka, A. Role of Electronegativity in the Qualitative Inference of the ToF-SIMS Fragment Pattern of Inorganic Compounds. *Journal of Analytical Chemistry* 348-357 (2001).
21. Xiao, S.-J., Wieland, M. & Brunner, S. Surface reactions of 4-aminothiophenol with heterobifunctional crosslinkers bearing both succinimidyl ester and maleimide for biomolecular immobilization. *Journal of colloid and interface science* **290**, 172-83 (2005).
22. Davis, D. H., Giannoulis, C. S., Johnson, R. W., Desai, T. A. & Hal, D. Immobilization of RGD to < 1 1 1 > Silicon Surfaces for Enhanced Cell Adhesion and Proliferation. *Biomaterials* **23**, 4019-27 (2002).
23. Swan, E. E. L., Popat, K. C. & Desai, T. A. Peptide-immobilized nanoporous alumina membranes for enhanced osteoblast adhesion. *Biomaterials* **26**, 1969-76 (2005).
24. Landoulsi, J. *et al.* Silanization with APTES for Controlling the Interactions Between Stainless Steel and Biocomponents: Reality vs Expectation. *Biomaterials - Physics and Chemistry*, **5**, 99-126 (2011).
25. Yang, J., Shen, B., Zhou, Z., Pei, F. & Kang, P. Changes in cobalt and chromium levels after metal-on-metal hip resurfacing in young, active Chinese patients. *The Journal of arthroplasty* **26**, 65-70 (2011).
26. Iucci, G., Battocchio, C., Dettin, M., Ghezzi, F. & Polzonetti, G. An XPS Study on the Covalent Immobilization of Adhesion Peptides on a Glass Surface. *Solid State Sciences* **12**, 1861-1865 (2010).
27. Sargeant, T. D., Rao, M. S., Koh, C.-Y. & Stupp, S. I. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **29**, 1085-1098 (2008).
28. Martin, H. J., Schulz, K. H., Bumgardner, J. D. & Walters, K. B. XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **23**, 6645-51 (2007).
29. Cvelbar, U. *et al.* Oxygen Plasma Functionalization of Poly(p-phenylene sulphide). *Applied Surface Science* **253**, 8669-8673 (2007).
30. Sakamoto, H. *et al.* Effect of active hydroxyl groups on the interfacial bond strength of titanium with segmented polyurethane through gamma-mercapto propyl trimethoxysilane. *Dental materials journal* **27**, 81-92 (2008).

31. Tanaka, Y. *et al.* Active Hydroxyl Groups on Surface Oxide Film of Titanium, 316L Stainless Steel, and Cobalt-Chromium-Molybdenum Alloy and Its Effect on the Immobilization of Poly(Ethylene Glycol). *Materials Transactions* **49**, 805-811 (2008).
32. Tlili, C. *et al.* A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. *Materials Science and Engineering: C* **28**, 861-868 (2008).

CAPÍTULO V.

Caracterización Química del Proceso de Inmovilización de Biomoléculas en la Aleación de CoCr.

CAPÍTULO V.	133
<i>Caracterización Química del Proceso de Inmovilización de Biomoléculas</i>	133
V.1 INTRODUCCIÓN.....	137
V.1.1 OBJETIVOS.	139
V.1.1.1 OBJETIVO GENERAL.	139
V.1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	139
V.2 MATERIALES Y METODOS	141
V.2.1 MATERIALES	141
V.2.2 MÉTODOS.....	141
V.2.2.1.PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	141
V.2.2.2.CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.....	142
V.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	142
V.3.1.CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS.	142
V.3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS	143
V.3.2.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE ADHESIÓN DE PÉPTIDO A DIFERENTES pH	144
V.3.2.2 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO PARA LA ADHESIÓN DE PÉPTIDO SOBRE LOS DIFERENTES SILANOS.....	146
V.3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	146
V.3.4 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS BIOMOLÉCULAS INMOVILIZADAS EN SUPERFICIE.	153
V.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO ADHERIDO EN SUPERFICIE.	156
V.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LAS BIOMOLECULAS EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	158
V.5 BIBLIOGRAFÍA.....	160

Índice de Tablas del Capítulo V

Tabla V 1 Muestras utilizadas Aleación de CoCr 141

Tabla V 2 Composición Química de las Secuencias Peptídicas por XPS. 143

Tabla V 3 Tiempo Óptimo de Adhesión de Péptido en Función del pH..... 146

Tabla V 4 Concentración de Péptido Adherido en Función del pH..... 146

Tabla V 5 Composición Química en Porcentaje Atómico por XPS de las Muestras de CoCrG con Péptidos Adheridos en Superficie 148

Tabla V 6 Composición Química Porcentaje Atómico por XPS de las Muestras de CoCrAM con Péptidos Adheridos en Superficie 148

Tabla V 7 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras CoG con Péptidos. 150

Tabla V 8 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras CoAM con Péptidos. 151

Índice de Figuras del Capítulo V

Figura V 1 Enlaces Silano-Péptido: a) CPTES-Cys b) GPTES-Cys y c) APTES-Maleimido-Cys..... 137

Figura V 2 Secuencias Peptídicas Utilizadas 142

Figura V 3 Estructura de la Molécula del Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)..... 143

Figura V 4 Muestras con CGG-FITC en PBS (pH 7). 145

Figura V 5 Muestras con CGG-FITC en Carbonato de Sodio (pH 11) 145

Figura V 6 Mojabilidad de las Muestras de CoCr con Inmovilización de Péptidos .. 147

Figura V 7 Detección de Co y Mo..... 149

Figura V 8 Esquema de la secuencia Ac-CGGRGDS 150

Figura V 9 Estabilidad de la Mojabilidad de las secuencias Peptídicas en CoCr..... 153

Figura V 10 Estabilidad Química, Térmica y Mecánica del Péptido en Superficie .. 154

Figura V 11 Demostración de la Estabilidad del Péptido mediante la Deconvolución del N1S 155

Figura V 12 Concentración de Péptido Adherido sobre las superficies de CoCr 156

V.1 INTRODUCCIÓN

La meta de la modificación bioquímica de superficies, es inmovilizar biomoléculas (proteínas, encimas o péptidos bioactivos) sobre biomateriales, con el propósito de inducir la adhesión de células específicas y con ello conseguir el control de la interfaz tejido-implante.¹

Existe una gran diversidad de secuencias peptídicas que pueden ser usadas, sin embargo, como se ha explicado en el capítulo I, la selección de ellas condicionará la interacción de las células con el material. Por tanto, para este proyecto se realizará la inmovilización de los siguientes péptidos: CGGRGDS, CGGFHRIKA, CGGPHSRN y las mezclas 1:1 de CGGRGDS+CGGPHSRN y/o CGGRGDS+CGGFHRIKA, con el propósito de conseguir la regeneración de los tejidos óseo.

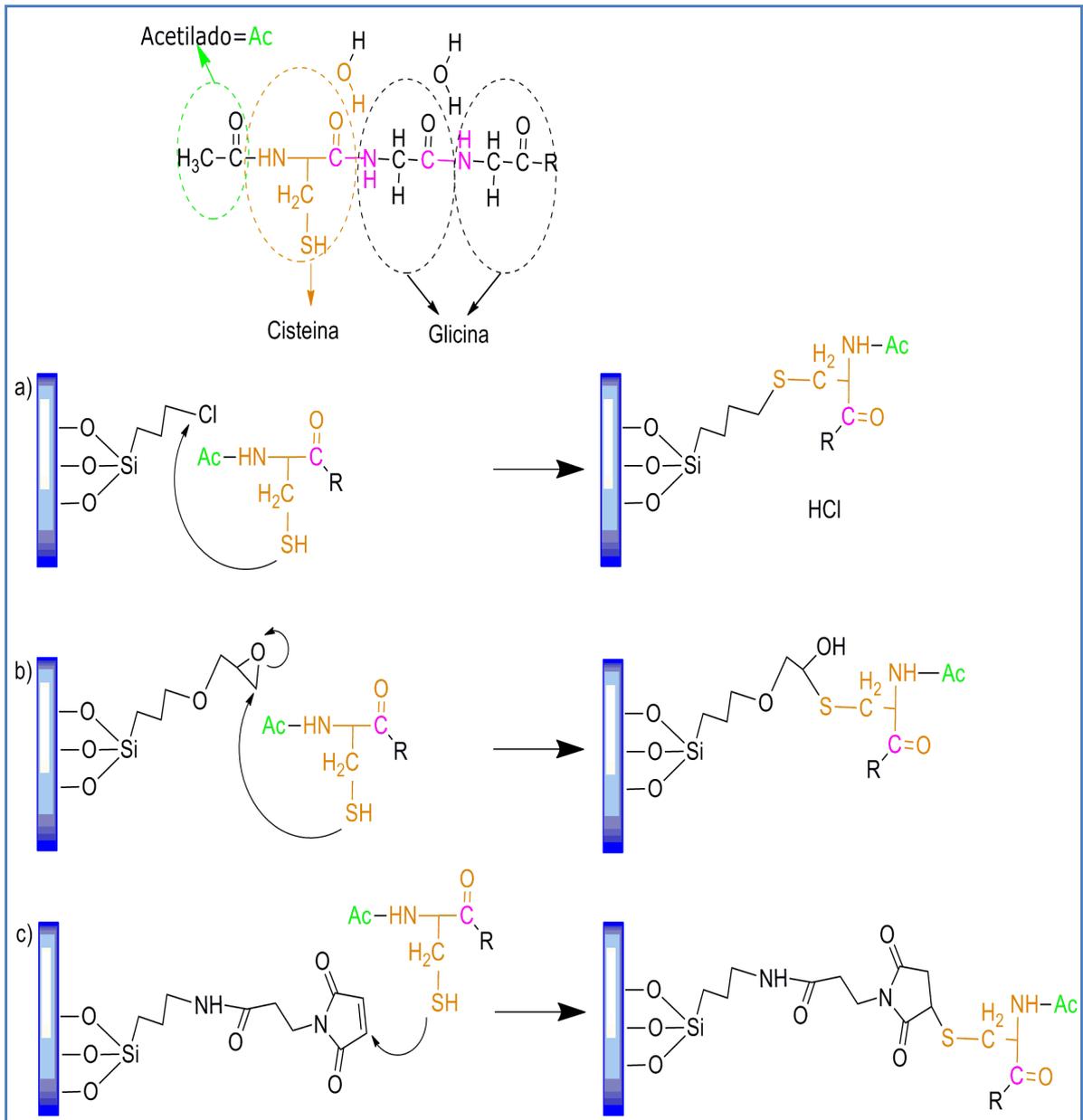


Figura V 1 Enlaces Silano-Péptido: a) CPTES-Cys b) GPTES-Cys y c) APTES-Maleimido-Cys

La estrategia utilizada comprende el uso de secuencias peptídicas cortas con una cisteína (Cys) y dos glicinas (Gly); que servirán de espaciadores entre el motivo reactivo y las superficies metálicas; se utilizó la Cys, ya que este aminoácido

contiene un átomo de azufre en su cadena lateral, que no solo es altamente reactivo, sino que simultáneamente podrá ser detectado por medio de técnicas de caracterización química de superficies (*Figura V 1*).

Otro parámetro de diseño, fue trabajar con péptidos acetilados, es decir, que tienen bloqueada la reacción por medio del grupo amino terminal, con lo cual, solo tienen la posibilidad de reaccionar con los silanos a través de la cadena lateral de la cisteína (-SH).

A lo largo de este capítulo se detallará el procedimiento de adhesión de biomoléculas (péptidos) y se presentará la caracterización físico-química de las superficies. Con todo ello, se desea obtener la fiabilidad de uso de un biomaterial metálico destinado a aplicaciones de regeneración de tejidos óseos, tanto en implantes dentales, como en ortopedia: prótesis de cadera y de rodilla.

V.1.1 OBJETIVOS.

V.1.1.1 OBJETIVO GENERAL.

Optimizar el proceso de inmovilización de biomoléculas para la aleación de CoCr ASTM F1537 previamente silanizada, en términos de porcentaje de péptido adherido y estabilidad de su enlace con las superficies metálicas.

En este estudio se evaluará la inmovilización de las siguientes secuencias peptídicas: CGGRGDS, CGGFHRIKA y CGGPHSRN. Y de forma paralela, se evaluará el efecto de las mezclas en relación 1:1 de CGGRGDS+CGGFHRIKA y de CGGRGDS+CGGPHSRN.

V.1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Detección de las secuencias peptídicas.

A la hora de caracterizar los péptidos adheridos sobre la superficie de un material, en la literatura se describen una serie de técnicas de caracterización, tales como: radiomarcado, espectroscopia de infrarrojos (ATIR-IR) o espectroscopia de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo (ToF SIMS).² Obviamente cada una de ellas presentan ventajas y limitaciones. Por lo cual para esta tesis se ha decidido explorar las posibilidades de la técnica de XPS para la caracterización de la capa de biomoléculas sobre las superficies silanizadas y de esta manera continuar con el hilo conductor de los capítulos anteriores, en función de la caracterización y optimización de superficies con XPS.

Por tanto para determinar las secuencias peptídicas utilizadas, se planteó:

- Detectar mediante XPS el azufre presente en la cisteína; ya que este aminoácido se encuentra en todas las secuencias estudiadas y la aparición de este elemento determinará la efectividad del proceso de inmovilización de la biomolécula.
- Identificar mediante estudios de alta resolución, los enlaces típicos de las secuencias peptídicas (grupos carboxilos, amida, guanidina y dipéptidos), así como también el enlace S-C, debido al enlace de la cisteína con los organosilanos.

Optimización del proceso de inmovilización de las secuencias peptídicas.

En el proceso de inmovilización de biomoléculas, deben tenerse en consideración factores como: 1) el pH con el que el grupo órgano funcional del silano reaccionará con la secuencia peptídica y 2) el tiempo de adhesión requerido para que se realice el enlace. Por tanto, para cada silano se estudiarán dichas variables, con el objeto de garantizar una unión metal-silano-biomolécula eficiente.

Caracterización físico-química del proceso de inmovilización de las secuencias peptídicas en superficies.

Los procesos de inmovilización introducirán modificaciones físicas en las superficies silanizadas y modificaran su composición química. A priori, aquellas superficies que presenten mayor variabilidad en la mojabilidad y mayor porcentaje de azufre, han

de contener mayor cantidad de péptido sobre la superficie, por tanto inducirán a una mejor respuesta celular.

Determinación de la estabilidad térmica, química y mecánica de la unión silano-biomolécula.

Se deben formar enlaces covalentes entre las superficies silanizadas y las secuencias peptídicas, por ello si se demuestra que el péptido permanece estable térmica, química y mecánicamente, se podría garantizar la efectividad del proceso.

V.2 MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1 MATERIALES

La nomenclatura usada para identificar cada una de las opciones fue: Co: aleación de CoCr, luego de la identificación del metal se colocó la inicial de cada silano (C:CPTES, G:GPTES, AM:APTES+Maleimido) y por último la inicial de cada motivo reactivo: (R:CGGRGDS, F:CGGFHRIKA, P:CGGPHSRN, RF:CGGRGDS+CGGFHRIKA y RP:CGGRGDS+CGGPHSRN).

Como se ha mencionado anteriormente las secuencias peptídicas fueron diseñadas, de tal manera que poseen el motivo reactivo unido a 3 aminoácidos (Cys-Gly-Gly), que además de servir de espaciadores, permiten una unión selectiva entre el carbón de los silanos y el grupo tiol de la cisteína. Aun cuando se ha reportado que el azufre es mucho más reactivo que el grupo amina, se decidió acetilar el péptido, para de esta manera tener bloqueadas las aminas y que el enlace solo tenga lugar por la cisteína.

Adicionalmente se trabajará con 2 mezclas, que bibliográficamente han reportado favorecer el proceso de adhesión, las mismas se realizaron en una relación de 1:1.

Los péptidos fueron comprados en GenScript (USA) y se inmovilizaron sobre las superficies silanizadas que arrojaron los mejores resultados en términos de silanización. (Tabla V 1)

Tabla V 1 Muestras utilizadas Aleación de CoCr

SILANO	CGGRGDS	CGGFHRIKA	CGGPHSRN	CGGRGDS + CGGFHRIKA	CGGRGDS + CGGPHSRN
GPTES	CoGR	CoGF	CoGP	CoGRF	CoGRP
APTES+Ma	CoAMR	CoAMF	CoAMP	CoAMRF	CoAMRP

V.2.2 MÉTODOS.

V.2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se utilizaron como disolventes:

- 1) solución tampón a pH 7 de fosfato salino (PBS) ó
- 2) una solución de carbonato de sodio, a pH 11.

Se prepararon soluciones de péptido a una concentración de 500 µg/ml de cada una de las secuencias peptídicas.

Una vez realizada la disolución del péptido se procedió a sumergir cada una de las muestras previamente silanizadas en las diferentes soluciones según los resultados de pH y tiempo de adhesión óptimos.

V.2.2.2. CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.

Como técnica de caracterización física del proceso se utilizó el ángulo de contacto y para la caracterización química de la superficie se evaluó mediante el XPS y la Microscopia Óptica por Fluorescencia. En cuanto a la cuantificación de la concentración de péptido adherido se usó una medición indirecta mediante el Espectrofotómetro UV/visible de mono haz (NANODROP).

V.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

V.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS.

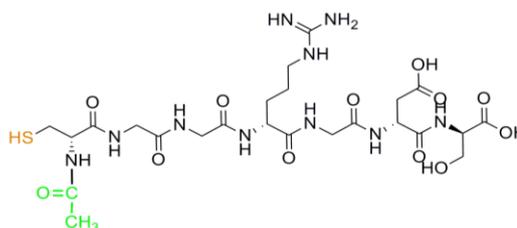
Antes de la evaluación del proceso de inmovilización de las biomoléculas sobre las superficies, se debía explorar si por medio de la técnica de XPS, era posible identificar y caracterizar las secuencias peptídicas, con la aparición del azufre. Para ello se partió de un estudio de XPS, en el que se analizaron directamente las secuencias peptídicas (en polvo), antes de ser inmovilizadas sobre las superficies metálicas.

Resultados de XPS.

En función de los aminoácidos de cada una de las secuencias peptídicas usadas (*Figura V 2*), se calculó el porcentaje teórico para cada uno de los elementos, excluyendo el porcentaje atómico del hidrógeno, (ya que mediante el XPS, este elemento no puede ser detectado) y se compararon los valores teóricos y con los experimentales.

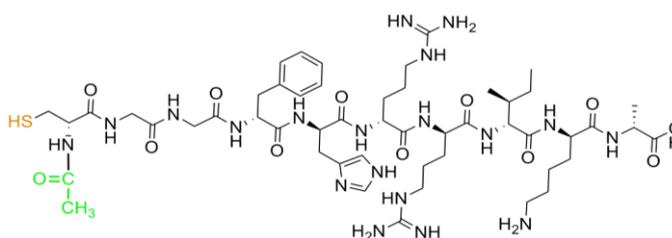
Tal cual como puede observarse en la *Tabla V 2*, el análisis de las secuencias peptídicas presenta óptimos resultados, no solo por presentar valores similares entre los valores experimentales y los teóricos, sino que con ellos se ha demostrado que el azufre presente en la cisteína, aunque aparece en bajas concentraciones, puede ser detectado mediante esta técnica.

Por tanto en función de estos resultados se tiene que la cisteína de todas las secuencias peptídicas, puede ser detectada a través del XPS, mediante la identificación del pico S 2p.



Ac-CGGRGDS

Fórmula Química $C_{24}H_{40}N_{10}O_{12}S$



Ac-CGGFHRRIKA

Fórmula Química $C_{51}H_{83}N_{19}O_{12}S$

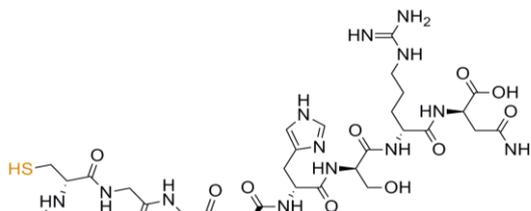


Figura V 2 Secuencias Peptídicas Utilizadas

Ac-CGGPHSRN

Fórmula Química $C_{33}H_{52}N_{14}O_{12}S$

Tabla V 2 Composición Química de las Secuencias Peptídicas por XPS.

Secuencia Peptídica	C1s	N1s	O1s	S2p	F1s
RGD Teórico	50	23	25	2	
RGD Experimental	57	20	21	2	0
FHRRIKA Teórico	61	24	14	1	
FHRRIKA Experimental	60	18	14	1	7
PHSRN Teórico	54	25	19	2	
PHSRN Experimental	57	22	18	2	1

V.3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS

En el proceso de inmovilización de secuencias peptídicas, existen muchas variables de estudio, entre ellas: la concentración de péptido, el pH del medio, el tiempo de exposición, la temperatura, las características físico-químicas de las superficies entre otras.³ Hasta la fecha aún las condiciones óptimas no han sido estandarizadas, por ejemplo, Zorn et al., realizan la inmovilización de las biomoléculas en agua destilada durante 24h,⁴ Bai et al., lo hacen en el mismo tiempo pero a pH 8,⁵ Iucci et al., las colocan durante toda la noche,⁶ y hay otros grupos que trabajan a tiempos muchos más cortos, entre ellos Davis et al., quienes lo hacen a pH 7 durante 2h,⁷ o Xiao que la realiza en 1h a 20 °C y a pH 6.5.⁸

Los estudios mencionados anteriormente, además de diferir en tiempo, pH, y temperatura, también han sido realizados sobre superficies con características físico-químicas diferentes, por lo tanto, para optimizar el proceso de inmovilización de biomoléculas en esta tesis, se diseñó un ensayo de optimización que permita evaluar de una forma semicuantitativa, como afectan algunas de estas variables en el proceso de unión silano-péptido.

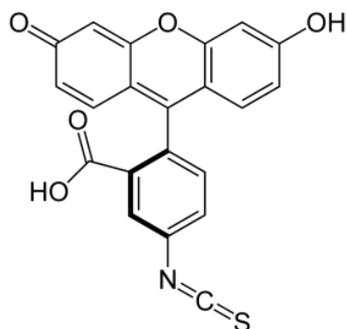


Figura V 3 Estructura de la Molécula del Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

Para el ensayo de optimización de la inmovilización de las secuencias peptídicas, se usó un péptido corto (CGG-FITC) que además de contar con la secuencia cisteína-glicina-glicina posee una terminación fluorescente (isotiocianato de fluoresceína (FITC)), (Figura V 3) que ha sido unida a través del ácido 6-aminohexanoico (Ahx).

Para este ensayo se trabajó solo con una de las aleaciones, específicamente la de titanio, ya que en esta fase lo que se está estudiando es la unión entre los silanos y los péptidos y como parte de la secuencia peptídica es válido usar el fluoróforo (FITC), en sustitución de las secuencias peptídicas RGDS, FHRRIKA y PHSRN; ya que como se ha mostrado en la Figura IV 1, el enlace entre los silanos y los péptidos, se realizará a través del tiol de la cisteína y por ende el diseño de este péptido permite que se realice el mismo enlace del azufre de la cisteína y el carbono de los silanos.

Por lo descrito anteriormente se tiene que los parámetros que se tomaron en consideración para la optimización del proceso fueron el tiempo de adhesión y el pH (ya que como se mencionó en el capítulo IV, entre los silanos utilizados, hay unos que son más reactivos a pH neutro y otros que son más efectivos a pH básico). Se dejaron como variables fijas la concentración del péptido y la temperatura.

Los resultados que se obtengan en este ensayo serán bastante orientativos, aunque puede haber pequeñas diferencias, debidas al efecto estérico de la molécula, por ser de diferentes tamaños.

V.3.2.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE ADHESIÓN DE PÉPTIDO A DIFERENTES pH

Como punto de partida se prepararon dos soluciones de péptido a una concentración a 10 μ M:

- 1) a pH 7: usando una solución tampón de fosfatos salinos (PBS) y
- 2) a pH 11: trabajando con carbonato de sodio a 0.5 mg/ml.

Seguidamente con cada una de las soluciones, se realizaron diferentes diluciones, con el objeto de medir la fluorescencia emitida por cada una de ellas, a través del fluorímetro y de esta manera trazar una recta patrón que relaciona la fluorescencia vs concentración y obtener una recta patrón que vincula ambos parámetros.

Para determinar el tiempo óptimo de adhesión de cada una de las soluciones, se utilizaron muestras de Ti silanizadas y hasta este momento se estuvo trabajando con los 3 organosilanos, para determinar como el pH, afectaba la inmovilización de las biomoléculas en ellos. Por tanto se trabajó con CPTES, GPTES y APTES+Ma y adicionalmente se incluyó la evaluación de una muestra sin tratamiento previo, en la cual la adhesión se dará por fisisorción.

Se utilizaron dos protocolos diferentes para la inmovilización de las biomoléculas, dependiendo del tipo de silanos:

- 1) Para las muestras silanizadas con CPTES o con GPTES y para los discos sin ningún tratamiento previo, se procedió a la inmersión de cada uno de los discos en 1 ml de las diferentes soluciones (pH 7 y pH 11). A partir de este momento se tomaron a diferentes tiempos (2h, 4h, 6h y 24h), 150 μ l de solución por cada tipo de muestra y se conservaron en eppendorf. Una vez extraídos los 150 μ l de cada una de las muestras en todos los tiempos de estudio, se procedió a medir la fluorescencia emitida. En función de los resultados obtenidos y haciendo uso de la recta patrón, se correlacionó la fluorescencia con la concentración del péptido que ha quedado en la solución, por lo cual de manera indirecta (restando concentración inicial, menos concentración final) se calculó la cantidad de péptido adherido.
- 2) Las muestras silanizadas con APTES+maleimido, solo se dejaron inmersas en solución durante 2 horas, debido a que el tiempo de interacción de este silano es limitado y puede hidrolizarse rápidamente.^{3,9} El cálculo del péptido adherido, se realizó igual que para el caso del CPTES y del GPTES.

Los resultados de este ensayo son mostrados en las *Figura V 4* y *Figura V 5*, donde una pendiente negativa en cada una de las curvas indica que se está efectuando el proceso de la adhesión del péptido sobre las muestras, por ende, el punto más bajo, indica la finalización del proceso de enlace y/o adsorción, dando como resultado el tiempo óptimo para la inmersión de las muestras en la solución peptídica.

Por lo expuesto anteriormente y en función de las gráficas, se tiene que a pH 7 la muestra que consigue una mayor adhesión de péptido es TiAM. Sin embargo a un tiempo de cuatro horas las muestras silanizadas con CPTES han conseguido la

mayor concentración de péptido sobre su superficie y este hecho ocurrió a las 6h para las muestras con GPTES. Finalmente se nota que las muestras con péptido fisisorbido, pasadas 24h aún conserva una pendiente negativa, por tanto se deduce que en éstas el proceso de adsorción de proteínas es mucho más lento.

Por otra parte para la solución a pH 11, se observa que para el péptido fisisorbido se tiene una pendiente nula y un comportamiento similar a las muestras silanizadas con APTES+maleimido ya que éstas exhiben una pendiente negativa muy leve, con lo que se infiere que en ellas no se está dando la inmovilización de la biomolécula.

Si se analizan el resto de los silanos a pH 11 se tiene que el CPTES necesita 6 horas para alcanzar su mejor rendimiento y que el tiempo óptimo de adhesión para el GPTES es de 2 horas.

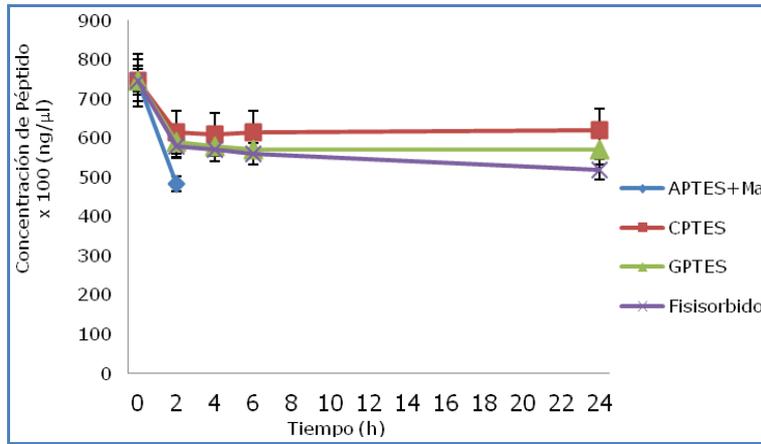


Figura V 4 Muestras con CGG-FITC en PBS (pH 7).

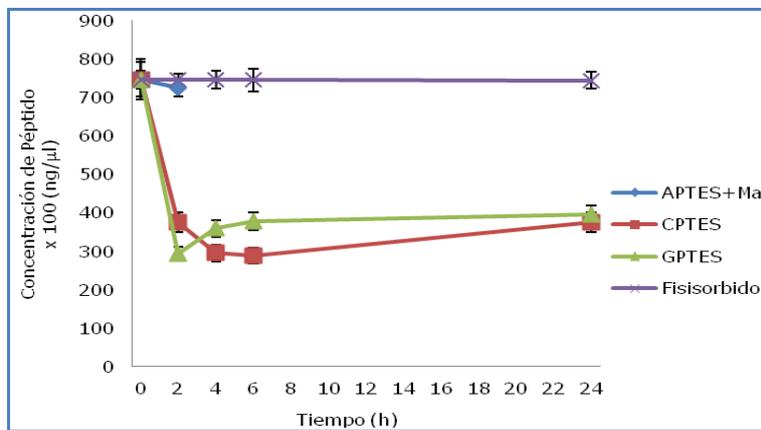


Figura V 5 Muestras con CGG-FITC en Carbonato de Sodio (pH 11)

De lo anteriormente expuesto, se tiene que la fisisorción, solo tiene lugar a pH básico, ya que a pH 11 es prácticamente indetectable, lo cual puede ser atribuido a la formación de puentes disulfuros, por medio de la oxidación de los residuos de los tioles de la cisteína, ya que la formación de puentes disulfuros a pH básico es una reacción común en la química de péptidos.¹⁰

El resumen de los resultados de esta fase se muestra en la

Tabla V 3

Tabla V 3 Tiempo Óptimo de Adhesión de Péptido en Función del pH

Muestra	pH	Tiempo
TiAM	7	2h
TiAM	11	2h
TiC	7	4h
TiC	11	6h
TiG	7	6h
TiG	11	2h

V.3.2.2 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO PARA LA ADHESIÓN DE PÉPTIDO SOBRE LOS DIFERENTES SILANOS

En función del tiempo de adhesión óptimo para cada pH en las diferentes superficies, se procedió a realizar nuevamente la inmovilización del péptido y se cuantificó la intensidad de fluorescencia, mediante la recta patrón para cada solución, determinándose la cantidad de biomolécula adherida.

Tabla V 4 Concentración de Péptido Adherido en Función del pH

Silano	pH 7 (ng/ μ l) \times 100	pH 11 (ng/ μ l) \times 100
APTES + Ma	265 \pm 0.58	\approx 0
CPTES	139 \pm 0.33	464 \pm 0.13
GPTES	176 \pm 0.37	453 \pm 0.36

De la Tabla V 4 se tiene que tanto para CPTES como para GPTES la cantidad de péptido enlazado a las superficies bajo condiciones básicas, aumenta significativamente, si se compara con los resultados observados a pH neutro. En función de estos resultados se establecen para la adhesión de los péptidos las siguientes condiciones de trabajo:

APTES+Malemido: pH = 7, tiempo = 2h.

CPTES: pH = 11, tiempo = 6h.

GPTES: pH=11, tiempo= 2h.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de inmovilización de biomoléculas sobre los diferentes silanos, se procedió a evaluar el comportamiento de las secuencias peptídicas, seleccionadas para inducir la oseointegración en las aleaciones de estudio. Al mismo tiempo se evaluó mediante el XPS la estabilidad de las mismas.

V.3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.

Por lo que se ha comprobado en los capítulos anteriores la aleación de CoCr se activará con ácido nítrico y sobre ella se utilizarán como silanos el GPTES y el APTES+Ma, por tanto, la adhesión de las secuencias peptídicas se realizarán a pH 11 o a pH 7 dependiendo del silano.

La técnica usada para la caracterización física de las superficies fue el ángulo de contacto y para la caracterización química se utilizó el XPS y la espectrofotometría de UV/Visible.

Resultados de Ángulo de Contacto.

El fenómeno de bioadhesión tanto de las proteínas como de las células, o la integración de un dispositivo biomédico en un tejido, como ya se ha explicado en los capítulos anteriores, se caracterizan por la formación de una interface entre el sistema biológico y el material implantado.

Muchos autores han relacionado la mojabilidad de la superficie con la respuesta biológica *in vitro*. Igualmente algunos autores confirman que el carácter hidrofóbico de la superficie, favorece a la adhesión de proteínas.¹¹⁻¹³

La *Figura V 6* muestra como el proceso de adhesión de las secuencias peptídicas genera una modificación de la mojabilidad de las superficies.

En el caso de las muestras silanizadas con GPTES, en casi todas las muestras (excepto en CoGP ($\approx 60^\circ$)) el ángulo de contacto incrementó su valor en comparación con la muestra sin péptido, es decir parten de CoG $\approx 68^\circ$ a: CoGR ≈ 79 , CoGF $\approx 73^\circ$, CoGRF ≈ 73 y CoGRP $\approx 75^\circ$. Contrariamente, las muestras silanizadas con APTES+Ma (CoAM), variaron el ángulo de contacto, pero con una tendencia a la obtención de muestras menos hidrofóbicas, es decir con ángulos menores cuando se trabaja con las secuencias peptídicas de forma individual, sin embargo cuando se tienen las mezclas, el valor del ángulo de contacto aumenta para RGD+FHRRIKA.

Si se comparan los resultados de cada secuencia peptídica sobre los diferentes silanos, se tiene que hay diferencias significativas, solo en los casos que se han usado CGGRDS o CGGFHRRIKA, para el resto de las secuencias, no influyó en la mojabilidad el silano utilizado.

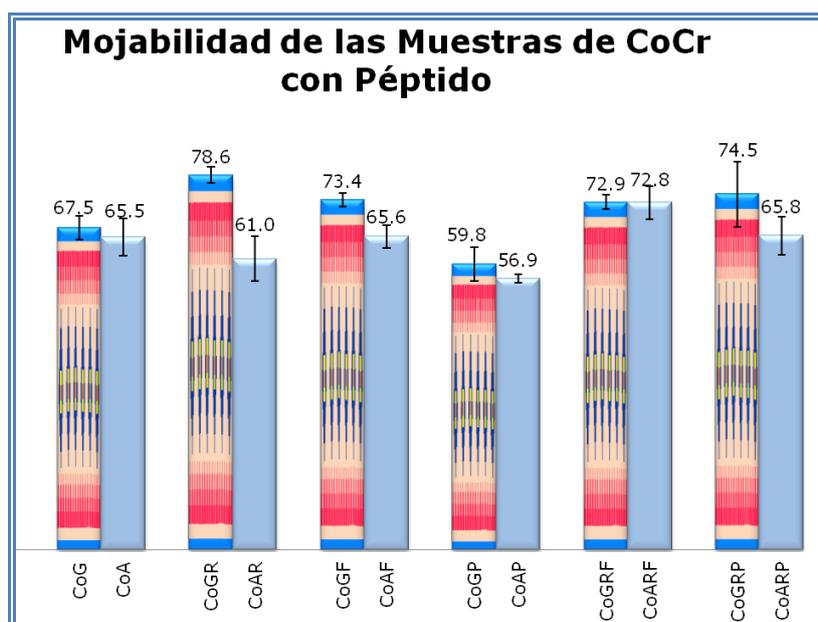


Figura V 6 Mojabilidad de las Muestras de CoCr con Inmovilización de Péptidos

En función de los resultados, se puede concluir que mediante el ángulo de contacto se observa una modificación en la mojabilidad de las superficies con biomoléculas, sin embargo no queda claro el motivo, por el cual con las mezclas no se presentan diferencias significativas al variar los silanos, por estas razones se requiere de un análisis químico para determinar la manera como dichas moléculas se han enlazado a los silanos.

Resultados de XPS.

Todas las secuencias peptídicas utilizadas tienen al menos una cisteína, por lo que por medio de la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, esta podrá ser identificada, según el porcentaje de azufre que aparezca en la superficie.

Las Tabla V 5 y Tabla V 6 corresponden a las muestras CoG y CoAM con biomoléculas inmovilizadas sobre sus superficies.

Tabla V 5 Composición Química en Porcentaje Atómico por XPS de las Muestras de CoCrG con Péptidos Adheridos en Superficie

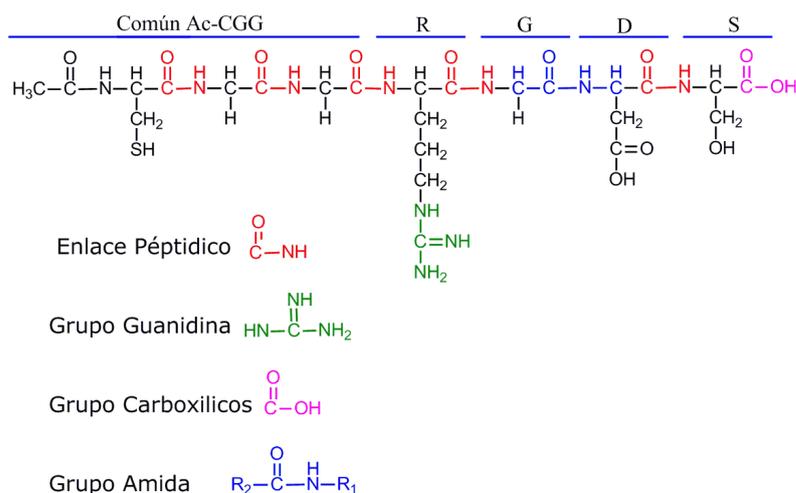
Picos	CoG	CoGR	CoGF	CoGP	CoGRF	CoGRP
C1s	33±1.7	38±1.1	42±2.7	33±1.0	39±1.9	47±3.1
N1s	2±0.2	3±0.4	8±0.7	3±0.1	7±0.6	5±0.3
O1s	44±0.9	43±1.8	37±1.4	46±2.7	39±1.5	37±2.1
Si2s	2±0.1	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
S2p	0±0.0	1±0.1	1±0.1	1±0.3	1±0.2	3±0.4
Cr2p	14±0.6	0±0.0	1±0.1	0±0.0	1±0.0	0±0.0
Co2p	4±0.0	11±0.2	8±0.7	13±0.7	10±0.9	6±0.4
Mo3d	1±0.0	4±0.2	3±0.1	4±0.3	3±0.1	2±0.1

Tabla V 6 Composición Química Porcentaje Atómico por XPS de las Muestras de CoCrAM con Péptidos Adheridos en Superficie

	CoAM	CoAMR	CoAMF	CoAMP	CoAMRF	CoAMRP
C1s	59±3.1	50±2.3	48±1.7	46±2.1	47±3.6	45±1.9
N1s	9±0.7	6±0.4	6±0.2	6±0.5	6±0.4	6±0.4
O1s	25±1.7	32±2.1	35±1.3	36±2.3	37±2.7	37±2.2
Si2s	7±0.5	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
S2p	0±0.0	5±0.2	5±0.3	5±0.5	4±0.3	5±0.4
Cr2p	0±0.0	1±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
Co2p	0±0.0	4±0.2	4±0.1	5±0.3	5±0.3	5±0.4
Mo3d	0±0.0	2±0.1	2±0.2	2±0.1	1±0.2	2±0.2

De los resultados mostrados en las tablas anteriores, se ve reflejado que:

1) En todas las muestras con péptidos se ha identificado la presencia de S 2p, aun cuando el mismo se presenta en porcentajes muy bajos, quizás debido a que la cisteína se encuentra recubierta por el resto de aminoácidos que conforman las diferentes secuencias peptídicas.⁷



La *Figura V 8*, muestra la secuencia peptídica CGGRGDS, la cual se encuentra acetilada (Ac) para evitar la unión del péptido al silano a través de la amina de la cisteína. En dicha figura se presentan los enlaces peptídicos, el grupo amida proveniente del enlace peptídico, el grupo guanidina, (que es parte de la cadena

Figura V 8 Esquema de la secuencia Ac-CGGRGDS

lateral de la arginina (Arg), ya que todas las secuencias usadas, contienen al menos una Arg) y se ha colocado el grupo carboxilo, presente en la cadena terminal de los aminoácidos. Como los grupos anteriormente mencionados están conformados por enlace de carbono, nitrógeno y/o oxígeno, se decidió hacer la alta resolución de estos elementos, con el fin de corroborar la presencia del péptido sobre la superficie.

Tabla V 7 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras CoG con Péptidos.

Picos	CoG	CoGR	CoGF	CoGP	CoGRF	CoGRP	B.E.(eV)	
C1s	33±1.7	38±1.1	42±2.7	33±1.0	39±1.9	47±3.1		
C1	C=C, C-H	20.3	25.5	22.7	20.1	21.4	27.7	284.5 ±0.1
C2	C=O, C-OH,	7.0	7.2	10.5	6,9	9.0	10.3	285.9 ±0.1
C3	CH2-O, C-S	2.4	2.3	3.8	2.0	3.5	3.4	287.4 ±0.2
C4	Dipéptido COOH, C-N, C=O Guanidina	3.3	3.0	5.0	4.0	5.1	5.6	288.5 ±0.2
N1s	2±0.2	3±0.4	8±0.7	3±0.1	7±0.6	5±0.3		
N1	C=NH, C-N	0.9	0.8	0.5	1.0	0.6	1.5	396.9 ±0.3
N2	Guanidina Amida	1.1	2.2	7.5	2.0	6.4	3.5	400.0 ±0.2
O1s	44±0.9	43±1.8	37±1.4	46±2.7	39±1.5	37±2.1		
O1	O ²⁻ , CoO, MoO ₃ , CrO ₃ , Cr ₂ O ₃	20.0	16.3	14.4	20.2	15.4	14.0	529.9 ±0.2
O2	OH, COOH Dipéptido	15.9	17.6	16.8	18.4	16.8	15.2	531.2 ±0.1
O3	C=O, -C-O SO ₄	8.1	9.1	5.8	7.4	6.8	7.8	532.6 ±0.2

Tabla V 8 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras CoAM con Péptidos.

Picos		CoAM	CoAMR	CoAMF	CoAMP	CoAMRF	CoAMRP	B.E.(eV)	
C1s		59+3.1	50+2.3	48+1.7	46+2.1	47+3.6	45+1.9		
C1	C=C, C-H	30.4	310	28.8	25.8	27.3	25.2	284.5	± 0.1
C2	C=O, C-OH,	19.5	13.0	13.0	13.8	14.1	14.4	285.6	± 0.2
C3	CH ₂ -O, C-S Grupo Imida	4.9	4.0	4.3	4.1	3.8	3.6	287.6	± 0.3
C4	Dipéptido COOH, C-N, C=O Guanidina	4.2	2.0	1.9	2.3	1.8	1.8	288.6	± 0.4
N1s		9+0.7	6+0.4	6+0.2	6+0.5	6+0.4	6+0.4		
N1	C=NH, C-N	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	397.0	± 0.4
N2	N-H Guanidina Amida	9.0	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	400.3	± 0.5
O1s		25+1.7	32+2.1	35+1.3	36+2.3	37+2.7	37+2.2		
O1	O ²⁻ , CoO, MoO ₃ , CrO ₃ , Cr ₂ O ₃	1.5	7.7	6.5	9.0	10.0	10.0	529.9	± 0.2
O2	OH, COOH Grupo Imida Dipéptido	7.0	9.6	10.9	10.0	11.8	10.0	531.2	± 0.1
O3	C=O, -C-O SO ₄	16.5	13.7	18.6	16.0	15.2	17.0	532.6	± 0.5

La deconvolución del carbono y del oxígeno ha sido mostrada en el capítulo III, (Figura III 7 y Figura III 8 respectivamente) y la del nitrógeno en el capítulo IV, (Figura IV 11). Los resultados de este estudio se presentan en porcentaje atómico en las Tabla V 7 y Tabla V 8. Por medio de la alta resolución se pueden identificar los carboxilos en los picos **C4** y **O2**, el enlace peptídico en los picos **C4** y **O2**, el grupo guanidina y los carboxilos mediante los picos **C4** y **N2** y el grupo amida a través del pico **N2**.^{8,9,16-20}

El estudio de alta resolución de estos elementos se presentará a continuación, pero a priori ya se puede conjeturar, que la detección de estos enlaces no es una tarea sencilla, debido a que en un mismo pico se adjudican 2 o más especies derivadas de los procesos anteriores de biofuncionalización (activación y/o silanización) o de la contaminación existente.

Grupos Carboxilos.

Como se ha descrito en el párrafo anterior, los grupos carboxilos de la cadena terminal de las secuencias peptídicas, pueden ser identificados ya sea por el pico C4, o por el pico O2.

Para el caso de las muestras silanizadas con GPTES, el pico C4 aumenta para todas las muestras excepto para CoGR lo cual sugiere la presencia del péptido en sus superficies. En cuanto a las muestras silanizadas con APTES+Ma, la presencia de carboxilos es detectada en todas las muestras, mediante el incremento del pico O2.

Enlace Peptídico.

La identificación del enlace peptídico o también llamado dipéptido, se confirma por el incremento de los picos C4 y O2, en las muestras en las que se han inmovilizado

biomoléculas; por tanto según los resultados obtenidos, se tiene que **por medio del pico C4, se infiere la presencia de este enlace en todas las muestras CoG (excepto CoGR), de igual manera mediante el pico O2, se comprueba la existencia del dipéptido en todas las muestras silanizadas con APTES+Ma.**

Grupo Guanidina.

La guanidina puede ser identificada mediante el pico N2 y el carbono con el mayor valor de energía de enlace (C4). **El incremento del pico C4 es notorio en las muestras CoGF, CoGP, CoGRF y CoGRP, al mismo tiempo que se aprecia un aumento en todas las muestras silanizadas con GPTES del pico N2, lo cual teoriza la presencia del péptido en sus superficie.**

De la misma manera, se tiene que en **todas las muestras de CoAM con biomolécula ocurre un incremento del pico de N2, permitiendo presumir la existencia de la arginina sobre las muestras.**

Grupo Amida.

La presencia del grupo amida es evidenciada, solo en las muestras silanizadas con GPTES, mediante el aumento en el porcentaje atómico del pico N2.

Cisteína.

Dado que todas las secuencias peptídicas utilizadas contienen al menos una cisteína, por medio del XPS, esta ha sido identificada mediante la aparición del azufre (S 2p).

Si se observa la Tabla V 5 en las muestras con GPTES el S 2p, aparece en cantidades muy pequeñas, al tratarse de un porcentaje tan bajo este pico no presenta una buena resolución para ser deconvolucionado y **se deduce para las muestras con GPTES que el péptido esta sobre la superficie, simplemente por la identificación del azufre.**

Para las muestras silanizadas con APTES+Ma, la presencia de S 2p es mucho mayor y de igual manera refleja la presencia de las secuencias peptídicas sobre las superficies biofuncionalizadas.

De la información obtenida en los estudios de alta resolución mediante XPS, se puede concluir que **las muestras presentan una modificación superficial en la fase de inmovilización de las biomoléculas.** Adicionalmente mediante todos los estudios de alta resolución de XPS, se observó que **el GPTES exhibe diferencias relevantes en picos atribuidos a la guanidina, grupos amida, a los dipéptidos y al azufre, lo que confirma la presencia del péptido.**

Aunado a esto, en **el APTES+Ma se pueden visualizar un incremento en el pico de oxígeno tanto por los enlaces peptídicos como por los carboxilos y es notoria la presencia de S 2p, comprobándose la presencia de la biomolécula en superficie.**

Los resultados obtenidos a través del XPS, sirven para confirmar la presencia de las secuencias peptídicas sobre las superficies no obstante pareciera estarse al límite de detección de la técnica ya que con la información obtenida por los estudios de alta resolución, solo puede presumirse la existencia de los enlaces propios de los péptidos (carboxilos, dipéptidos, grupo amida y grupo guanidina).

V.3.4 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS BIOMOLÉCULAS INMOVILIZADAS EN SUPERFICIE.

Ahora bien, no basta con afirmar la presencia de las secuencias peptídicas en superficie, sino que es necesario comprobar que las mismas se encuentran formando enlaces covalente con los silanos.

Dado que a través de la alta resolución el enlace **S-C** ubicado en el pico **C3**, se encuentra enmascarado por la presencia del maleimido o de la contaminación, se procedió a realizar un estudio de estabilidad química, térmica y mecánica, planteando como hipótesis, que si pasadas las 24 horas aún se percibe la presencia de secuencias peptídicas sobre las superficies, las mismas deben encontrarse enlazadas covalentemente a las moléculas de silano y por ende a la superficie metálica.

Para ello se utilizó un experimento similar al realizado para evaluar la estabilidad de los silanos que consistió en sumergir las muestras en una solución tampón de fosfatos salinos (PBS) a 37 °C, con agitación continua a 150 rpm durante 24h.

La evaluación de este estudio se realizó sobre las muestras de CoAM y se caracterizó la superficie físicamente por ángulo de contacto y químicamente mediante un estudio de XPS.

Resultados de Ángulo de Contacto.

Como se ha mencionado a lo largo del desarrollo de esta tesis, a través de la medición de la mojabilidad de las muestras mediante el ángulo de contacto, se obtiene una información cualitativa, que indica si se produjo o no, una modificación física en las superficies analizadas.

En este estudio se utilizó esta medición, ya que si se presentan variaciones estadísticamente significativas entre una superficie a tiempo 0h y a tiempo 24h, esto implica que hubo una modificación superficial, que induciría a pensar que se ha perdido parcial o totalmente las biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie.

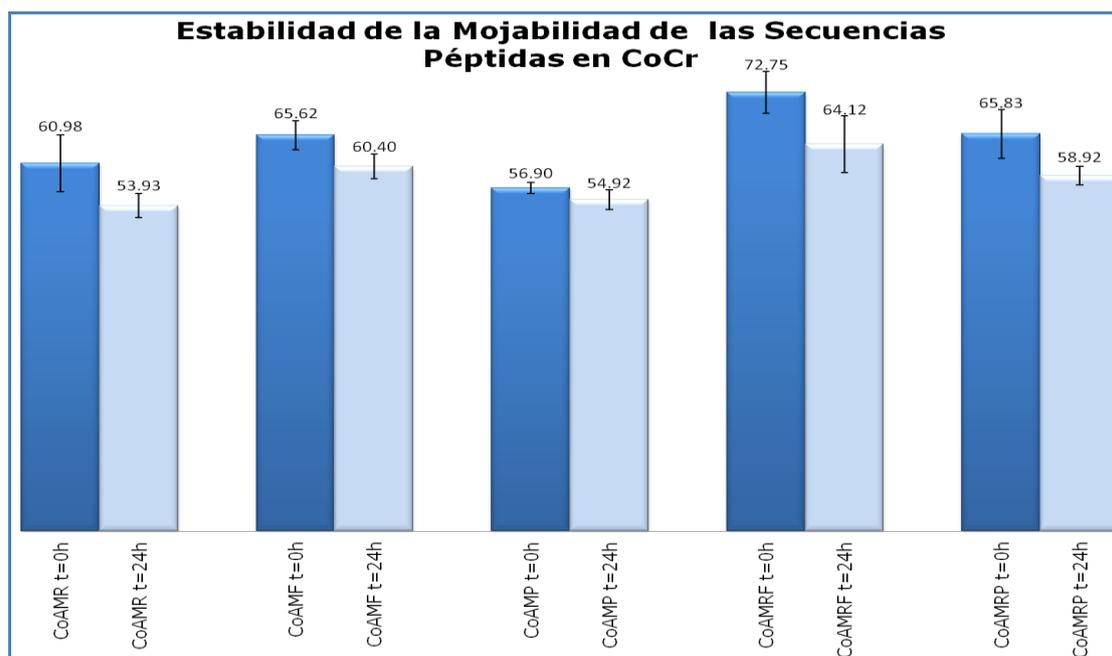


Figura V 9 Estabilidad de la Mojabilidad de las secuencias Peptídicas en CoCr

En la *Figura V 9* se presentan los resultados de este estudio. En ella se ve cada una de las muestras a $t=0h$ y su homóloga luego del ensayo de estabilidad química, térmica y mecánica pasadas 24 horas.

En función de los resultados, se tiene que ***luego del ensayo de estabilidad todas las muestras presentaron una leve disminución en el ángulo de contacto. Sin embargo la misma no representa diferencias estadísticamente significativas, por lo cual sugiere que la inmovilización de péptidos ha resultado estable.***

La pequeña disminución del ángulo de contacto puede ser atribuida al desprendimiento de la porción de péptido que no estaba enlazada covalentemente a los silanos. No obstante, para confirmar esta hipótesis es necesario utilizar una técnica que permita realizar una evaluación química de la superficie.

Resultado de XPS.

Para analizar químicamente la estabilidad de las secuencias peptídicas se realizó un estudio de XPS, donde los datos del barrido general son presentados en porcentajes atómicos en la *Figura V 10*.

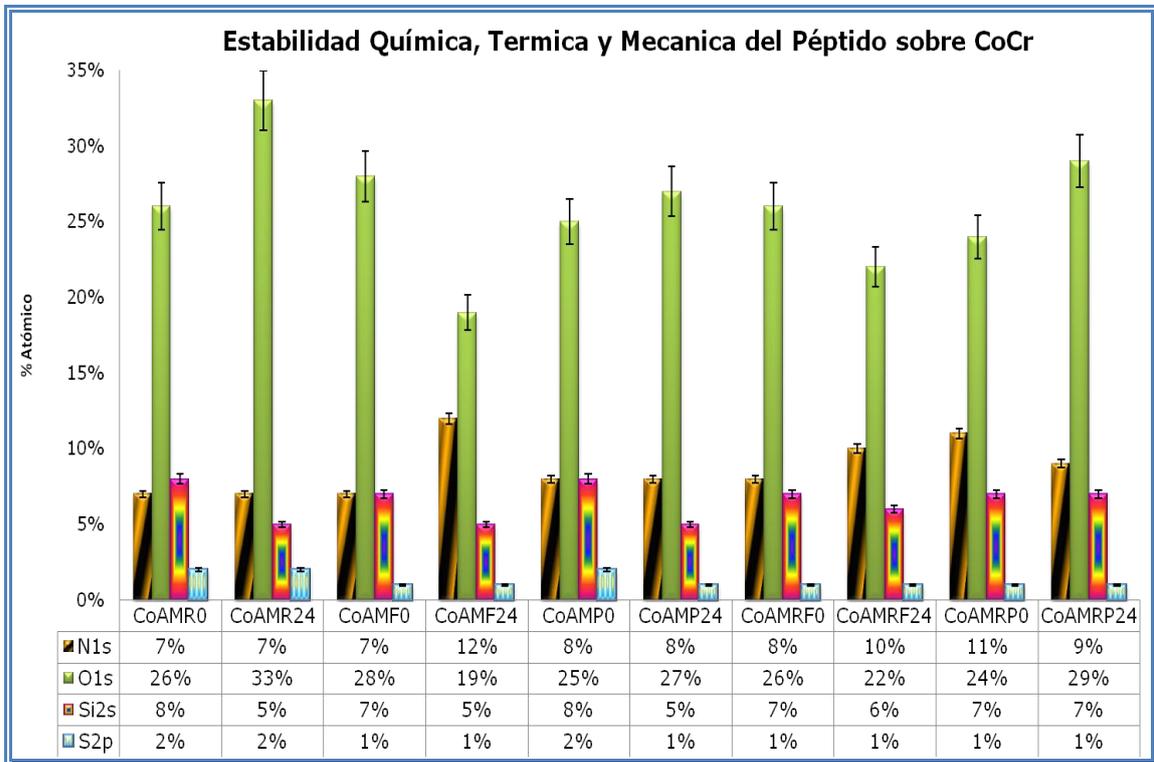


Figura V 10 Estabilidad Química, Térmica y Mecánica del Péptido en Superficie

Con el objeto de profundizar estos resultados y dado que en el pico N2, se pueden evidenciar los enlaces propios del grupo amida, se ha realizado la deconvolución del espectro de N 1s

En la *Figura V 11* se muestra en color negro el espectro de nitrógeno para las diferentes secuencias peptídicas, antes del ensayo de estabilidad y en azul luego de haber sido sometido a una evaluación térmica, química y mecánica.

El criterio para determinar la presencia del péptido en superficie fue la estabilidad del pico N2, ya que esta contribución es debida a los enlaces del grupo amida, al

igual que el grupo guanidina, por tanto N2 aparece por la unión de los aminoácidos que conforman las secuencias peptídicas.

En función de los resultados se puede afirmar que el enlace silano-peptido es estable, motivados a que el azufre pasadas las 24 h permanece sobre las superficies. Adicionalmente el pico N2 aparece en todos los casos evaluados.

Siendo más específicos, se observa que cuando se adhieren las biomoléculas, la contribución del pico de nitrógeno, se debe casi en su totalidad al número de amidas inmovilizadas en superficie, exceptuando el caso del CoAMR, donde es notoria la presencia del pico N1 tanto a tiempo 0h como a las 24h.

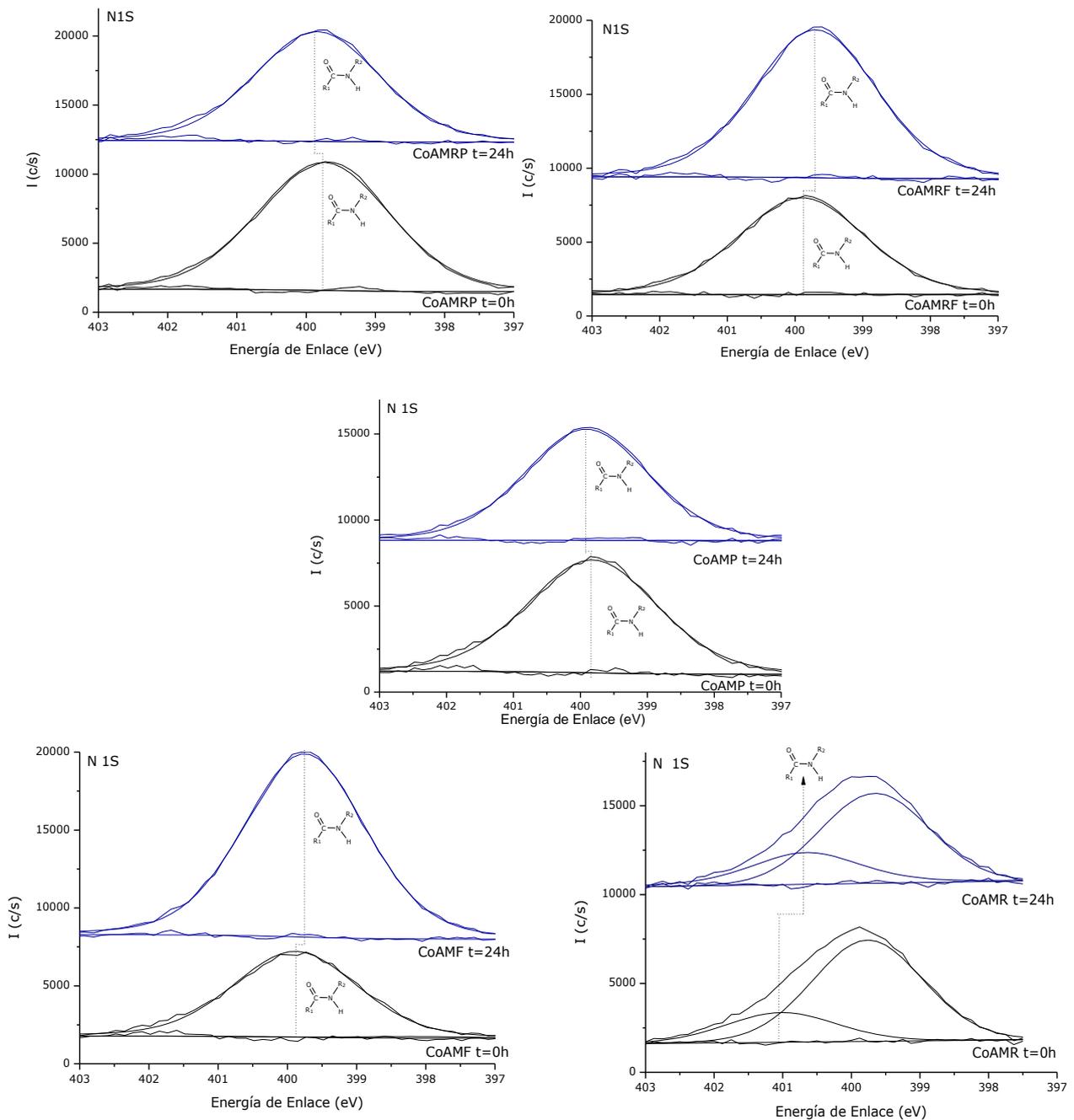


Figura V 11 Demostración de la Estabilidad del Péptido mediante la Deconvolución del N 1s

V.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO ADHERIDO EN SUPERFICIE.

Por los resultados mostrados anteriormente, se tiene claro que las secuencias están presentes sobre las superficies. Ahora bien, esta información no es suficiente, por tal razón se requiere de otra técnica, con el fin de determinar la cantidad de biomolécula adherida.

Mediante una revisión bibliográfica se tiene que existen diversos métodos para la cuantificación de la densidad de biomoléculas adheridas en superficie, entre ellos la calorimetría, radiomarcado (radiolabeling), y espectroscopia, pero para su estudio se pueden requerir grandes cantidades de proteínas o el marcaje de un ligando específico o de proteínas. Igualmente algunos métodos requieren sondas espectroscópicas adicionales o de reacción desnaturizantes, o las mediciones de concentraciones de equilibrio después de una separación, entre otros factores.²

Por tanto, por simplicidad, se diseñó un estudio orientativo, que de forma sencilla y rápida permita determinar la cantidad de péptido adherida en las diferentes superficies. Con este fin se prepararon soluciones de las diferentes secuencias peptídicas a 500 ng/ml, y con cada una de ellas se hicieron disoluciones por triplicado, midiendo la absorbancia a través del espectrofotómetro de UV/visible (NanoDrop), obteniendo así, una recta patrón para cada péptido que relaciona la absorbancia vs concentración y arroja la ecuación que vincula ambos parámetros.

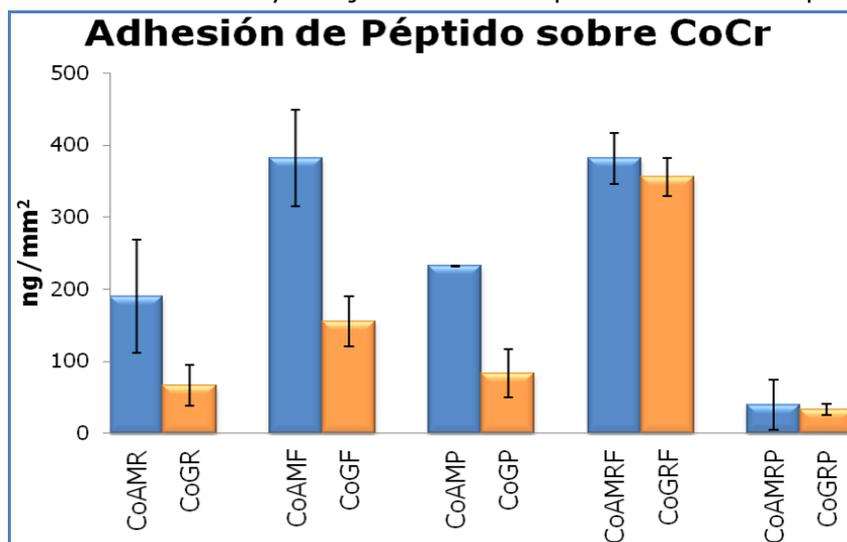


Figura V 12 Concentración de Péptido Adherido sobre las superficies de CoCr

Posteriormente se utilizaron muestras de CoCr previamente silanizadas y se sumergieron en 1 ml de péptido a 500 ng/ml. Pasado el tiempo óptimo de adhesión para cada una de ellas, se midió la absorbancia de la solución y haciendo uso de la ecuación obtenida en la recta patrón se calculó la cantidad de péptido que ha dejado de absorber la muestra; por tanto, la diferencia de este valor con la concentración inicial, se traduce en la concentración de péptido adherido sobre la superficie.

Los resultados de este ensayo son mostrados en la Figura V 12, donde puede observarse que las superficies silanizadas con APTES+Ma adsorben mayor cantidad de péptido que las muestras con GPTES.

Otro dato observable en esta gráfica es que para ambos silanos las muestras que presentan mayor cantidad de péptido adherido, son las que contienen la secuencia

FHRRIKA, ya sea sola o en mezcla. E inversamente se tiene que las que contienen menor concentración peptídica son aquellas constituidas por PHSRN solo o mezclado con RGD.

Con la información mostrada, queda evidenciada la presencia de los péptidos en las distintas superficies, aun cuando las mismas presentan gran variabilidad en la concentración de péptido adherido, según el silano y la secuencia peptídica utilizada.

V.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LAS BIOMOLECULAS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

De los resultados obtenidos se tiene que:

1) Detección de las secuencias peptídicas.

- La espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, ha sido una técnica útil para determinar la presencia de la cisteína sobre las superficie, mediante la aparición del S 2p. No obstante, se considera que se ha llegado al límite de detección de la técnica, ya que no fue posible detectar el enlace Si-C, para confirmar el enlace covalente entre los organosilanos y las secuencias peptídicas.

- El diseño de las secuencias peptídicas, en el cual se enlaza la biomolécula a los silanos mediante una cisteína, ha sido apropiado; ya que el tener una cadena lateral altamente reactiva, con un grupo tiol (-SH), ha hecho posible la detección de los péptidos en superficie a través de la identificación del S.

2) Optimización del proceso de inmovilización de las secuencias peptídicas.

- Se corroboró que tanto el pH de la solución, como el tiempo de adhesión, son parámetros que influyen en el proceso de adhesión de los péptidos y tal cual como se puede ver en el apartado V.3.2.2 el APTES+Ma es más eficiente a pH 11, teniendo un tiempo de adhesión de 2h. Sin embargo el CPTES tarda 6h en adherirse a pH neutro y el GPTES funciona a pH 7 y a un t=2h.

3) Caracterización físico-química del proceso de inmovilización de las secuencias peptídicas en superficies.

- La inmovilización de las diferentes secuencias peptídicas introdujo modificaciones físicas en las superficies, resultando ligeramente más hidrofílicas las muestras silanizadas con APTES+Ma luego de la adhesión de los péptidos (*Figura V 6*).

- Mediante un barrido general de XPS se pudo determinar la presencia de las secuencias peptídicas sobre la superficie, mediante la detección del S 2p.

- A través del estudio de alta resolución de XPS, se observó que las secuencias peptídicas están depositadas ya que:

- El GPTES exhibe diferencias relevantes para todas las muestras con péptidos en el pico N2, el cual hace presumir la presencia de los grupos guanidina, y grupos amida (Tabla V 7).

- En el APTES+Ma se puede visualizar un incremento en el pico de O2 que puede ser atribuido tanto por los enlaces peptídicos como por los carboxilos (Tabla V 8).

- Mediante la medición de la absorbancia a través del NanoDrop, se obtuvo la concentración de péptido adherido en superficie, resultando que las muestras silanizadas con APTES+Ma son las que adsorben mayor cantidad de péptido. Y para todos los silanos las muestras que contienen el motivo FHRRIKA individualmente, o mezclado con RGDS, son las que arrojan mejores resultados (*Figura V 12*).

4) Determinación de la estabilidad térmica, química y mecánica de la unión silano-biomolécula.

- Ya que a través del estudio de alta resolución de C 1s fue imposible detectar el enlace C-S, se realizó un ensayo de estabilidad, cuyo criterio de selección fue la permanencia del S 2p en la superficie. ya que el hecho de que este elemento permanezca luego de someter las muestras durante 24h a un pH 7 y a una agitación constante de 150 rpm, es un indicador de que existe un enlace covalente. Por medio de XPS, se demostró que el S 2p permanece en superficies, por tanto se puede afirmar que las secuencias peptídicas están enlazadas covalentemente a los silanos.

Como conclusión de este capítulo se tiene que para evaluación de la inmovilización de las siguientes secuencias peptídicas: CGGRGDS, CGGFHRIKA y CGGPHSRN y de las mezclas en relación 1:1 de CGGRGDS+CGGFHRIKA y de CGGRGDS+CGGPHSRN, la técnica de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), solo permite determinar la presencia de las biomoléculas sobre la superficie; no obstante, un estudio de alta resolución es insuficiente para la determinación de los enlaces de los silanos con la biomolécula, razón por la cual el enlace covalente entre ellos, se comprobó mediante un ensayo de estabilidad térmica, química y mecánica. Adicionalmente fue necesario hacer uso de otra técnica de caracterización (espectrofotometría de luz UV/visible (NanoDrop)) para la cuantificación de la densidad de biomoléculas.

De los resultados obtenidos se extrae que las secuencias peptídicas se encuentran enlazadas covalentemente a las superficies de CoAM y de CoG, y en términos de densidad de péptido los mejores resultados se obtuvieron con APTES+Ma, deduciendo que a mayor cantidad de silano (capítulo IV), mayor adhesión de biomolécula.

V.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Puleo, D. A. Biochemical Surface Modification of Co-Cr-Mo. *Biomaterials* **17**, 217-222 (1996).
2. Zhu, M. M., Chitta, R. & Gross, M. L. PLIMSTEX: a novel mass spectrometric method for the quantification of protein–ligand interactions in solution. *International Journal of Mass Spectrometry* **240**, 213-220 (2005).
3. Howarter, J. A. & Youngblood, J. P. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **22**, 11142-7 (2006).
4. Zorn, G., Gotman, I., Gutmanas, E. Y., Adadi, R. & Sukenik, C. N. Surface modification of Ti45Nb alloy by immobilization of RGD peptide via self assembled monolayer. *Journal of materials science. Materials in medicine* **18**, 1309-15 (2007).
5. Bai, Y., Li, Y., Yang, Y. & Yi, L. Covalent Immobilization of Triacylglycerol Lipase onto Functionalized Nanoscale SiO₂ Spheres. *Process Biochemistry* **41**, 770-777 (2006).
6. Iucci, G., Battocchio, C., Dettin, M., Ghezzi, F. & Polzonetti, G. An XPS Study on the Covalent Immobilization of Adhesion Peptides on a Glass Surface. *Solid State Sciences* **12**, 1861-1865 (2010).
7. Davis, D. H., Giannoulis, C. S., Johnson, R. W., Desai, T. A. & Hal, D. Immobilization of RGD to < 1 1 1 > Silicon Surfaces for Enhanced Cell Adhesion and Proliferation. *Biomaterials* **23**, 4019-27 (2002).
8. Xiao, S.-J., Wieland, M. & Brunner, S. Surface reactions of 4-aminothiophenol with heterobifunctional crosslinkers bearing both succinimidyl ester and maleimide for biomolecular immobilization. *Journal of colloid and interface science* **290**, 172-83 (2005).
9. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. S. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg – Gly – Asp – Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. **8**, 867-872 (2007).
10. Mora, P. *et al.* Design of a minimized cyclic tetrapeptide that neutralizes bacterial endotoxins. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society* **12**, 491-6 (2006).
11. Pegueroles Neyra, M. Interactions Between Titanium Surfaces and Biological Components. 263 (2009).
12. Ponsonnet, L. *et al.* Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering: C* **23**, 551-560 (2003).
13. Haynes, C. A. & Norde, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2**, 517-566 (1994).
14. Matinlinna, J. P. *et al.* Surface Analysis of Co–Cr–Mo Alloy and Ti Substrates Silanized with Trialkoxysilanes and Silane Mixtures. *Surface and Interface Analysis* **36**, 246-253 (2004).
15. Matinlinna, J. P., Ozcan, M., Lassila, L. V. J. & Vallittu, P. K. The Effect of a 3-MethacryloxypropyltrimethoxySilane and Vinyltriisopropoxysilane Blend and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the Shear Bond Strength of Ccomposite Resin to Titanium Metal. *Dental materials official publication of the Academy of Dental Materials* **20**, 804-813 (2004).
16. Xiao, S. J. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-72 (1997).

17. Tlili, C. *et al.* A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. *Materials Science and Engineering: C* **28**, 861-868 (2008).
18. Tsiourvas, D., Tsetsekou, A., Arkas, M., Diplas, S. & Mastrogianni, E. Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **22**, 85-96 (2010).
19. Xiao, S.-jun, Textor, M., Spencer, N. D., Sigrist, H. & Neucha, C.- Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Peptides* **7463**, 5507-5516 (2007).
20. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M.Wieland, B. Keller, H. S. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly -Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-872 (2007).

CAPÍTULO VI.

Influencia de las Secuencias Peptídicas Cortas en la Respuesta Celular in Vitro sobre Superficies de CoCr.

CAPÍTULO VI.....	163
Influencia de las Secuencias Peptídicas Cortas en la Respuesta Celular in Vitro sobre Superficies Metálicas.	163
VI.1 INTRODUCCIÓN	167
VI.1.1 OBJETIVOS.....	169
VI.1.1.1 OBJETIVO GENERAL.	169
VI.1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	169
VI.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	170
VI.2.1 MATERIALES.	170
VI.2.1.1 SUPERFICIES ESTUDIADAS.	170
VI.2.1.2 CÉLULAS UTILIZADAS.....	170
VI.2.2 MÉTODOS.	171
VI.2.2.1 PREPARACIÓN SUPERFICIAL DE LOS MATERIALES.....	171
VI.2.2.2 SEMBRADO CELULAR.	171
VI.2.2.3 ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE ADHESION.	172
VI.2.2.4 VIABILIDAD.....	172
VI.2.2.5 ADHESIÓN.	173
VI.2.2.6 PROLIFERACIÓN.....	174
VI.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	176
VI.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SEMBRADO CELULAR.	176
VI.3.2 EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN CELULAR.....	177
VI.3.3 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PROLIFERACIÓN.....	182
VI.4 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS CON SECUENCIAS PEPTÍDICAS CORTAS, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO.....	185
VI.5 BIBLIOGRAFÍA.....	186

Índice de Tablas del Capítulo VI

<i>Tabla VI 1 Muestras Utilizadas en los Distintos Estudios Celulares.</i>	170
<i>Tabla VI 2 Medio de Cultivo Celular.</i>	170
<i>Tabla VI 3 Medio de Sembrado Celular</i>	171
<i>Tabla VI 4 Medio Osteogénico</i>	171
<i>Tabla VI 5 Muestras Usadas para el Ensayo de Calcein-AM.</i>	172
<i>Tabla VI 6 Proceso de Deshidratación</i>	174

Índice de Figuras del Capítulo VI

<i>Figura VI 1 Método de detección de LDH.</i>	175
<i>Figura VI 2 Protocolo de LDH.</i>	175
<i>Figura VI 3 Tinción con Calcein-AM.</i>	177
<i>Figura VI 4 Medición de Intensidad de Fluorescencia (Calcein-AM).</i>	177
<i>Figura VI 5 Cuantificación de Células Adheridas sobre CoCr mediante Tinción de los Núcleos con DAPI.</i>	178
<i>Figura VI 6 SEM de las Células Adheridas sobre CoAM con biomoléculas.</i>	180
<i>Figura VI 7 SEM de las Células Adheridas sobre CoG con biomoléculas.</i>	180
<i>Figura VI 8 Área de las Células Adheridas sobre la Aleación de CoCr</i>	181
<i>Figura VI 9 Proliferación Celular en las Muestras de CoAM por LDH</i>	182
<i>Figura VI 10 Velocidad de Proliferación Celular en las Muestras de CoAM</i>	184

VI.1 INTRODUCCIÓN

La colocación de implantes óseos tiene como meta lograr una conexión firme, estable y duradera con el hueso circundante en un proceso denominado oseointegración.¹⁻³ Una adecuada oseointegración está condicionada a la aceptación del implante por parte de los tejidos vivos, así como a la formación de nuevo hueso alrededor del implante.

Numerosos estudios reportan que la interface hueso-implante depende tanto de factores biológicos como de factores asociados al paciente, el diseño del implante y su superficie, la distribución de cargas entre el hueso y el implante y el procedimiento quirúrgico.³

Durante la cicatrización de los tejidos y la formación del nuevo hueso tienen lugar una serie de eventos biológicos y bioquímicos que pueden ser resumidos en: formación del coágulo de sangre, degradación del coágulo (fibrinólisis), formación de tejido granular (fibroplasia y angiogénesis), síntesis de nuevo hueso y mineralización (modelado y remodelado óseo). Sin embargo, cuando un cuerpo extraño como un implante, se inserta en el cuerpo humano, su superficie interactúa con los tejidos vivos de tal manera que puede modificar la secuencia de eventos biológicos antes descrita. Por lo tanto, la biocompatibilidad del implante y por ende, el éxito de la cicatrización en la interface hueso-implante depende de dos fenómenos adicionales descritos en el capítulo I: osteoinducción y osteoconducción.³⁻⁵

Una adecuada morfología y química superficial permite que las células se adhieran y proliferen sobre la superficie del implante, permitiendo la formación de depósitos de mineral que constituyen la base de la formación del nuevo hueso.^{3,6,7}

Por lo tanto, las estrategias que modifican la superficie del implante conducen a implantes con mejor respuesta osteoinductiva y osteoconductiva, y a tasas de deposición de hueso más elevadas que resultan en una oseointegración completa.

Comercialmente, existe una amplia variedad de superficies en implantes, muchas de las cuales poseen una comprobada eficiencia clínica. Sin embargo, varios de los mecanismos por los cuales una superficie es viable para su uso en implantes son aún susceptibles de mejoras en investigación.⁸ Debido a esto, la validación de nuevas superficies está basada en pruebas experimentales con el uso de técnicas de cultivo celular.³ Por este motivo se considera apropiado realizar estudios comparativos de diferentes superficies para realizar una evaluación del comportamiento de diferentes tratamientos superficiales y recubrimientos.

Por ello, el propósito de este estudio es analizar diferentes secuencias peptídicas (RGD, PHSRN O FHRRIKA), mediante ensayos de adhesión y proliferación celular para describir el comportamiento de cada una de las superficies en un ambiente similar al fisiológico y así determinar cuál de ellas produce una mejor respuesta.

Por ende, antes de mostrar los objetivos y resultados obtenidos, se presentará un breve resumen de cada uno de los procesos a estudiar.

Las células se unen a la superficie del biomaterial de forma indirecta, es decir, se unen a las secuencias peptídicas que han sido inmovilizadas sobre el material; por lo tanto, estas biomoléculas determinan el comportamiento de las células en el momento de entrar en contacto con el implante (adhesión y extensión sobre la superficie), esta unión se realiza a través de las integrinas, las cuales actúan como

intermediarias entre los compartimentos interiores y exteriores de la membrana celular y traducen el anclaje de ligandos externos, con información interna que induce adhesión, expansión o migración celular y como consecuencia regulan el crecimiento celular y la diferenciación.⁹

Como se comentó en el estado del arte (capítulo I), la secuencia RGD y los péptidos sintéticos de RGD se pueden unir a múltiples integrinas, debido a que los receptores de integrina la reconocen como una secuencia primaria, razón por la cual ha sido catalogada como una secuencia que induce la adhesión celular. Adicionalmente es conveniente destacar que la funcionalidad de RGD generalmente se mantiene durante todo el proceso aun en los pasos requeridos para la esterilización, por tratarse de una secuencia peptídica corta, que es menos sensible a la desnaturalización que un péptido grande como una proteína entera. Además el uso de RGD, en comparación con proteínas de la matriz extracelular, minimiza el riesgo de reactividad inmune o transferencia de patógenos.¹⁰

El número de células adheridas a la superficie del implante y la morfología celular son indicativos de su adaptación con el entorno. De donde, una célula bien expandida o extendida, representa una adecuada adaptación al cultivo y al material. De lo anterior se puede decir que la célula interacciona directamente con la superficie, cambiando su patrón de expresión génica lo que al final se traduce en un cambio fenotípico.

Por otra parte, la proliferación puede definirse como un proceso que implica un patrón secuencial de los cambios cíclicos en la expresión génica que finalmente conduce a la división de las células. Esencialmente, la proliferación implica progresión a través del ciclo celular con la alteración concurrente en un número de productos génicos.¹¹ Así, un cambio cualitativo en el fenotipo celular que es la consecuencia de los cambios cíclicos en la expresión génica, en última instancia conducen a la competencia funcional o diferenciación.¹¹

Por tanto, en este capítulo se evaluará el comportamiento biológico de secuencias peptídicas cortas, para de esta manera validar la optimización llevada a cabo en los capítulos anteriores. Proponiendo como hipótesis: Que la selección del mejor proceso de activación (en términos de limpieza y grupos hidroxilos en superficie (capítulo III)) y de los organosilanos más eficientes (en función de porcentaje y estabilidad del Si (capítulo IV)), da lugar a superficies con mayor densidad de biomolécula adherida (capítulo V) y por ende estas han de presentar una mejor respuesta celular.

VI.1.1 OBJETIVOS.

VI.1.1.1 OBJETIVO GENERAL.

Validar la optimización de las superficies de CoCr ASTM F1537 biofuncionalizadas con secuencias peptídicas cortas, mediante la respuesta celular in Vitro, en términos de cantidad de células adheridas, morfología y proliferación.

En este estudio se evaluará la influencia de la inmovilización de diferentes secuencias peptídicas (CGGRGDS, CGGFHRIKA, CGGPHSRN, CGGRGDS+CGGFHRIKA, CGGRGDS+CGGPHSRN) en la respuesta celular obtenida con células mesenquimales de ratas. Realizando para cada biomolécula, un estudio comparativo entre las muestras previamente silanizadas con GPTES o con APTES+Ma; ya que los resultados del capítulo V, han demostrado, que la densidad de adhesión de las biomoléculas, es diferente para cada uno de los organosilanos.

VI.1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Determinar la viabilidad de la adhesión celular sobre las superficies biofuncionalizadas con secuencias peptídicas cortas.

Para ello se evaluarán la viabilidad en términos de adhesión celular en superficies sin péptido (controles) y se comparan con la respuesta celular obtenida en superficies con biomoléculas; de tal manera de determinar en cuál de ellas se obtiene mejor respuesta.

Evaluar la influencia de las secuencias peptídicas sobre la morfología y la cantidad de células adheridas en superficie, para seleccionar los péptidos mas favorecedores para la respuesta celular in Vitro.

Se analizarán la cantidad de células adheridas y su morfología; ya que estos parámetros son indicativos de su adaptación con el entorno, debido a que una célula bien extendida representa que la misma se ha adaptado bien al material.

Caracterización del proceso de proliferación celular.

Se analizará la capacidad de proliferación de las células adheridas y se determinará si las secuencias seleccionadas, además de promover la adhesión, inducen la proliferación.

VI.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

VI.2.1 MATERIALES.

VI.2.1.1 SUPERFICIES ESTUDIADAS.

Se estudiaron dos grupos de superficies mostrados en la *Tabla VI 1*.

Tabla VI 1 Muestras Utilizadas en los Distintos Estudios Celulares.

Material	Proteína	Adhesión	Proliferación
CoAM	RGD	✓	✓
	FHRRIKA	✓	∅
	PHSRN	✓	∅
	RGD+FHRRIKA	✓	✓
	RGD+PHSRN	✓	✓
CoG	RGD	✓	∅
	FHRRIKA	✓	∅
	PHSRN	✓	∅
	RGD+FHRRIKA	✓	∅
	RGD+PHSRN	✓	∅

✓: incluido

∅: excluido en función de los resultados de adhesión

En cada experimento se incluyeron muestras de control, que variaron en función del ensayo, por lo que se detallarán en cada apartado

VI.2.1.2 CÉLULAS UTILIZADAS.

Se utilizaron células mesenquimales extraídas de fémur y tibia de rata. Se decidió trabajar con este tipo de células debido a que existen estudios que reportan que este es uno de los tipos celulares comunes para examinar la respuesta de los osteoblastos y su morfología.¹²

Se trabajó con células entre pases 3 y 5, a lo largo de todos los experimentos. Las células se pusieron a cultivar en frascos de 75 cm² en medio de cultivo con suero (*Tabla VI 2*), al cabo de cinco días, las células se encontraban en estado de confluencia y en este momento se tripsinizaban con 5 ml de tripsina (TrypLE Express (1X), rojo fenol de Invitrogen), durante 5 minutos a 37°C, posteriormente se detenía la acción tóxica de la tripsina colocándole 5 ml de FBS y haciendo varios barridos para terminar de despegarlas del frasco. Finalmente se centrifugaron y re suspendieron en 5 ml de medio sin suero (*Tabla VI 3*), que es el que se utilizará para el sembrado celular.

Tabla VI 2 Medio de Cultivo Celular.

Producto	Concentración	Casa Comercial
Advanced DMEM	88%	Invitrogen
FBS (Fetal Bovine Serum)	10%	Invitrogen
Penicilina-Estreptomicina	1%	Invitrogen
L-Glutamina	1%	Invitrogen

Tabla VI 3 Medio de Sembrado Celular

Producto	Concentración	Casa Comercial
Advanced DMEM	98%	Invitrogen
Penicilina-Estreptomicina	1%	Invitrogen
L-Glutamina	1%	Invitrogen

Para los ensayos de proliferación, luego de encontrarse las células mesenquimales adheridas a la superficie, se les mantuvo en medio osteogénico, para estimularlas químicamente a diferenciarse en osteoblastos, ya que este posee factores de crecimiento tales como: β -glicerol fosfato, ácido ascórbico y dexametazona, este medio se renovó a días alternos y como las células debían permanecer hasta 14 días sumergidas en solución, al medio osteogénico se le agregó un fungicida (Tabla VI 4)

Tabla VI 4 Medio Osteogénico

Producto	Concentración	Casa Comercial
Advanced DMEM	84.98%	Invitrogen
FBS	10%	Invitrogen
Penicilina-Estreptomicina	1%	Invitrogen
L-Glutamina	1%	Invitrogen
β -Glicerol fosfato	1%	Sigma
Ácido Ascórbico	1%	Sigma
Dexametazona	0.02%	Sigma
Fungisona	1%	Invitrogen

En los casos en los que en el momento del cultivo celular, se obtuvo un número de células superior al requerido, se procedió a congelarlas en viales de 500×10^3 células/vial, para lo cual se centrifugaron, retirando el sobrenadante y posteriormente pasándolas a un vial con 90% FBS y 10% DMSO (dimetil sulfóxido de Sigma), como criopreservante.

VI.2.2 MÉTODOS.

VI.2.2.1 PREPARACIÓN SUPERFICIAL DE LOS MATERIALES.

Con el fin de bloquear las posibles uniones inespecíficas tanto las muestras como a las placas de cultivo se les colocó una solución tampón de fosfato salino (PBS de Invitrogen) y albumina de suero bovino (BSA de Sigma) al 1% (PBS-BSA(1%)), durante 30 min,¹³ el BSA recubrirá aquellas zonas de la superficie de las muestras en las que no se han adherido las secuencias peptídicas, de este modo se consigue evaluar, únicamente las células adheridas al péptido.⁹

Luego se esterilizaron con etanol, sumergiéndolas 10 minutos a temperatura ambiente¹⁴⁻¹⁶ y para finalizar se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS estéril con el objeto de eliminar los residuos de etanol.¹⁷

VI.2.2.2 SEMBRADO CELULAR.

Se calentó a 37°C el medio de sembrado celular (Tabla VI 3), se colocaron 500 μ l de medio con el número de células requeridos en función del ensayo en cada pocillo y se encubaron las placas a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y de 95% de humedad, durante 6 h. Posteriormente se retiró el medio y se procedió a hacer mediciones en los casos de los ensayos de adhesión.

VI.2.2.3 ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE ADHESION.

Se trabajó con muestras de CoAMR, sembrando en ellas 6×10^3 células/pocillo sobre las muestras colocadas en placas de 24 pocillos, (3.2×10^3 cel/cm²) Se evaluaron 4 tiempos de adhesión diferentes (2h, 4h, 6h y 8h), mediante un ensayo de tinción celular con diacetato de fluoresceína (FDA).

Se seleccionó el diacetato de fluoresceína ya que este penetra en las células y es transformado por las esterasas celulares en fluoresceína que emite fluorescencia amarillo-verdosa (a 514 nm), luego sólo aparecerán marcadas las células metabólicamente activas.¹⁸

Se usaron como control la siembra de células directamente en los pocillos de las placas de cultivo.

Este ensayo consistió en disolver el FDA a una concentración de 10µg/ml. Alcanzado cada uno de los tiempos de adhesión, se añadieron 10µl/ml de la solución en cada pocillo, se incubaban por 10 min a 37 °C, seguidamente se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se miraron inmediatamente en la lupa fluorescente, con el filtro verde, observando su morfología.

VI.2.2.4 VIABILIDAD.

Este estudio se realizó sobre las muestras descritas en la Tabla VI 5 y cuya nomenclatura ha sido descrita en el Capítulo V.

Tabla VI 5 Muestras Usadas para el Ensayo de Calcein-AM

Control	CoC	CoG	CoAM
RGD Fisisorbido	CoCR	CoGR	CoAMR

Se sembraron a 24 horas, 15×10^3 células/muestra, las cuales se encontraban colocadas en placas de cultivo de 24 pocillos de 1.9 cm² cada uno, por tanto la concentración celular fue de 7.9×10^3 células/cm². Posteriormente se retiró el medio y se lavaron las muestras con DPBS 1X (Solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco).

La medición de la viabilidad se realizó utilizando Calceina AM, debido a que este procedimiento permite la identificación de las células vivas cuando son incubadas en presencia de la calceína modificada, ya que este componente tiene apantallada su capacidad fluorescente, la cual puede ser recuperada tras su metabolización intracelular, solo cuando las células están vivas.¹⁹

Como habian 8 tipos de muestras, se trabajó por triplicado y se necesitaban 500 µl por cada muestra; por tanto, se preparó una solución, añadiendo en 12ml de DPBS 1X, 6 µl de calceina-AM, para conseguir una concentración de 0,5 µl de calceina/1ml de DPBSX. Las muestras fueron incubadas en dicha solución durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente se retiró el calceina-AM, se lavaron con DPBS y se observaron inmediatamente en el microscopio de fluorescencia. Se tomaron las fotos y se midió la intensidad de la fluorescencia mediante el software Image J, para con esta información realizar una comparación entre las muestras y establecer si las superficies con secuencias peptídicas favorecen el proceso de adhesión celular.

VI.2.2.5 ADHESIÓN.

Antes de describir el protocolo de adhesión celular empleado, es necesario acotar la diferencia entre las palabras *attachment* y *adhesión* (en inglés), según Boyan et al., *attachment* se refiere al número de células efectivamente adheridas al sustrato, en comparación con las que tuvieron la oportunidad de adherirse, mientras que la palabra *adhesión* está relacionada con la fuerza con la cual se han unido al sustrato.¹²

En este estudio se ha estudiado el proceso de adhesión que Boyan ha denominado *attachment*, debido a que el proceso ha sido evaluado a 6 horas a 37 °C, teniendo como criterios de medición la cantidad de células adheridas y la morfología y no se tomó en consideración la fuerza de adhesión.

En el ensayo de adhesión se utilizaron como control: 1) una muestra sin tratamiento recubierta con PBS-BSA 1% (CoCr+BSA) y 2) una muestra sin tratamiento, esterilizada con etanol, pero sin BSA (CoCr).

Se llevaron a cabo tres experimentos por separados con el objeto de evaluar la morfología y de realizar la cuantificación de las células adheridas. Las técnicas de medición empleadas fueron:

- Tinción de los núcleos celulares con DAPI (4,6-diamino-2fenol-dihidrocloruro), que es un marcador universal que se une al DNA en el núcleo de cualquier célula.²⁰

- SEM: previa fijación, deshidratación de las células adheridas, se pudo observar la morfología de las células y cuantificar su área

Protocolo de Tinción con DAPI.

1. Se retiró el medio de las células sembradas.
2. Se lavaron 2 veces las muestras durante 5 minutos con PBS.
3. Se fijaron las células con paraformaldeido (PFA de Sigma) al 3% (760 µl PFA al 16%, 240 µl de sacarosa 1M, 2 ml PBS, 1 ml agua Milli Q), manteniéndolas a 4°C por 10 minutos.
4. Se lavaron las muestras 2 veces por 5 minutos con PBS-Gly(0.15 g glicina (de Sigma), 100 ml PBS).
5. Se *permeabilizó* la membrana celular durante 10 minutos con tritonX-100 al 0.05% en PBS-Gly.
6. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-Gly.
7. Se *tiñeron los núcleos*, mediante la incubación de las muestras a temperatura ambiente, durante 10 minutos en una solución de DAPI (de Sigma) a una concentración de 10µg/ml, diluido en PBS-Gly-BSA 1%, ya que esta solución bloquea uniones inespecíficas, las placas se cubrieron en papel aluminio, para mantener la fluorescencia.
8. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS.
9. Se agregó una gota de mowiol (de Sigma), sobre cada una de las muestras y se les colocó un cubre objeto para mejor conservación de las células adheridas a la superficie de las muestras.

10. Los núcleos celulares fueron observados en el microscopio de fluorescencia y cuantificados con el software Image J.

Protocolo de Fijación y Deshidratación para el SEM.

1. Se lavaron las muestras con PBS 1X, para retirar residuos del medio y las células que no se han adherido.
2. Se *fijaron* las células con glutaraldeido (de Sigma) a 2,5%, diluido en un buffer de fosfato 0,1M (mezcla de hidrógeno de fosfato disódico a 0,2 M y dihidrogeno de fosfato de sodio a 0,2 M), durante 2h.
3. Se realizaron 3 lavados con el buffer de fosfato 0.1 M por 5 minutos cada uno.
4. Se sumergieron las muestras en tetra óxido de osmio, se cubrieron con papel aluminio, se mantuvieron en frío y con agitación durante 2 horas.
5. Se hicieron 2 lavados con el buffer de fosfato 0.1 M por 10 minutos cada uno.
6. Se cambiaron las muestras a una placa nueva y se volvió a hacer un lavado por 10 min.
7. La *deshidratación* se efectuó manteniendo las placas en hielo y sumergiéndolas en diversas concentraciones de alcohol (Tabla VI 6).
8. Se cubrieron con hexametildisilasono (HDMS) al 98%, para desplazar los restos de los alcoholes diluidos.
9. Se dejaron secar en la campana por 10 minutos.
10. Se llevaron al SEM para observar la morfología de las células.

Tabla VI 6 Proceso de Deshidratación

Alcohol (concentración %)	Tiempo (min)	Cambios
50	10	1
70	10	1
90	10	1
96	10	3
100	15	1
100	20	1
100	30	1

La morfología de las células se evaluó en términos extensión de células, estimando el área celular, y usando estos resultados como criterio para comparar los efectos de las diferentes superficies.²¹

VI.2.2.6 PROLIFERACIÓN.

Para este estudio se usaron los mismos controles que para los ensayos de adhesión y se trabajó con las muestras descritas en la *Tabla VI 1* por triplicados para cada tiempo.

Se usaron como control muestras sin tratamientos recubiertas con BSA y muestras sin ningún tratamiento de modificación superficial. Se sembraron 6×10^3 células por pocillo, sobre cada una de las muestras, pasado el tiempo de adhesión se retiró el medio de sembrado (Tabla VI 3).

Se realizó el lisado inmediatamente después de la adhesión, en el caso de las muestra de tiempo 0 y las placas con las muestras de los días 1, 3, 7 y 14 se incubaron en medio osteogénico (*Tabla VI 4*), para llegado cada uno de los tiempos establecidos, realizar el lisado. Una vez que se tienen todas las muestras lisadas, se hizo la medición de LDH.

Protocolo de LDH.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima presente en todas las células y cataliza la oxidación de lactato a piruvato en la presencia de co-enzima, NAD^+ , una vez que se lisan las células, se libera rápidamente.

La enzima LDH, presente en las células, reduce el exceso de NAD^+ y produce la oxidación de lactato a piruvato. El NADH generado, se oxidará otra vez a NAD^+ produciendo la reducción de las sales de tetrazolium a formazán, que puede ser identificado colorimétricamente (*Figura VI 1*).²²

La medición de la cantidad de LDH a partir de células es uno de los métodos principales para evaluar células muertas.

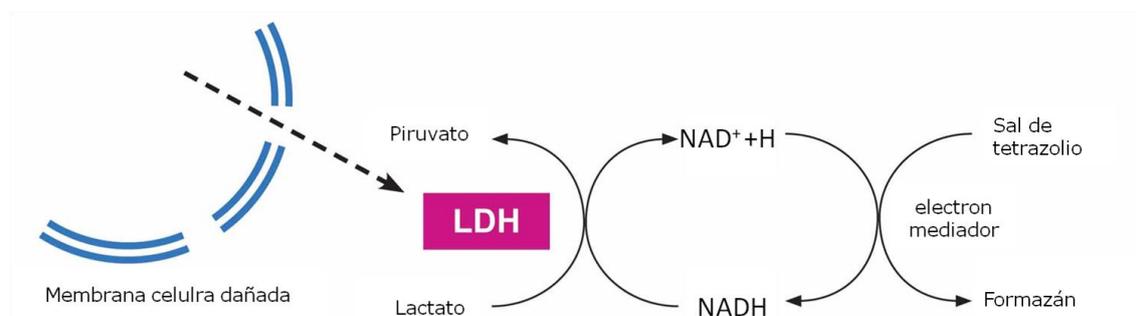


Figura VI 1 Método de detección de LDH

Para este ensayo se utilizaron las muestras descritas en la *Tabla VI 1*, se utilizaron como controles dos tipos de muestras 1) sin tratamiento previo denominada control y 2) una muestra con BSA.

Se sembraron directamente en las placas de cultivos triplicados de diferentes concentraciones celulares para realizar con ello una recta patrón, ya que este es un análisis colorimétrico, en el que se requiere correlacionar la absorbancia medida con el número de células sembradas.

El Kit LDH de Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) emplea lactato de sodio y de INT como colorante de indicador de NADH generado a partir de la catálisis LDH, el mismo está conformado por los siguientes reactivos:

- Solución de lisis.
- Catalizador (mezcla diaforasa/ NAD^+)
- Tinte (lactato de sodio y de INT).
- Solución para detener la reacción.

1. Para poder cuantificar la LDH una vez adheridas las células se les retiró el medio, se lavaron 2 veces con PBS y se les colocó la solución de lisis en cada uno de los pocillos y posteriormente fueron congelados a -80°C

2. Se retiraron las muestras de -80°C y una vez descongeladas, se siguió el proceso mostrado en la *Figura VI 2*, la mezcla realizada fue de 250 μl de catalizador por 11.25ml de tinte; el paso a paso consistió en:

- a. Tomar 100 μl de cada una de las muestras y colocarlo en una placa de 96 pocillos, seguidamente agregar 100 μl de la mezcla (catalizador+tinte). Cubrir con papel aluminio y esperar a ver diferencias de color en las muestras de la recta patrón.
- b. Agregar 50 μl de la solución que detiene la reacción.
- c. Realizar la medición de absorbancia a una longitud de onda de 492nm.

3. Se cuantificó mediante la ecuación de la recta patrón la cantidad de células adheridas en cada una de las muestras de estudio.

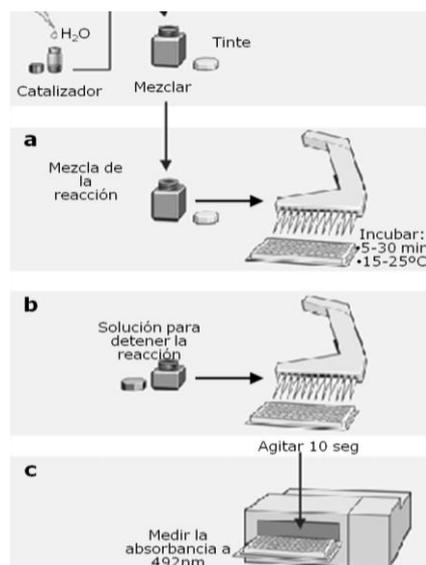


Figura VI 2 Protocolo de LDH.

VI.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

VI.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SEMBRADO CELULAR.

Para determinar el tiempo óptimo para el sembrado celular se hizo una tinción celular con FDA (descrita en el ítem VI.2.2.3), en la cual se siguió el protocolo de sembrado celular, explicado en el apartado VI.2.2.2.

Las muestras fueron observadas en la lupa y se tuvo que a las 2h de adhesión las células se mostraban redondeadas, tanto sobre las muestras como en los pocillos de las placas de cultivo, lo cual indica que las mismas aun no se han adherido correctamente.

Cuando fueron observadas a las 4 horas se notó que comenzaban a extenderse, pero aun sobre las superficies metálicas conservaban una morfología redondeada.

A las 6 horas en la superficie de las muestras se ven las células extendidas y al ser comparadas con las observadas 2 horas más tarde, no mostraron muchas diferencias en su morfología.

En función a estos resultados se determinó que 6 horas es el tiempo óptimo de adhesión, para las células mesenquimales de ratas, en la superficie estudiada.

Para evaluar si las superficies biofuncionalizadas son viables para realizar el análisis de cultivos celulares y por ende pueden ser consideradas no citotóxicas o biocompatibles, se realizó el ensayo de tinción de las células con calceína-AM descrito anteriormente en la sección VI.2.2.4.

Por medio de este ensayo se buscó comprobar que las células responden a la presencia de secuencias peptídicas en superficie. Las imágenes obtenidas son mostradas en la *Figura VI 3*, en la cual se observan favorables y evidentes diferencias entre las muestras que contienen secuencias peptídicas sobre las superficies.

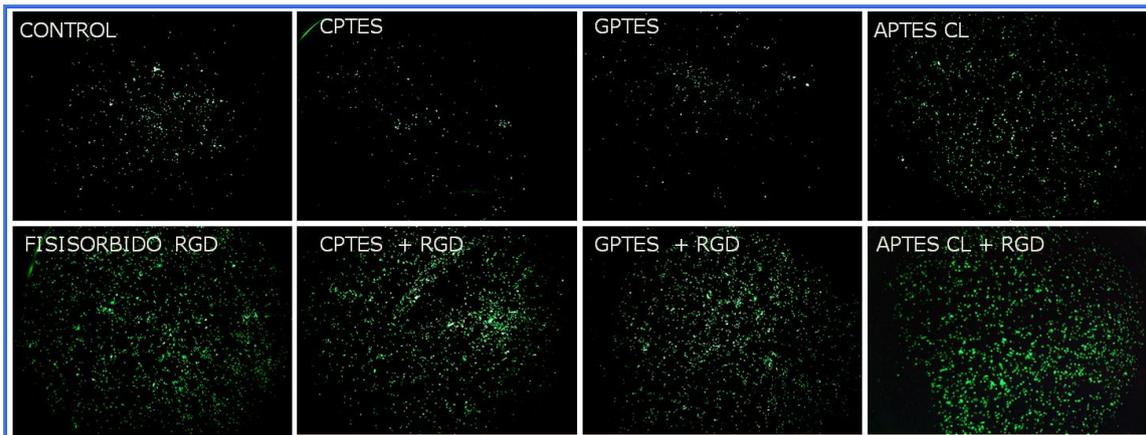


Figura VI 3 Tinción con Calcein-AM.

De lo cual solo con la imagen se puede afirmar, que la adición de secuencias peptídicas mejora la adhesión celular sobre las superficies. No obstante, para tener una información cuantitativa, se midió la intensidad de fluorescencia, mediante el software Image J y los resultados se presentan en la Figura VI 4, donde queda evidenciada la influencia favorable de la inmovilización de biomoléculas, sobre el proceso de adhesión celular.

De esta fase se puede concluir que en **función de la medición de la intensidad de fluorescencia de cada una de las imágenes, las superficies con RGD, emiten mayor fluorescencia que sus homólogas sin péptido, por tanto esta secuencia favorece el proceso de adhesión celular.**

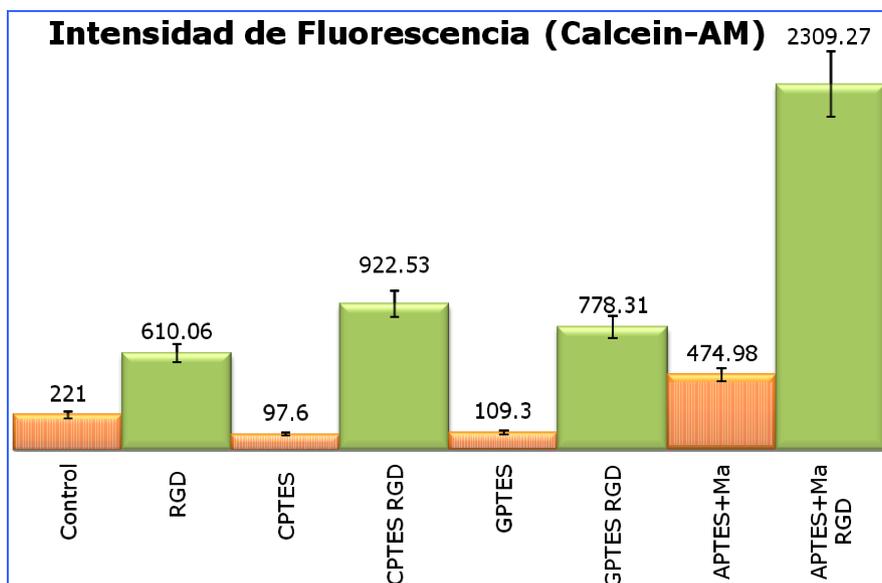


Figura VI 4 Medición de Intensidad de Fluorescencia (Calcein-AM).

Adicionalmente se puede dilucidar que la densidad del silano, guarda una relación directamente proporcional, con el proceso de adhesión celular; ya que anteriormente quedó comprobado que las muestras silanizadas con APTES+Ma, presentan una mayor concentración de silano enlazado al metal, y las mismas arrojan una mayor intensidad de fluorescencia, que se traduce en un mayor número de células sobre la superficie.

VI.3.2 EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN CELULAR.

Para cada uno de los ensayos de adhesión se colocaron 6×10^3 células por pocillo de 1.9 cm^2 , con lo cual se tiene una concentración de $3.16 \times 10^3 \text{ cel/cm}^2$ sobre cada una de las muestras de la Tabla V.1 y en las muestras de control.

Resultados de Inmunofluorescencia (DAPI)

Se hizo un ensayo de adhesión celular, que mediante la tinción de los núcleos, permitió conocer la cantidad de células por cm^2 . Los resultados de este estudio se presentan en la Figura VI 5, donde se puede observar que **las muestras silanizadas con APTES+Ma presentan mayor cantidad de células, que las silanizadas con GPTES; lo cual comprueba que la cantidad de biomolécula adherida, tiene una influencia directamente proporcional, con la adhesión celular;**^{23,24} ya que como se demostró en el capítulo V, las muestras de CoAM, poseen mayor contenido de azufre que las muestras de CoG y una mayor cantidad de péptido en superficie.

Al mismo tiempo el hecho de que las mejores respuestas se den en las muestras con mezclas, puede deberse, a que en estas secuencias existe mayor presencia de grupos aminos, tal cual como se demostró en el capítulo V; basando esta hipótesis en estudios que reportan que las superficies que presentan grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, generalmente provocan una mayor adhesión celular.⁹

Analizando específicamente el uso de RGD+FHRRIKA presenta un considerable aumento en ambas superficies, lo cual avala lo referenciado bibliográficamente, en donde se indica que esta mezcla, mejora el efecto de adhesión e incluso hay estudios que indican que influyen en el proceso de proliferación,²³ lo cual será analizado en un próximo apartado.

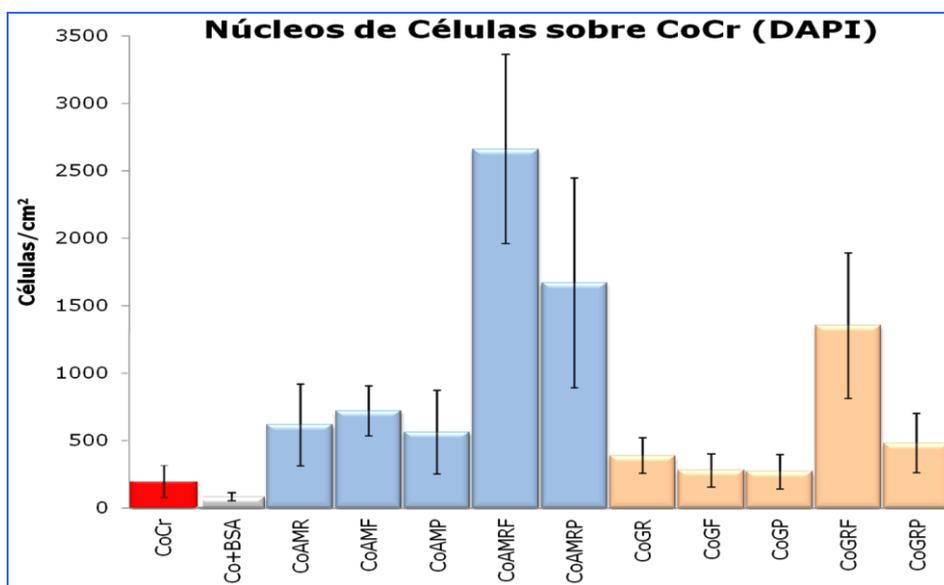


Figura VI 5 Cuantificación de Células Adheridas sobre CoCr mediante Tinción de los Núcleos con DAPI.

En cuanto a la mezcla de RGD+PHSRN, en este ensayo se trabajó con una concentración de péptido de 500 ng/ml ($0.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$) y como puede verse en la Figura VI 5 no se obtuvieron los resultados reportados bibliográficamente, en los cuales se indican que la misma mejora el proceso de adhesión celular, ya que como

puede verse para el caso del APTES+Ma, se presenta un incremento en la densidad de péptido adherido, si se compara con las muestras CoAMR, CoAMF Y CoAMP; sin embargo posee una desviación estándar muy amplia, de igual manera en el caso de las muestras silanizadas con GPTES esta mezcla no posee diferencias estadísticamente significativas con respecto a las muestras de CoGR, CoGF Y CoGP. Para poder entender estos resultados, se analizó y comparo el trabajo realizado, con el efectuado por otros autores y se encontró que la causa de no obtener una notable mejora, puede ser adjudicada a que los estudios que infieren que esta mezcla mejora el proceso de adhesión celular, trabajan con concentraciones de péptidos superiores, aun cuando se tiene gran discrepancia entre los trabajos consultados, por ejemplo: Kao et al. (2001), utilizaron concentraciones de péptidos entre 0.0025mg/ml y 25 mg/ml,²⁵ Feng et al. (2006) trabajaron con una concentración de 10 µg/ml²⁶ y Satriano et al. (2010), utilizaron 1mg/ml.²⁷

De lo expuesto anteriormente, se recomienda para trabajos futuros, optimizar la concentración de la mezcla RGD+PHSRN, con el fin de obtener resultados más eficientes, ya que un buen resultado de la mezcla de RGD+PHSRN indica que se está produciendo la sinergia de RGDS con PHSRN y según lo reportado en la bibliografía, al igual que el RGD, esta mezcla media el proceso de adhesión y estimula la actividad de $\alpha_5\beta_1$,^{10,26,28} cuando se está trabajando con el colágeno,²⁹ que se encuentra presente en la componente orgánica no mineralizada del hueso.⁴

Aun cuando la mayor parte de la bibliografía, reporta efectiva la sinergia de RGD con PHSRN en términos de adhesión.^{27,28,30} Paralelamente existen estudios que afirman que la mezcla RGD+PHSRN estimula la actividad de $\alpha_5\beta_1$, demostrando que conduce a una mejora en los procesos de adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización, si se compara con el efecto que produce al utilizar el RGD solo.^{26,31}

Cabe destacar que la integrina $\alpha_5\beta_1$ ha sido encontrada tanto en osteoblastos de ratas como de humanos, esta integrina parece predominar sobre las interacciones específicas de los osteoblastos con la fibronectina.²⁴

Ahora bien, en la Figura VI 5 también se observa que la muestra de CoCr, sin ningún tratamiento previo, arroja un resultado poco inferior al de algunas de las muestras con biomoléculas, por lo cual es necesario evaluar la morfología de las células, ya que un óptimo resultado es aquel en el que se tiene la mejor relación entre la cantidad de células y la extensión de las mismas.

Resultados SEM.

Para visualizar la morfología y estimar el área de las células se deshidrataron las células según el protocolo descrito e el apartado VI.2.2.5 y se observaron a través del SEM, obteniendo de este modo imágenes de la morfología de las células adheridas en cada una de las superficies (*Figura VI 6* y *Figura VI 7*), con lo cual fue posible realizar la cuantificación del área (*Figura VI 8*).

Al observar las imágenes mostradas en las *Figura VI 6* y *Figura VI 7*, queda comprobado que la adición de biomoléculas influye en la morfología de las células; ya que la muestra control presenta una de célula contraída y de menor área de extensión, comparada con el resto de las muestras.

Así mismo se puede afirmar que la secuencia RGD las hace sentir más cómodas, porque en las superficies que poseen dicho péptido (solo o en mezclas) se observan

células más extendidas, con mayor área y exhiben la presencia de filopodios, lo cual corrobora lo expresado por Petershans.et al., quienes afirman que la secuencia RGDS, aun siendo el motivo más pequeño de la matriz extracelular de la fibronectina, actúa como la integrina receptora del enlace celular, iniciando la formación de contactos de adhesión local.³²

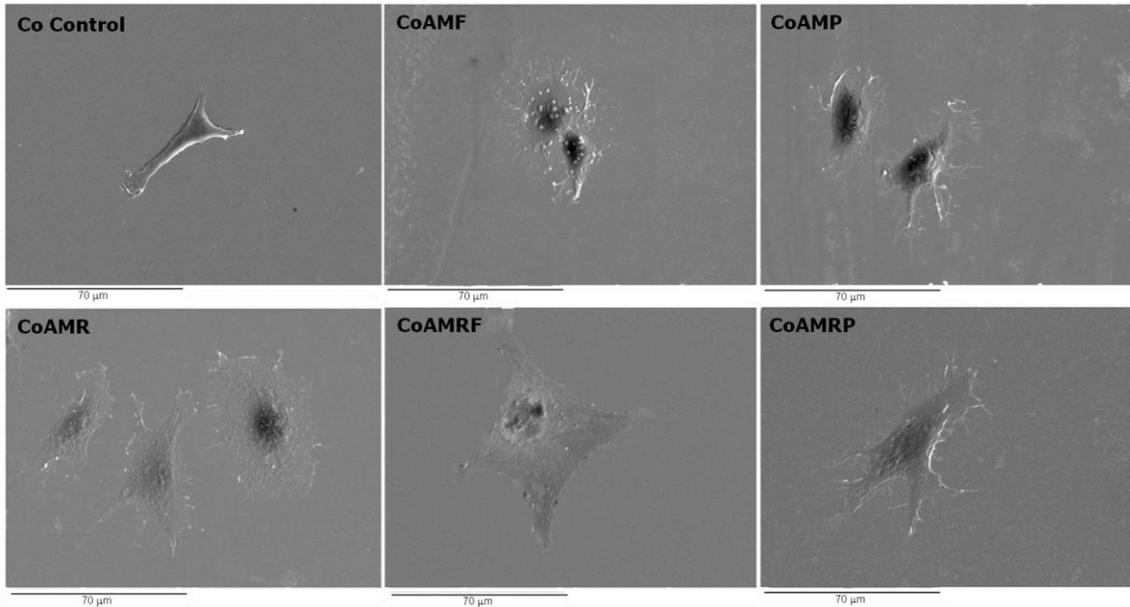


Figura VI 6 SEM de las Células Adheridas sobre CoAM con biomoléculas.

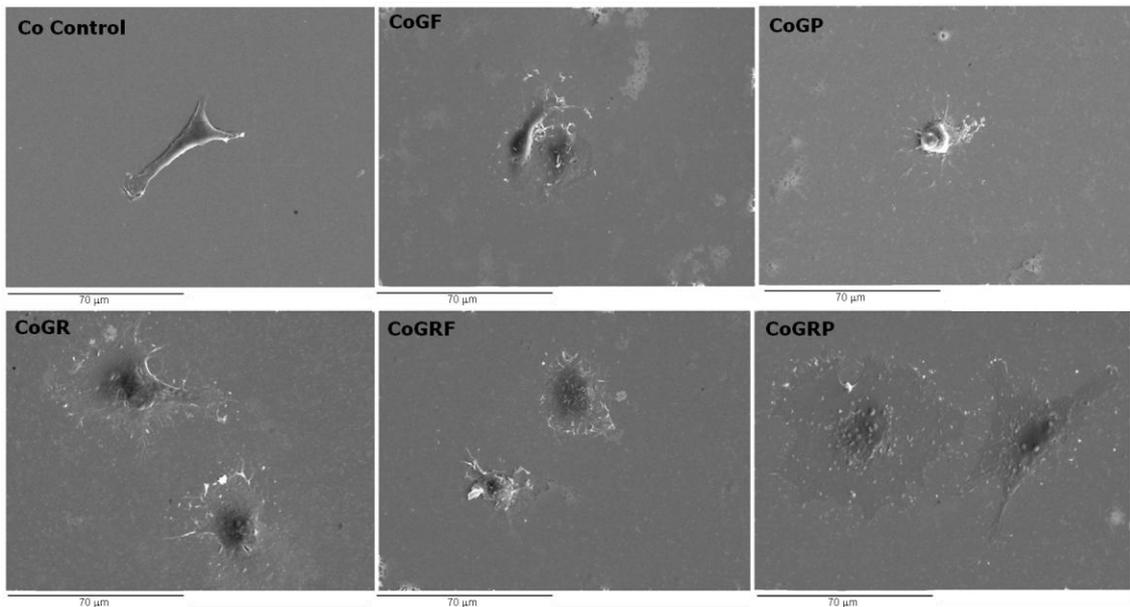


Figura VI 7 SEM de las Células Adheridas sobre CoG con biomoléculas.

Al comparar la muestras silanizadas con APTES+Ma y las tratadas con GPTES, de las imágenes también se puede deducir, que las células se encuentran más a gusto en las muestras que antes de la inmovilización de secuencias peptídicas, fueron silanizadas con APTES+Ma, lo cual vuelve a corroborar que una mayor densidad de biomoléculas influye en el proceso de adhesión celular.^{23,24}

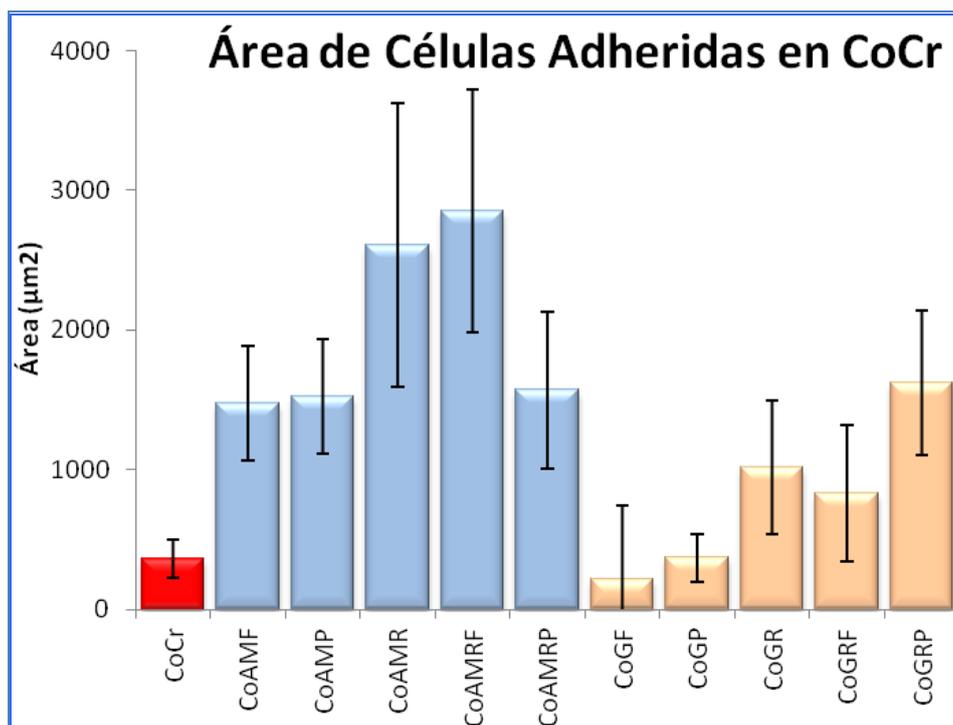


Figura VI 8 Área de las Células Adheridas sobre la Aleación de CoCr

La cuantificación del área celular de este ensayo se muestra en la Figura VI 8, con ella se confirma que las células adheridas en las superficies con APTES+Ma, poseen mayor extensión que las muestras silanizadas con GPTES, por tanto se puede dilucidar que la densidad de péptido adherido en superficie tiene una estrecha relación con el proceso de adhesión celular, ya que como se comprobó el capítulo V, las superficies con APTES+Ma, adsorben más cantidad de péptido que las superficies con GPTES.

Aunado a ello se tiene que dentro de las superficies de CoAM, los mejores resultados se consiguen con las muestras que contienen RGD y RGD+FHRRIKA. En cuanto a las muestras silanizadas de CoG, aun cuando se tienen células con menor área, sin embargo, puede afirmarse que los mejores resultados los exhiben las muestras que contienen RGD (solo o en mezclas); confirmando que ésta secuencia peptídica (RGD) promueve la adhesión celular y que mezclar este péptido con FHRRIKA o PHSRN, mejora la respuesta de adhesión.^{23,26-30,33-36}

En función de los resultados obtenidos, se puede resumir que en cuanto a la densidad de células adheridas, morfología y en términos de área, las muestras que contienen RGD, solo o en mezclas, son las que presentan mejores resultados. Adicionalmente, se confirma que la concentración de biomolécula adsorbida sobre la superficie es una variable dependiente del proceso de adhesión celular; ya que los mejores resultados se presentaron en las muestras de APTES+Ma, que según las conclusiones del capítulo V, son las que adhieren mayor cantidad de péptido. Por tanto se estudiará el proceso de proliferación, sólo en las muestras silanizadas con APTES+Ma que poseen como secuencias peptídicas el RGD y sus mezclas. No se descartarán ninguna de las mezclas, ya que existen estudios previos que indican que el RGD es eficiente en términos de adhesión, pero su mecanismo de acción no es osteoblasto-específico.³⁷

Adicionalmente, estos resultados afirman la hipótesis inicial de esta tesis, donde se buscaba realizar la optimización del proceso de silanización para lograr una mejor adhesión de biomoléculas, e inducir a una mejor adhesión celular. Con este estudio también se puede afirmar que las propiedades físico-químicas de las superficies, son capaces de controlar el tamaño, la forma y la distribución de los puntos de adhesión focal en las células.

VI.3.3 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PROLIFERACIÓN.

Para el ensayo de proliferación se colocaron 2×10^3 células por pocillo de 1.9 cm^2 , con lo cual se tiene una concentración de $1.5 \times 10^3 \text{ cel/cm}^2$ en cada una de las muestras de la Tabla V.1 y en las muestras de control.

Resultados de LDH.

En el proceso de proliferación celular, se desea determinar el aumento de la cantidad de células sobre superficie en función del tiempo. Como se ha mencionado anteriormente la cuantificación de la cantidad de LDH es indicativa, del número de células. Por tanto al cuantificar la cantidad de células presentes sobre las muestras a los diferentes tiempos de estudio (0h, 1d, 3d, 7d y 14d), se tendrá información acerca del proceso de proliferación celular.

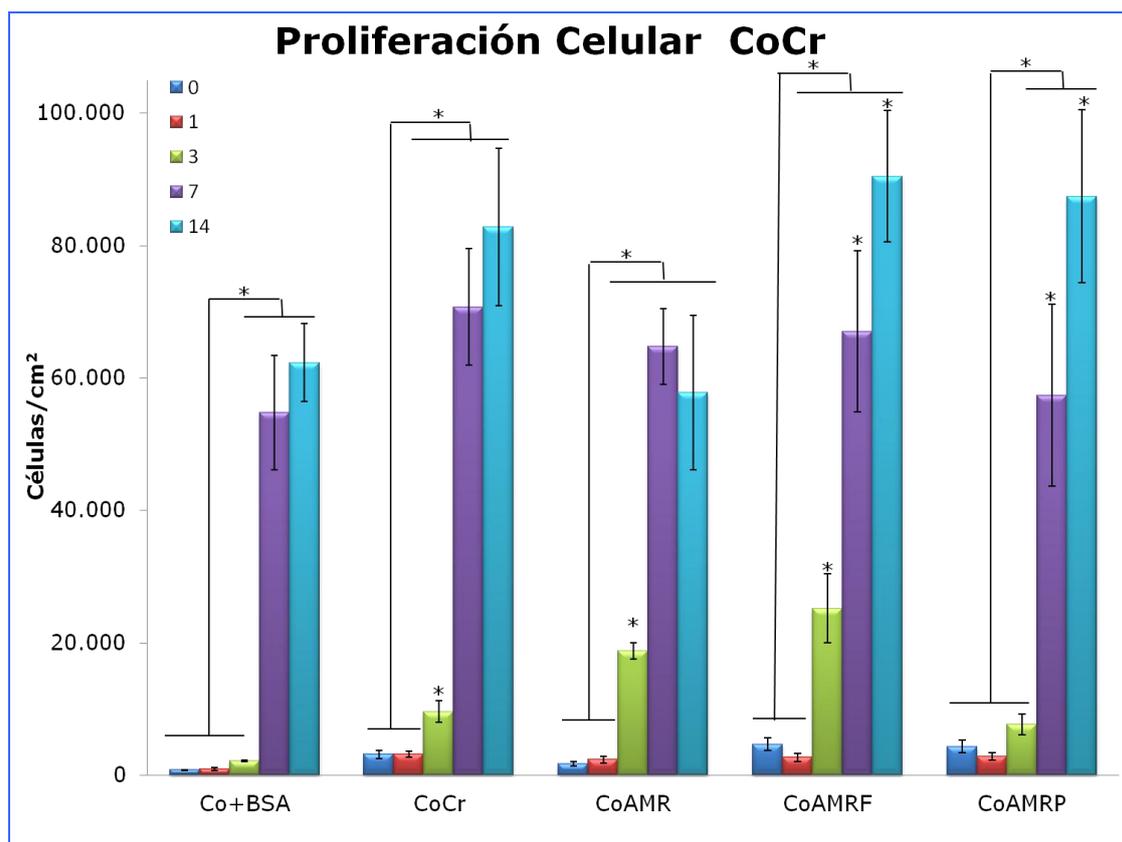


Figura VI 9 Proliferación Celular en las Muestras de CoAM por LDH

Los resultados de los análisis de proliferación se presentan en la Figura VI 9, en estos se demuestra que las superficies de CoCr y cada uno de sus tratamientos, presentan la cualidad de no ser citotóxicas; ya que en todas las muestras las células han proliferado continuamente hasta el último día de medición (14d).

Ahora bien, al evaluar la proliferación se observa que a tiempo 0 horas y 1 día las muestras no presentan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas superficies. Estas diferencias surgen al tercer día en las muestras de CoCr y las que contienen RGD y RGD+FHRRIKA; no obstante es evidente un mayor aumento de la densidad celular en las muestras funcionalizadas (RGD y RGD+FHRRIKA), si se comparan con las de control (CoCr).

Partiendo de la premisa de que las secuencias peptídicas utilizadas se caracterizan por su habilidad para promover o mejorar el proceso de adhesión, el hecho que RGD y RGD+FHRRIKA, proliferen antes que el resto de las muestras; ya que muestran diferencias significativas al 3er día, entre ellas y con el resto de las muestras, indica que estas secuencias peptídicas no solo promueven la adhesión, sino que también estimulan el proceso de proliferación.^{23,29,34,36}

Por otra parte, **si se correlacionan estos resultados con los ensayos de adhesión por Dapi y por SEM, se puede decir que el número de células, por si solo no afecta el proceso de proliferación,**³⁸ **y que ejerce una gran influencia la morfología o la extensión de la células;** ya que si se observa la *Figura VI 5* en la que se cuantifican las células por unidad de área, se tiene una marcada diferencia entre las muestras CoAMR y las muestras con APTES+Ma con mezclas de RGD+FHRRIKA y RGD+PHSRN, no obstante en la *Figura VI 8*, donde se presenta el área celular, no se ven diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de muestras anteriormente mencionadas, corroborándose que la adhesión y la extensión de las células son prerequisites, para la proliferación y subsecuente osteogénesis.³⁹

Diversos estudios han reportado que otra característica importante, para el análisis de la proliferación celular es la velocidad de la proliferación, haciendo uso de curvas de crecimiento, mediante el cálculo de la duplicación poblacional acumulada.⁴⁰⁻⁴²

$$N_H/N_1=2^X$$

Ecuación VI 1⁴⁰

donde:

N_H : Cantidad de células adheridas a la muestra.

N_1 : Cantidad de células sembradas.

X: Duplicación de la población.

La *Figura VI 10* refleja como el mayor valor de duplicación poblacional acumulado es para las células sobre superficies con RGD+FHRRIKA, con un valor superior a 16, por ende se puede decir que esta superficie es la que arroja un mejor resultado en términos de proliferación celular.

Ahora bien, analizando los diferentes tiempos, se tiene que:

- 1) En todo momento las curvas poseen pendientes positivas, resultando entre 0h y el día uno, un aumento muy leve de la concentración celular.
- 2) Durante el día 1 y el día 3 todas las muestras duplican la población, aun cuando comienzan hacerse notorias las diferencias entre ellas, las cuales se mantienen hasta el final del proceso de medición.
- 3) Cabe destacar que la mayor pendiente en todas las curvas se presenta entre los días 3 y 7; por tanto este es el período de mayor proliferación celular.

4) Finalmente en el período del día 7 al día 14 esta inclinación es más ligera, lo cual induce a pensar q a partir de este momento se satura el cultivo por encontrarse las superficies completamente cubiertas por células y por tanto se detiene el proceso de proliferación. El hecho de que se llegue a un estado de confluencia, podría sugerir que las células comienzan a prepararse para el proceso de diferenciación temprana.⁹

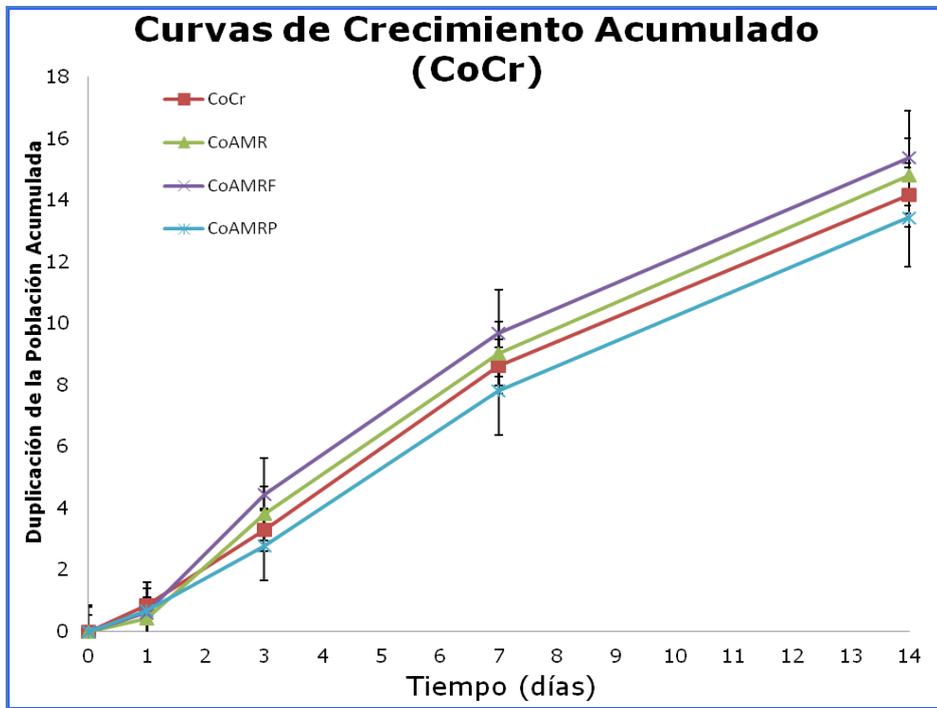


Figura VI 10 Velocidad de Proliferación Celular en las Muestras de CoAM

VI.4 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS CON SECUENCIAS PEPTÍDICAS CORTAS, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO.

En función de los objetivos planteados, se puede afirmar que:

1) Determinar la viabilidad de la adhesión celular sobre las superficies biofuncionalizadas con secuencias peptídicas cortas.

- Por medio de este ensayo se comprobó que las células responden a la presencia de secuencias peptídicas en superficie, mediante un ensayo de tinción de las células con Calceina-AM y las imágenes obtenidas se muestran en la *Figura VI 3*, en este estudio se confirmó que existen diferencias significativas entre las muestras que contienen secuencias peptídicas sobre las superficies, y las que no las contienen *Figura VI 4*, lo cual hace viable y a su vez justifica el uso de secuencias peptídicas cortas.

2) Evaluar la influencia de las secuencias peptídicas sobre la morfología y la cantidad de células adheridas en superficie, para seleccionar los péptido mas favorecedores para la respuesta celular in Vitro.

- Quedó comprobado mediante la tinción con Calceina-AM y el conteo de núcleos mediante la tinción con DAPI, que la adición de secuencias peptídicas sobre las superficies, mejora el proceso de adhesión celular.

- En función de los resultados obtenidos, se puede resumir que en cuanto a la densidad de células adheridas (*Figura VI 5*), morfología y el área (*Figura VI 6* y *Figura VI 7*), las muestras que contienen RGD, solo o en mezclas, son las que presentan mejores resultados. Adicionalmente, se confirma que la concentración de biomolécula adsorbida sobre la superficie es una variable dependiente del proceso de adhesión celular; ya que las muestras silanizadas con APTES+Ma, fueron las que presentaron mayor concentración de biomoléculas (capítulo V), a su vez tienen mayor cantidad de células, que las silanizadas con GPTES.

3) Caracterización del proceso de proliferación celular.

- Se realizaron estudios preliminares para analizar la capacidad de proliferación de las células adheridas partiendo de la premisa de que las secuencias peptídicas utilizadas se caracterizan por su habilidad para promover o mejorar el proceso de adhesión, sin embargo, el hecho que las muestras con RGD y con RGD+FHRRIKA, proliferen antes que el resto de las muestras, indica que estas secuencias peptídicas no solo promueven la adhesión sobre las aleación de CoCr, sino que también estimulan el proceso de proliferación.

Por tanto como conclusión de este capítulo se puede afirmar que la selección del mejor proceso de activación (en términos de limpieza y grupos hidroxilos en superficie (capítulo III)) y de los organosilanos más eficientes (en función de porcentaje y estabilidad del Si (capítulo IV)), da lugar a superficies con mayor densidad de biomolécula adherida (capítulo V) y por ende estas presentan una mejor respuesta celular.

VI.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Arismendi, J. A., Ospina, A. M. & Agudelo, L. P. Oseointegración: Una cascada de eventos. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* (2000).
2. Albrektsson, T., Branemark, P., Hansson, H. A. & Lindström, J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **52**, 155-170 (1981).
3. Vanegas Acosta, J. C., Garzón-alvarado, D. & Casale, M. Interacción entre osteoblastos y superficies de titanio: aplicación en implantes dentales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* **29**, 51-68 (2010).
4. Stevens, M. M. Biomaterials for bone Tissue Engineering. Review. *Materialstoday* **11**, 18-25 (2008).
5. Kraus, K. H. & Kirker-Head, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery* **35**, 232-42 (2006).
6. Kasemo, B. Biological surface science. *Surface Science* **500**, 656-677 (2002).
7. Davies, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education* **67**, 932-49 (2003).
8. Ellingsen, J. E., Thomsen, P. & Lyngstadaas, S. P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontology 2000* **41**, 136-56 (2006).
9. Gonzalez Colominas, M. Optimización de aleaciones B-Ti con Bajo Módulo Elástico, para Aplicaciones Biomédicas. (2011).
10. Bellis, S. L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials* **32**, 4205-10 (2011).
11. Blackmore, D. G. & Rietze, R. L. *Detection and Identification of Tissue Stem Cells: Tracking an Elusive Prey. Heart Development and Regeneration* **II**, 857-875 (Elsevier Inc.: 1990).
12. Boyan, B. D. *et al.* Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu. Rev. Mater. Res* **31**, 357-371 (2001).
13. García-Vázquez, F. A. & Gumbao, D. Inmunolocalización de ADN Exógeno en Espermatozoides Porcinos Sometidos a Diferentes Tratamientos. *Revista Científica, FCV-LUZ* **XXI**, 50-56 (2011).
14. Chollet, C. *et al.* The Effect of RGD Density on Osteoblast and Endothelial Cell Behavior on RGD-grafted Polyethylene Terephthalate Surfaces. *Biomaterials* **30**, 711-20 (2009).
15. Secchi, A. G. *et al.* RGDS peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment , differentiation and confer resistance to apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2006).doi:10.1002/jbm.a
16. Lee, M. H. *et al.* Adhesion of MC3T3-E1 Cells to RGD Peptides of Different Flanking Residues□: Detachment Strength and Correlation with Long-term Cellular Function. *Journal of Biomedical Materials Research* **81**, 150-160
17. Michiardi, A., Francisco, P., Gil, J., José, C. & Bádenas, A. Nuevo Tratamiento de Oxidación en Aleaciones de NiTi para Aplicaciones Biomédicas. Caracterización Superficial de la Respuesta Biológica. (2005).

18. Vázquez, C., Martín, A., Isabel, M. & Susana, D. S. Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología* **3**, 15-38 (2010).
19. Lledó, S. & Aliño, R. A. S. F. Eficacia de la terapia génica antisentido utilizando oligonucleótidos anti K-ras y antitelomerasa en cáncer colorrectal. *Revista española de enfermedades digestivas* **97**, 477-480 (2005).
20. Rincón Arano, H. & Recillas Targa, F. La Arquitectura Nuclear y su Dinámica. *REB* **27**, 130-137 (2008).
21. Baxter, L. C., Frauchiger, V., Textor, M., ap Gwynn, I. & Richards, R. G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *European cells & materials* **4**, 1-17 (2002).
22. Abe, K. & Matsuki, N. Measurement of cellular reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research* **38**, 325-329 (2000).
23. Schuler, M. *et al.* Comparison of the response of cultured osteoblasts and osteoblasts outgrown from rat calvarial bone chips to nonfouling KRSR and FHRRKA-peptide modified rough titanium surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **91**, 517-27 (2009).
24. Ferris, D. M. *et al.* RGD-coated Titanium Implants Stimulate Increased Bone Formation In Vivo. *Biomaterials* **20**, 2323-31 (1999).
25. Kao, W. J., Lee, D., Schense, J. C. & Hubbell, J. a Fibronectin Modulates Macrophage Adhesion and FBGC Formation: The Role of RGD, PHSRN, and PRRARV Domains. *Journal of biomedical materials research* **55**, 79-88 (2001).
26. Ochsenhirt, S. E., Kokkoli, E., McCarthy, J. B. & Tirrell, M. Effect of RGD Secondary Structure and the Synergy Site PHSRN on Cell Adhesion, Spreading and Specific Integrin Engagement. *Biomaterials* **27**, 3863-74 (2006).
27. Satriano, C. *et al.* Surface immobilization of fibronectin-derived PHSRN peptide on functionalized polymer films-effects on fibroblast spreading. *Journal of colloid and interface science* **341**, 232-9 (2010).
28. Feng, Y. & Mrksich, M. The Synergy Peptide PHSRN and the Adhesion Peptide RGD Mediate Cell Adhesion through a Common Mechanism. *Biochemistry* **43**, 15811-21 (2004).
29. Schaffner, P. & Dard, M. M. Review: Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 119- 132 (2003).
30. Livant, D. L. *et al.* The PHSRN Sequence Induces Extracellular Matrix Invasion and Accelerates Wound Healing in Obese Diabetic Mice. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1537-45 (2000).
31. Benoit, D. S. W. & Anseth, K. S. The Effect on Osteoblast Function of Colocalized RGD and PHSRN Epitopes on PEG Surfaces. *Biomaterials* **26**, 5209-20 (2005).
32. Petershans, A. *et al.* ToF-SIMS Analysis of Structured Surfaces Biofunctionalized by a One-step Coupling of a Spacer-linked GRGDS Peptide. *Journal of colloid and interface science* **341**, 30-7 (2010).

33. Anselme, K. Review: Osteoblast Adhesion on Biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667-81 (2000).
34. Tirrell, M., Kokkoli, E. & Biesalski, M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* **500**, 61-83 (2002).
35. Schuler, M., Tosatti, S., Hamilton, D. W. & Sprecher, C. M. Primary Osteoblasts Outgrown from Rat Calvarial Explants Form a " Fried-egg " -like Image on Non-fouling Peptide-modified Titanium Surfaces. *European Cells and Materials* **10**, 2262 (2005).
36. Rezanian, A. & Healy, K. E. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **17**, 615-23 (1999).
37. Bagno, A. *et al.* Human Osteoblast-like Cell Adhesion on Titanium Substrates Covalently Functionalized with Synthetic Peptides. *Bone* **40**, 693-9 (2007).
38. Di Toro, R., Betti, V. & Spampinato, S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(dl-lactide-co-glycolide) copolymers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **21**, 161-169 (2004).
39. Yang, Y., Tian, J., Deng, L. & Ong, J. L. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials* **23**, 1383-9 (2002).
40. Cristofalo, V. J., Allen, R. G., Pignolo, R. J., Martin, B. G. & Beck, J. C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10614-9 (1998).
41. Wagner, W. *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PloS one* **3**, e2213 (2008).
42. Yuan, H., Kaneko, T. & Matsuo, M. Relevance of oxidative stress to the limited replicative capacity of cultured human diploid cells: the limit of cumulative population doublings increases under low concentrations of oxygen and decreases in response to aminotriazole. *Mechanisms of ageing and development* **81**, 159-68 (1995).

CAPÍTULO VII.

Caracterización Físico-Química de la Aleación de TiHfNb Biofuncionalizada.

CAPÍTULO VII.	189
<i>Caracterización Físico-Química de la Aleación de TiHfNb Biofuncionalizada.</i>	189
VII.1 INTRODUCCIÓN	195
VII.2 PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN SUPERFICIAL.	197
VII.2.1 INTRODUCCIÓN.....	197
VII.2.1.1 PLASMA CLEANING.....	197
VII.2.1.2 ATAQUE QUÍMICO PARA LA ALEACIÓN DE Ti.	197
VII.2.2 OBJETIVOS.	198
VII.2.2.1 OBJETIVO GENERAL.	198
VII.2.2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.	198
VII.2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.	199
VII.2.3.1 MATERIALES.....	199
VII.2.3.2 MÉTODOS.	200
VII.2.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	201
VII.2.4.1 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE LA ALEACIÓN DE Ti.....	201
VII.2.4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIMPIEZA.201	
VII.2.4.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE GRUPOS HIDROXILOS EN SUPERFICIE	205
VII.2.4.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CAPA DE ÓXIDOS SUPERFICIALES.....	208
VII.2.4.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES ACTIVADAS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS.	211
VII.3 PROCESO DE SILANIZACIÓN.	213
VII.3.1 OBJETIVOS.	213
VII.3.1.1 OBJETIVO GENERAL.	213
VII.3.1.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.	213
VII.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	215
VII.3.2.1 MATERIALES.....	215
VII.3.2.2 MÉTODOS.	215
VII.3.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.	215
VII.3.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.	215
VII.3.3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.	216
VII.3.3.3 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS MUESTRAS SILANIZADAS.....	220
VII.3.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SUPERFICIES SILANIZADAS, EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	223
VII.4 PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.	225
VII.4.1 OBJETIVOS.	225
VII.4.1.1 OBJETIVO GENERAL.	225

VII.4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	225
VII.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	226
VII.4.2.1 MATERIALES.....	226
VII.4.2.2 MÉTODOS.	226
VII.4.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	226
VII.4.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	226
VII.4.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LAS BIOMOLECULAS EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	231
VII.5 RESPUESTA CELULAR IN VITRO.....	233
VII.5.1 OBJETIVOS.	233
VII.5.1.1 OBJETIVO GENERAL.	233
VII.5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	233
VII.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	234
VII.5.2.1 MATERIALES.....	234
VII.5.2.2 MÉTODOS.	234
VII.5.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	234
VII.5.3.1 EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN CELULAR.....	234
VII.5.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PROLIFERACIÓN.	237
VII.5.4 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS CON SECUENCIAS PEPTÍDICAS CORTAS, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO.....	240
VII.6 BIBLIOGRAFÍA.	241

Índice de Tablas del Capítulo VII

<i>Tabla VII 1 Composición Química de la Aleación de Ti por FRX</i>	201
<i>Tabla VII 2 Rugosidad de la Aleación de Ti.....</i>	201
<i>Tabla VII 3 Valores de la Medición Estática del Ángulo de Contacto</i>	202
<i>Tabla VII 4 Composición Química de la Aleación de Ti por XPS para las Muestras Tratadas y la Muestra Control</i>	203
<i>Tabla VII 5 Composición Química en Porcentaje Atómico de las especies de C 1s por XPS</i>	204
<i>Tabla VII 6 Porcentaje Atómico de las Especies de oxígeno presente en la Aleación de Ti</i>	206
<i>Tabla VII 7 Intensidades de los Fragmentos del Espectro Negativo de ToF SIMS de las Muestras de Ti activadas.</i>	207
<i>Tabla VII 8 Parámetros para la Deconvolución de los Elementos Metálicos de la Aleación de Ti</i>	208
<i>Tabla VII 9 Composición Química en % atómico de la Capa de Óxido de la Aleación de Ti por XPS ^{2,13,29,41,42}</i>	210
<i>Tabla VII 10 Alta Resolución de las Muestras de Ti Silanizadas por XPS</i>	217
<i>Tabla VII 11 Estabilidad Química, Térmica y Mecánica de las Muestras de Ti Silanizadas</i>	221
<i>Tabla VII 12 Resolución del Si 2s del Ensayo de Estabilidad en Ti Silanizado</i>	222
<i>Tabla VII 13 Muestras utilizadas en la Aleación de Ti.....</i>	226
<i>Tabla VII 14 Composición Química por XPS de las Muestras de TiC con Péptidos Adheridos en Superficie.....</i>	227
<i>Tabla VII 15 Composición Química por XPS de las Muestras de TiAM con Péptidos Adheridos en Superficie.....</i>	227
<i>Tabla VII 16 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras TiC con Péptidos</i>	228
<i>Tabla VII 17 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras TiC con Péptidos</i>	229
<i>Tabla VII 18 Muestras Utilizadas en los Distintos Estudios Celulares.</i>	234

Índice de Figuras del Capítulo VII

<i>Figura VII 1 Fabricación de la Aleación de Titanio</i>	200
<i>Figura VII 2 Medida de Ángulo de Contacto y Energía Superficial</i>	202
<i>Figura VII 3 Barrido General mediante XPS de la Aleación de Ti Activadas</i>	203
<i>Figura VII 4 Espectro de C1s para las diferentes muestras de Ti Activadas</i>	204
<i>Figura VII 5 Alta Resolución de los Espectros de O1s de las Muestras de la Aleación de Ti Activadas.....</i>	206
<i>Figura VII 6 Espectro Negativo de las Muestras de Ti Activadas.....</i>	208
<i>Figura VII 7 Concentración Normalizada de los Grupos de OH-act sobre la Superficie de Ti.</i>	209
<i>Figura VII 8 Deconvolución de los espectros de Ti 2p</i>	209
<i>Figura VII 9 Deconvolución de los espectros de Hf 4f</i>	209
<i>Figura VII 10 Deconvolución de los espectros de Nb 3d</i>	209
<i>Figura VII 11 Mojabilidad de las Muestras de Ti Silanizadas</i>	213
<i>Figura VII 12 Espectro Positivo a través de ToF SIMS de las Muestras de Ti Silanizadas</i>	214
<i>Figura VII 13 Espectro Negativo a través de ToF SIMS de las Muestras de Ti Silanizadas</i>	214
<i>Figura VII 14 Deconvolución de los Espectros de Si 2p de las muestras de Ti silanizadas</i>	216
<i>Figura VII 15 Estabilidad de la Mojabilidad de las Muestras de Ti Silanizadas.....</i>	221
<i>Figura VII 16 Cuantificación de Células Adheridas sobre Ti mediante Tinción de los Núcleos con DAPI</i>	235
<i>Figura VII 17 SEM de las células Adheridas sobre TiAM.....</i>	236
<i>Figura VII 18 SEM de las células Adheridas sobre TiC.....</i>	236
<i>Figura VII 19 Área de las Células Adheridas sobre la aleación de Ti</i>	237
<i>Figura VII 20 Proliferación Celular en las Muestras de CoAM por LDH</i>	238
<i>Figura VII 21 Velocidad de Proliferación Celular en las Muestras de TiAM</i>	238

VII.1 INTRODUCCIÓN

Los materiales comercialmente más usados para implantes óseos, presentan módulos elásticos entre 220 GPa (CoCr) y 110 GPa (Ti), sin embargo el hueso cortical posee un módulo elástico cercano a los 25 GPa;¹ por tanto aleaciones con un módulo elástico superior, son propensas a causar un efecto de apantallamiento de carga.²⁻⁸

Por este motivo se ha definido utilizar esta aleación de TiHfNb, que además de exhibir una buena resistencia, al ser libre de Ni, no presenta problemas de reacciones alérgicas y adicionalmente tiene un módulo elástico de 74 GPa,⁵ mas similar al del hueso.

Para este proyecto se seleccionó una aleación Ti libre de Ni, con bajo módulo elástico. La ventaja de poseer un módulo elástico más bajo que las aleaciones comerciales, radica en que si el material protésico tiene un módulo de Young muy elevado, las prótesis adsorben la mayor parte del esfuerzo, dejando al hueso libre de tensiones, esto hace que el hueso trabecular, al ser un tejido vivo y no recibir cargas, disminuya de volumen y se produzca el aflojamiento aséptico de la prótesis.⁹ Se entiende por aflojamiento aséptico la pérdida de fijación de los componentes de la prótesis al hueso, sin infección asociada, lo que causa su falta de funcionalidad y dolor al paciente, requiriendo en ocasiones una segunda intervención.¹⁰

A lo largo de este capítulo se desarrollará la caracterización físico-química del proceso de Biofuncionalización de la aleación de TiHfNb y la influencia de secuencias peptídicas cortas en la respuesta celular in Vitro.

Para llevar a cabo dicha caracterización se ha subdividido el capítulo en cuatro apartados fundamentales:

- Proceso de Limpieza y Activación de la Superficie.
- Proceso de Silanización.
- Proceso de Inmovilización de Secuencias Peptídicas Cortas.
- Respuesta Celular in Vitro.

VII.2 PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN SUPERFICIAL.

VII.2.1 INTRODUCCIÓN.

A lo largo de este apartado se desarrollará la caracterización y optimización de la fase de limpieza y activación para remover los contaminantes provenientes del contacto de las superficies con la atmósfera y para generar superficies altamente reactivas.

Dentro de los diferentes métodos de limpieza y activación se usarán:

- Plasma Cleaning.
- Ataque químico, con piraña.

VII.2.1.1 PLASMA CLEANING.

El proceso de plasma cleaning ha sido descrito en el capítulo III, apartado III.1.1; ya que es el mismo que se ha utilizado para la aleación de CoCr.

VII.2.1.2 ATAQUE QUÍMICO PARA LA ALEACIÓN DE Ti.

Estudios previos reportan que la reacción de piraña es usada como método químico de limpieza y activación de la superficie, por tanto este ha sido el ataque químico usado para la aleación de Ti.¹¹⁻¹⁹

La solución de piraña es una reacción química en la cual están involucrados el ácido sulfúrico y el peróxido de hidrógeno y aunque ambos reactivos tienen dos funciones totalmente diferentes, son dependientes el uno del otro.¹¹ El peróxido de hidrógeno es un compuesto muy inestable, que en presencia de polvo, iones metálicos, sangre, metales o luz, da lugar a su descomposición, produciendo oxígeno y agua. El ácido sulfúrico es capaz de disolver el óxido de titanio a elevada temperatura, una vez la temperatura se eleva, como consecuencia de la descomposición del peróxido de hidrógeno, el ácido sulfúrico disuelve el óxido de titanio de la superficie de la muestra, de esta manera la muestra superficialmente posee titanio puro, entonces el peróxido de hidrógeno al estar en medio ácido es capaz de volver a oxidar el titanio.

Puede considerarse que mediante la reacción de piraña se llega a generar una capa de óxido de titanio sobre la superficie con cierta homogeneidad y sobre la cual se han adicionado grupos hidroxilos.

VII.2.2 OBJETIVOS.

VII.2.2.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar proceso de activación superficial para una aleación de TiNbHf, utilizada en aplicaciones óseas, y seleccionar el mejor tratamiento en términos de introducción de grupos activos en superficie (grupos hidroxilos), grado de limpieza superficial y composición química de la capa de óxidos superficial.

En este estudio se evaluarán procesos tales como el ataque químico, mediante una mezcla de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno (solución de piraña) y el tratamiento de plasma de oxígeno, mediante técnicas de caracterización física y química, de las capas entre 0 nm y 10nm.

VII.2.2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.

Determinación del grado de limpieza obtenido en cada proceso de activación.

La presencia de contaminantes en superficie puede reducir o enmascarar los grupos activos en superficie y, por tanto, aquellos procesos de activación que limpien de una forma eficaz serán los que producirán unos mejores resultados. Para llevar a cabo este objetivo se procedió a:

- La búsqueda de técnicas de caracterización superficial que permitan identificar la presencia de contaminantes en superficie.
- La caracterización físico-química y la cuantificación del grado de contaminantes antes y después del proceso de activación.

Determinación del la densidad de grupos activos (grupos OH⁻) introducidos en la superficie metálica en cada proceso de activación.

Los procesos de activación que introduzcan un mayor relación OH⁻/óxido serán los que producirán los mejores resultados en el proceso de silanización posterior. A priori, en aquellas superficies que presenten una mayor densidad de grupos hidroxilos activos (OH-act) se unirán una mayor cantidad de organosilanos.

Caracterización química de la capa de óxidos superficial antes y después del proceso de activación.

Es importante conocer si los procesos de activación utilizados pueden afectar a la capa de óxidos superficial. La modificación de esta capa protectora tanto en términos de composición química y/o espesor podrá afectar de una forma notable propiedades como la resistencia a la corrosión, liberación de iones o citotoxicidad.

VII.2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.

En todos los ensayos efectuados, se utilizaron triplicados de cada una de las muestras descritas a continuación y las condiciones de ensayo fueron iguales a las usadas para aleación de CoCr.

VII.2.3.1 MATERIALES.

Los tipos de muestras estudiadas fueron:

- | | |
|--|--------|
| • Aleación de Ti sin tratamiento | TiHfNb |
| • Aleación de Ti con Plasma de Oxígeno | TiPO |
| • Aleación de Ti con Piraña | TiPI |

Fabricación de las muestras de Ti Libre de Níquel.

Al no ser una aleación comercial, los botones se fabricaron a partir de trozos de Ti, Hf y Nb con una pureza de 99,9%, el material se fundió en un horno de arco eléctrico a 300 A de intensidad (*Figura VII 1*). Para evitar la oxidación del material en el momento de la fundición, se realizaron 3 purgas (vacío/argón) y para una mayor homogenización se refundió 5 veces cada botón.

Posteriormente se procedió a realizar un tratamiento térmico de homogenización, para el cual fue necesario colocar dentro de una cápsula de cuarzo al vacío, el botón de la aleación con un trozo de Ti puro, de tal manera que este permita reducir la oxidación (*Figura VII 1*).

Dicho tratamiento térmico fue realizado según lo establecido en la tesis de M. González; quien describe que los botones han de ser solubilizados, llevándolos de temperatura ambiente a 1100 °C en 90 min, posteriormente se debe mantener el material a esta temperatura durante 12 horas para lograr la homogenización y evitar la segregación de elementos pesados. Seguidamente se ha de realizar el temple en una mezcla de agua/etanol a 0 °C, rompiendo la cápsula de cristal, para que el botón quede en contacto directo con el líquido.²⁰



Figura VII 1 Fabricación de la Aleación de Titanio

El objetivo del tratamiento térmico es en primer lugar lograr la completa austenización del material, al calentarlo por encima de la temperatura β -transus (703 °C); en segundo lugar retener dicha estructura a temperatura ambiente, templando el material y obteniendo una fase β -metaestable, a partir de la cual puede obtenerse la martensita termo elástica α'' . De acuerdo con los resultados publicados sobre esta aleación, la misma presenta una microestructura β -metaestable, mas placas martensíticas, que permiten obtener un bajo módulo elástico y además bajo determinadas condiciones, muestra una cierta pseudoelasticidad.²⁰

Una vez certificada la composición química de la aleación, a través de un estudio de fluorescencia de Rayos-X, cada botón fue cortado en muestras de 2 mm de espesor, luego bajo el mismo proceso de la aleación de CoCr, se le realizó el pulido especular y la respectiva limpieza (ver capítulo III, apartado III.3.1).

VII.2.3.2 MÉTODOS.

En función de lo expuesto en el capítulo III, los parámetros a estudiar para esta fase son: la activación de las superficies, la cual es evaluada en términos de mojabilidad, energía superficial, densidad de los grupos funcionales reactivos sobre la superficie (OH⁻) y modificación de la composición química de la superficie. Adicionalmente se consideró como variable interviniente la rugosidad, ya que si los tratamientos de modificación superficial, alteran la rugosidad de la superficie, esta podría ser otro factor influyente en la activación superficial.

Para la evaluación física de las superficies, se usaron diversas técnicas: ángulo de contacto, interferometría de luz blanca. Para el análisis químico elemental se emplearon técnicas de caracterización en el rango de 0-10 nm, entre ellas se seleccionaron: ToF SIMS, XPS y la técnica de sustitución del complejo de zinc.

En el capítulo II se detallaron las condiciones de ensayo para la caracterización físico química de las aleaciones estudiadas. A lo largo de este capítulo se discutirán los resultados obtenidos experimentalmente y el fundamento bibliográfico en el cual se apoyan cada uno de ellos.

VII.2.3.2.1 PROCESO DE FABRICACIÓN DE LA ALEACIÓN DE Ti.

Fluorescencia de Rayos X.

La composición química de la aleación fue determinada a través de la fluorescencia de rayos X (X-Ray Fluorescence (FRX)). Se analizaron dos muestras de la aleación, realizándose en cada una de ellas tres medidas, para lo cual se utilizó un equipo Philips PW2400, en condición de 60kv de voltaje.

VII.2.3.2.2 PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE.

Para la limpieza y activación de las superficies, como se ha descrito en el capítulo I, se utilizaran dos mecanismos diferentes:

- 1) plasma de oxígeno¹⁴⁻¹⁹ y
- 2) ataque químico usando una solución de Piraña (ácido sulfúrico + peróxido de hidrógeno).¹¹⁻¹⁹

Plasma de Oxígeno

La descripción de este procedimiento fue descrita en el capítulo III, apartado III.1.1.

Piraña

El ataque de piraña consistió en colocar en un vaso de precipitados las muestras de la aleación de titanio. Se realiza una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y de peróxido de hidrógeno y se vierte sobre los discos de titanio. Se tapa el vaso de precipitados y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante una hora bajo la campana. Por último se limpian y se secan las muestras de la misma manera como se realizó la limpieza en el ataque de ácido nítrico (ver capítulo III, apartado III.3.1).

VII.2.3.2.3 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.

Tal como se describió en el capítulo III, apartado II.3.2.2 para caracterización superficial de la aleación de CoCr, en el proceso de limpieza y activación, se emplearon varias técnicas, entre ellas: ángulo de contacto, XPS, ToF SIMS, Interferometría de Luz Blanca y Técnica de Sustitución del Complejo de Zinc, cuyas condiciones de ensayo, se presentan en el capítulo II.

VII.2.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

VII.2.4.1 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE LA ALEACIÓN DE Ti.

Resultados de Difracción de Rayos X.

Los resultados de la composición química de la aleación de Ti se exhiben en la *Tabla VII 1* y son expresados en porcentajes de peso, junto con un error estimado para cada elemento. Como puede observarse estos fueron satisfactorios; ya que son similares a los valores teóricos de la aleación (Ti-16.2Hf-24.8Nb).

Tabla VII 1 Composición Química de la Aleación de Ti por FRX

Elemento	Ti	Hf	Nb	Zr
% Peso	59.10	16.19	23.59	1.01
Error estimado	0.25	0.21	0.18	0.05

VII.2.4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIMPIEZA.

Se utilizaron 2 tratamientos: 1) Plasma de oxígeno¹⁴⁻¹⁹ y 2) ataque químico con piraña¹¹⁻¹⁹ y a continuación se presenta la caracterización físico-química de cada uno de ellos.

Resultados de Interferometría de Luz Blanca.

Se realizó un estudio por interferometría de luz blanca, para conocer la rugosidad de las muestras, los resultados se muestran en la Tabla VII 2 e indican que **los tratamientos no modifican la nanorugosidad de las superficies, por tanto las mismas pueden seguir siendo consideradas como o superficies lisas o mínimamente rugosas**^{3,21} y con esto se ha comprobado que el efecto de la nanorugosidad no interviene en los resultados de la activación de las superficies.

Tabla VII 2 Rugosidad de la Aleación de Ti

Parámetros	TiHfNb	TiPO	Ti+PI
R_a (nm)	26.3 ± 7.6	22.9 ± 2.4	21.3 ± 5.9
R_{ku}	4.8 ± 2.5	4.8 ± 1.2	3.6 ± 0.8
R_q (nm)	33.3 ± 9.2	29.3 ± 3.2	27.0 ± 7.4

Aunque las muestras no presentan diferencias estadísticamente significativas con la rugosidad promedio, las superficies tratadas con piraña parecen tener una distribución más homogénea de los picos y de los valles, ya que R_{ku} posee un valor más próximo a 3.²²

Resultados de Ángulo de Contacto.

Un parámetro físico a estudiar fue la mojabilidad de la superficie, con el fin de corroborar el proceso de modificación superficial y si mediante los tratamientos de activación, se han conseguido superficies hidrofílicas, idóneas para el proceso de silanización.

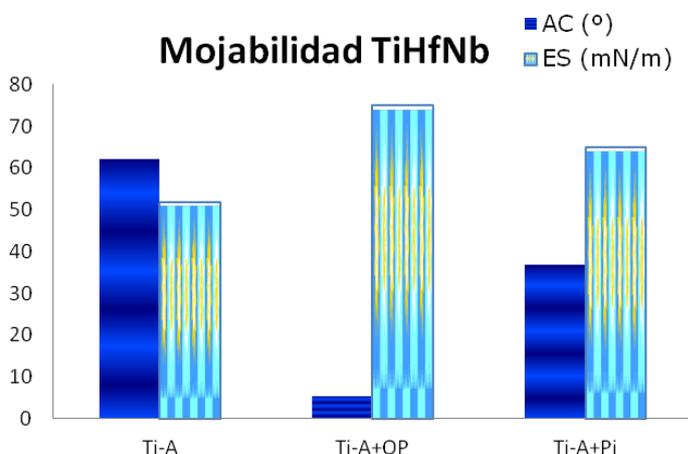


Figura VII 2 Medida de Ángulo de Contacto y Energía Superficial

Se tiene que teóricamente el Ti puro sin ser tratado tiene un ángulo de contacto entre 70° y 80°. ^{23,24} Por medio de este estudio y según los resultados presentados en la Tabla VII 3, se ratifica que los tratamientos producen una modificación superficial; ya que ha decrecido el ángulo de contacto de ≈62° a ≈5° con el plasma de oxígeno y a ≈ 37° con la solución de piraña.

Al mismo tiempo tanto en la Tabla VII 3 como en la Figura VII 2, puede verse un incremento de la energía superficial (ES), mostrando marcadas diferencias entre las muestras, ya que la muestra sin tratamiento posee un valor de ≈ 52 mN/m, la muestra con piraña ≈65 mN/m y el más alto valor lo arrojó el tratamiento de plasma de oxígeno con ≈ 75mN/m, este incremento de la ES implica que las muestras tienen una carácter más polar, causado por la incorporación de radicales sobre la superficie (OH⁻, O₂⁺, O₂⁻, O⁺, O⁻) y/o la eliminación de impurezas. ^{14,17,25} Lo cual a su vez se ve ratificado, al observar los valores de la componente polar, que presenta diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras y demuestra que las muestras luego del proceso de limpieza, son mas polares; ya que se parte de una muestra control a ≈ 11.2 mN/m y luego este valor asciende a ≈ 25.9 mN/m para TiPi y ≈ 39.41 mN/m para TiPO.

En función de estos resultados el plasma de oxígeno resulta más efectivo en términos de mojabilidad y energía superficial.

Tabla VII 3 Valores de la Medición Estática del Ángulo de Contacto

	TiHfNb	TiPO	TiPI
AC (°)	62.1 ± 7.1	5.4 ± 1.6	36.7 ± 7.4
ES (mN/m)	51.9 ± 3.2	74.9 ± 0.6	64.8 ± 3.8
Componente dispersiva	40.8 ± 1.5	35.5 ± 2.0	38.9 ± 1.4
Componente polar	11.2 ± 3.8	39.41 ± 1.4	25.9 ± 4.3

No obstante, esta técnica no permite determinar la composición química de la capa superficial, por tanto para conocer el porcentaje de los carbonos contaminantes presentes y su comportamiento frente a los tratamientos de activación empleados, se procedió a realizar una caracterización química de las superficies.

Resultados de XPS.

Por medio del el barrido general de XPS, se determinó la composición química en porcentaje atómico de la superficie, la cual es mostrada en la Figura VII 3 y el

porcentaje atómico se ve en la *Tabla VII 4*. El mismo ha sido extraído del espectro de multiregiones, para tener una información más precisa.

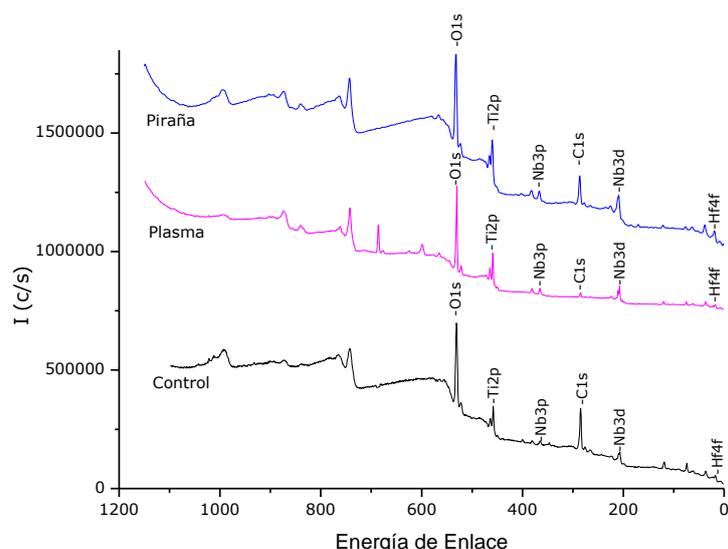


Figura VII 3 Barrido General mediante XPS de la Aleación de Ti Activadas

Las superficies tratadas muestran una considerable reducción del C 1s con diferencias significativas entre ellas, pasando de una muestra sin tratamiento con 42% de contenido de carbono a 32% para el caso del ataque con piraña y a 11% para las tratadas con plasma de oxígeno. Por tanto, **en función de la remoción de los carbonos, se puede considerar que este último tratamiento (PO) es más efectivo.**

Tabla VII 4 Composición Química de la Aleación de Ti por XPS para las Muestras Tratadas y la Muestra Control

	TiHfNb	Ti+ PO	Ti+ PI
C1s	42±2.6	11±0.6	32±2.1
N1s	1±0.2	1±0.1	1±0.1
O1s	46±3.1	58±3.7	52±2.9
Si2p	1±0.3	1±0.2	3±0.3
S2p	0±0.0	0±0.0	1±0.2
Cl2p	0±0.0	0±0.0	0±0.0
Ti 2p	7±0.6	11±0.8	7±0.3
Hf 4f	1±0.1	1±0.2	1±0.1
Nb 3d	2±0.3	2±0.2	3±0.2
F 1s	0±0.0	15±0.9	0±0.0

Para profundizar en las especies de carbonos que han sido removidas, la naturaleza química de los enlaces de carbono presente y conocer ¿cuáles de ellos se destruyen y cuales permanecen?, se realizó un estudio de alta resolución, ya que como se ha mencionado anteriormente, esta información es valiosa en el momento de determinar ¿de qué manera cada uno de los tratamientos realiza el proceso de limpieza y activación?

La superposición de los espectros de C 1s para cada tipo de muestra se presenta en la *Figura VII 4* y el resultado de las deconvoluciones aparece en la *Tabla VII 5*.

La *Figura VII 4* exhibe una evidente disminución del pico de carbono en las muestras activadas, lo cual es un resultado satisfactorio, ya que esto implica, que mediante los tratamientos empleados, se ha conseguido la eliminación de los contaminantes.

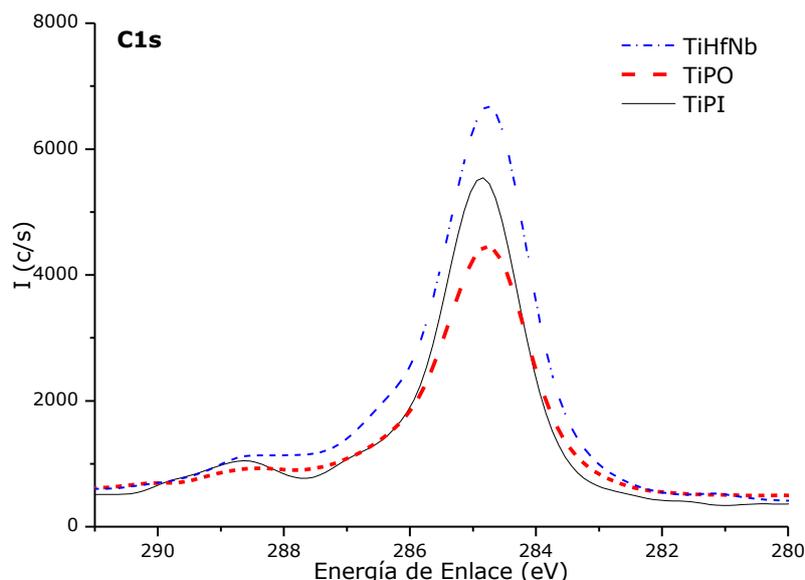


Figura VII 4 Espectro de C1s para las diferentes muestras de Ti Activadas

Ahora bien, se realizó la deconvolución de cada uno de los espectros de carbonos, para obtener la naturaleza química de los enlaces, resultando (al igual como ocurrió en el caso de la aleación de CoCr) que el espectro mostró cuatro contribuciones de especies de carbono (ver capítulo III, Figura III 16)), cuyos porcentajes atómicos son presentados en la Tabla VII 5. Es válido recordad que los resultados de los análisis de alta resolución presentados, están basados en el 100% de la muestra, es decir, (%C1s= %C1+%C2+%C3+%C4) que la sumatoria del área de cada una de las aportaciones de carbono, da como resultado el área total de carbono presente en la muestra.

Tabla VII 5 Composición Química en Porcentaje Atómico de las especies de C 1s por XPS

Pico	Enlace	Ti	TiPO	TiPI	BE (eV)
C 1s		42_{+2.6}	11_{+0.6}	32_{+2.1}	
C1	C-H, C-C	30	6	18	284.9 ±0.4
C2	C=O, C-OH	6	3	10	286.2 ±0.5
C3	C-O, N-C=O	4	2	2	287.2 ±0.5
C4	N-O-C=O	1	0	2	289.3 ±0.5
(C2+C3+C4)/C1		0.40	0.83	0.77	

Al analizar estos datos se observan la tendencia a la disminución de los carbonos alifáticos (C1)^{16,26-28} provenientes de la atmósfera, en las muestras en las que se han efectuado los tratamientos superficiales pasando de un 30% en la muestra control a un 6% para plasma de oxígeno y 18% para piraña. Esta información permite confirmar que con tanto el plasma como la piraña producen un efectivo proceso de limpieza, por eliminar eficazmente el carbono proveniente de la contaminación ambiental.

Adicionalmente puede verse que el plasma de oxígeno rompe o elimina enlaces del tipo C=O, C-OH, C-O, N-C-O; debido a que se presenta una disminución con diferencias significativas en los picos C2 y C3. En contraposición en las muestras tratadas con piraña, se observa un incremento del pico C2 y una disminución del pico C3.^{16,26-31} Al realizar los cocientes entre C2-4/C1 se tiene 0.4 para la muestra control, 0.83 para el plasma de oxígeno y 0.77 para las superficies tratadas con

piraña. De lo cual se puede concluir; que aun cuando los mecanismos que intervienen en cada caso son diferentes, y aunque el plasma de oxígeno posee un menor porcentaje de carbonos alifáticos, **ambos tratamientos son igual de eficientes, porque los valores de la ratio de los carbonos no muestran diferencias estadísticamente significativa entre las muestras con tratamientos superficiales**, pero si las tienen con respecto a la muestra control.

Estos resultados, son útiles para comprender los datos obtenidos en la caracterización de la mojabilidad superficial, ya que se puede deducir que el plasma de oxígeno es más eficaz en la disminución del C 1s (survey), por romper enlaces del tipo C-H y/o C-C, dejando especies más polares sobre las muestras, lo cual contribuye a conseguir superficies más hidrofílicas.

VII.2.4.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE GRUPOS HIDROXILOS EN SUPERFICIE

Con la información de la *Tabla VII 4*, se puede decir, que si bien ambos métodos de activación incrementan el porcentaje atómico del oxígeno, variando de 46% para la muestra sin tratamiento a 52% para la atacada con piraña y 58% para la tratada con plasma, estos datos no son suficientes en el momento de analizar, ¿cuál de ellos resulta más eficiente en términos de activación superficial?

Resultados de XPS.

Con el fin de corroborar si realmente el plasma de oxígeno y la piraña, en el momento de realizar la limpieza superficial, también consiguen activar la superficie con la adición de grupos funcionales (OH^-), se realizó el estudio alta resolución del espectro del O 1s.

Como se ha indicado en el capítulo III, Figura III 8, el espectro de O 1s contiene al menos tres contribuciones (OH^- , O^{2-} y H_2O)^{26,27,31-35}. A través de la alta resolución de este espectro (O 1s) (*Figura VII 5* y *Tabla VII 6*), puede verse un incremento del área de los picos de O^{2-} y OH^- en las muestras tratadas y una modificación en los porcentajes atómicos de cada una de las contribuciones de las diferentes especies.

Según los porcentajes de grupos hidroxilos hay un evidente incremento de estos en las muestras tratadas, pasando de un 10% en la muestra control a un 28% en la muestra con plasma de oxígeno y a 17% para las tratadas con piraña, por tanto ambos tratamientos consiguen activar las superficies.

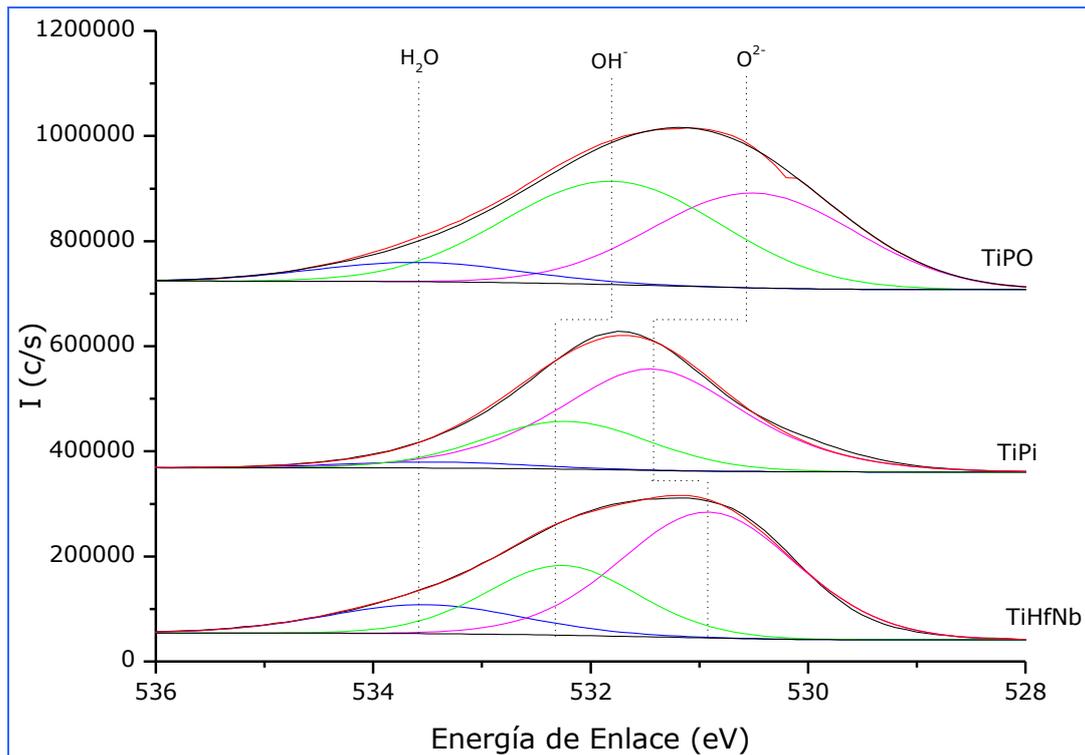


Figura VII 5 Alta Resolución de los Espectros de O1s de las Muestras de la Aleación de Ti Activadas

Tabla VII 6 Porcentaje Atómico de las Especies de oxígeno presente en la Aleación de Ti

	TiHfNb	TiPO	TiPi	BE (eV)
O1s	46_{+3.1}	58_{+3.7}	52_{+2.9}	
O²⁻	28	25	32	530.1 ± 0.5
OH⁻	10	28	17	531.5 ± 0.5
H₂O	8	5	3	533.1 ± 0.4
OH⁻/O²⁻	0.36	1.12	0.53	

No obstante, para confirmar esta tendencia, se efectuó la ratio OH^-/O^{2-} , y se seleccionó la que posee el mayor valor, ya que este indica que se ha incrementado la densidad de grupos OH^- sobre la superficie, por ende se seleccionará así la muestra con un mejor resultado en términos de activación superficial. De lo anterior se concluye que **para la aleación de TiHfNb los mejores resultados del cociente OH^-/O^{2-} se obtienen en las muestras tratadas con plasma de oxígeno con un valor de 1.12, en contraposición con la reacción de piraña que tiene 0.53.**

Resultados de ToF SIMS.

Una vez conocidos los resultados del XPS, se procedió a realizar un análisis, con ToF SIMS, por ser esta una técnica más superficial, que permite identificar fragmentos de moléculas a profundidades entre 0 nm y 5 nm, para detectar los óxidos de la capa superficial y los grupos OH^- presentes.

En el espectro de ToF SIMS (*Figura VII 6*), se puede observar como ambas superficie presentan fragmentos de grupos OH^- , sobre la superficie ($m/z \approx 17$), de igual manera se detecta la presencia de óxidos de Ti a $m/z \approx 64, 65$ y 79 y 80 , pueden ver fragmentos de óxidos de niobio a $m/z \approx 109$ y 125 y un óxido de hafnio a $m/z \approx 196$; el pico que se observa en 119 , bibliográficamente ha sido reportado

como una serie de fragmentos que contienen oxígeno, que en el caso de este estudio, pueden deberse a la presencia de óxidos superficiales o a contaminantes sobre la muestra.³⁶⁻⁴⁰

Para profundizar en estos resultados y poder correlacionarlos con los datos obtenidos mediante el XPS, se realizó la ratio $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$, cuyos resultados son mostrados en la

Tabla VII 7. Como se observa en dicha tabla el plasma de oxígeno posee el valor más alto de la ratio entre los grupos hidroxilos, y la sumatoria de los óxidos de los elementos metálicos de la aleación (Ti, Hf, Nb).

Y en función de lo que se ha mencionado en el ítem anterior, se busca obtener el mayor valor de la ratio $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$, ya que esto implica un incremento de la cantidad de grupos OH^- , sobre la superficie.

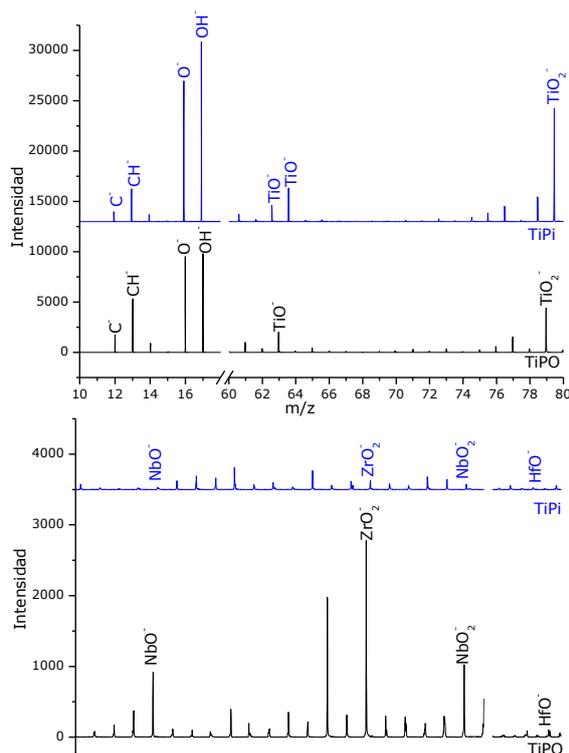


Figura VII 6 Espectro Negativo de las Muestras de Ti Activadas

Tabla VII 7 Intensidades de los Fragmentos del Espectro Negativo de ToF SIMS de las Muestras de Ti activadas.

	Ti-A+OP	Ti-A+Pi	m/z
O^-	15066	25452	16
OH^-	16097	25406	17
TiO^-	314	5284	64
TiO_2^-	794	18753	80
NbO^-	1007	35	109
ZrO_2^-	833	294	122
NbO_2^-	1597	452	125
HfO^-	207	87	196
ÓXIDOS -	4752	24905	
OH-/Ox	3.38	1.02	

De lo que se tiene, que tanto con XPS, como con ToF SIMS, **de los métodos de activación estudiados para la aleación de Ti, el que presenta una mejor activación de las superficies, es el plasma de oxígeno en términos de la ratio $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$.**

Resultados de la Técnica de Sustitución del Complejo de Zinc.

Mediante el uso de esta técnica complementaria se pudo conocer la densidad de los grupos OH-act sobre cada una de las superficies. Es necesario recordar que los datos obtenidos por esta técnica son simplemente orientativos; ya que los mismos autores de la misma, indican que al trabajarse en condiciones diferentes al UHV del XPS y del ToF SIMS, no pueden ser comparables.^{26,27}

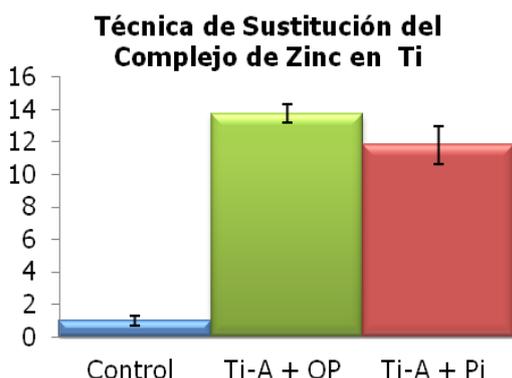


Figura VII 7 Concentración Normalizada de los Grupos de OH-act sobre la Superficie de Ti.

siendo el tratamiento de plasma de oxígeno el que arrojó la mayor C_{OH}/nm^2 , lo que corrobora que es el mejor método de activación para la aleación de Titanio.

Los resultados de este estudio son mostrados en la *Figura VII 7*, donde se exhibe la normalización de las concentraciones de OH-act (C_{OH}), que fue realizada en función de la muestra de TiHfNb (muestra control) sin ningún tratamiento y que presentó una C_{OH} de $443/nm^2$.

Los resultados obtenidos por medio de esta técnica, han servido para corroborar lo descrito por el XPS, en ellos se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras,

VII.2.4.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CAPA DE ÓXIDOS SUPERFICIALES.

Existe documentación bibliográfica que indica que las superficies de Ti contienen en su superficie mayoritariamente de óxido de rutilo (TiO_2), así como también grupos hidroxilos.²⁷ También ha sido reportado que el TiO_2 , es el principal responsable de comportamiento biocompatible del titanio y sus aleaciones.³

Por tanto se estudio la capa superficial de la aleación, para determinar si la misma posee en su superficie este tipo de óxido y si el mismo persiste luego de los tratamientos superficiales empleados, con lo cual se estaría corroborando la biocompatibilidad de la aleación.

Resultados de XPS.

Para conocer los tipos de óxidos se hizo uso el XPS y mediante un estudio de alta resolución de los elementos metálicos (Ti 2p, Hf 4f y Nb 3d), se conocieron los óxidos presentes sobre la superficie. Para la correcta deconvolución y cuantificación de las especies presentes, se fijaron los parámetros de mostrados en la Tabla VII 8.

La deconvolución de los elementos metálicos se muestra en las *Figura VII 8* (perteneciente a una muestra de TiHfNb), *Figura VII 9* (extraída de una muestra de TiPI) y *Figura VII 10* (correspondiente a una muestra de TiPI), en ellos pueden apreciarse los elementos metálicos aparecen a menor energía de enlace y los óxidos a energías de enlaces mayores.

Tabla VII 8 Parámetros para la Deconvolución de los Elementos Metálicos de la Aleación de Ti

Espectro	Orbitales	Relación de Áreas	Δ (eV)
Ti 2p	1/2 3/2	1:2	5.54
Hf 4f	5/2 7/2	3:4	1.71
Nb 3d	3/2 5/2	2:3	2.72

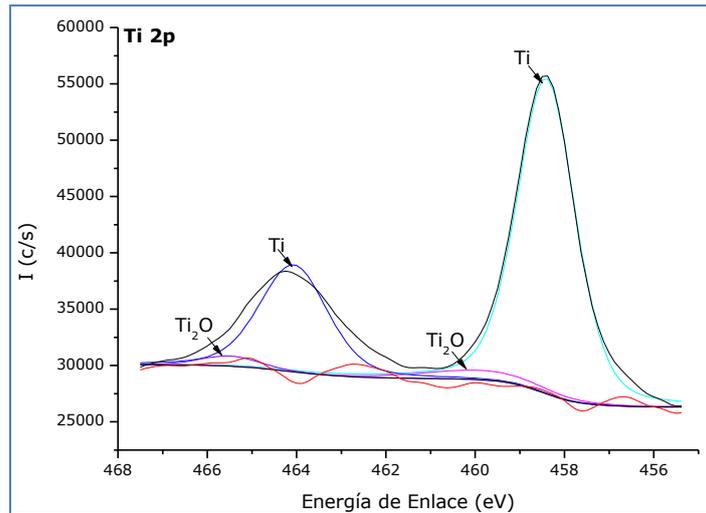


Figura VII 8 Deconvolución de los espectros de Ti 2p

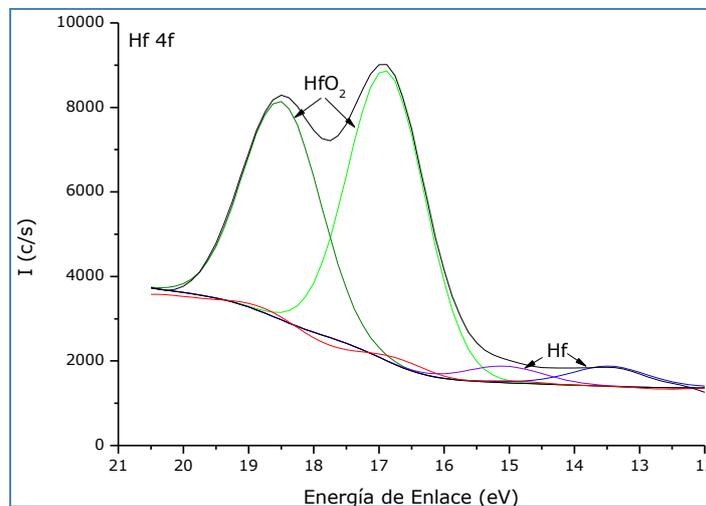


Figura VII 9 Deconvolución de los espectros de Hf 4f

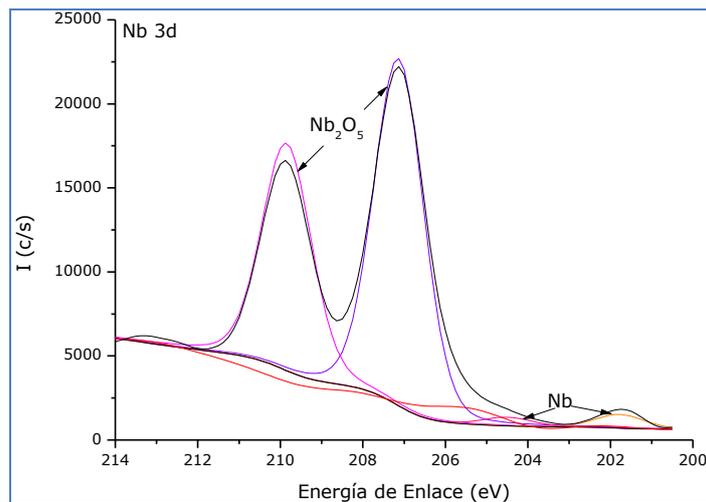


Figura VII 10 Deconvolución de los espectros de Nb 3d

Los resultados de estas deconvoluciones son resumidos en la *Tabla VII 9* y al igual que en el caso de la aleación de CoCr, se han extraído del espectro de multiregiones, por tanto la sumatoria de un elemento metálico mas su respectivo óxido, da como resultado el área del espectro medido (ej.: %Ti 2p=%Ti+%TiO₂).

En dicha tabla se puede observar que los tratamientos aplicados logran aumentar considerablemente el porcentaje de los óxidos, variando de 42% en las muestras sin tratamiento a 88% en las atacadas químicamente y 84% para el plasma de oxígeno, a su vez se determinó que las muestras tratadas tienen un mayor espesor de la película de óxido, ya que se detecta un menor porcentaje de elementos metálicos (58% para TiHfNb, 16% para TiPO y 13% para TiPI).

Tabla VII 9 Composición Química en % atómico de la Capa de Óxido de la Aleación de Ti por XPS^{2,13,29,41,42}

	TiHfNb	TiPO	TiPI	B.E. (eV)	
Ti2p	7_{±0.6}	11_{±0.8}	7_{±0.3}		
Ti	5.2	1.3	0.5	462.0	±0.5
TiO ₂	1.8	9.7	6.5	463.8	±0.5
Hf 4f	1_{±0.1}	1_{±0.2}	1_{±0.1}		
Hf	0.1	0.1	0.2	14.5	±0.5
HfO ₂	0.9	0.9	0,8	18.0	±0.1
Nb 3d	2_{±0.3}	2_{±0.2}	3_{±0.2}		
Nb	0.5	0.7	0.6	204.7	±0.5
Nb ₂ O ₅	1.5	1.3	2.4	208.4	±0.3
Metal	58	16	13		
Óxido	42	84	88		
TiO₂/(HfO₂+Nb₂O₅)	0.75	4.41	2.03		

Como ambos tratamientos incrementan la capa de óxido se realizó un cociente entre el óxido de Ti, que es el mayoritario en todas las muestras y los óxidos de Hf y Nb ($TiO_2/(HfO_2+Nb_2O_5)$), cuyos resultados indican que el Ti es más resistente al ataque químico, por ende las muestras tratadas con plasma de oxígeno presentan un aumento considerable del óxido de rutilo, en función del espesor de la capa de óxidos, al mismo tiempo se corrobora que **el aumento de espesor de la capa de óxido es una consecuencia directa del incremento del TiO₂ que incrementa de ≈ 2% en la muestra control a ≈ 7% con piraña y ≈ 10% con plasma, lo cual según lo reportado en la bibliografía es un excelente resultado ya que este óxido favorece el comportamiento biocompatible del titanio y sus aleaciones.**

VII.2.4.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES ACTIVADAS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS.

Por medio de este estudio se tiene que:

1) **Determinación del grado de limpieza obtenido en cada proceso de activación.**

- El proceso de limpieza de las superficies fue caracterizado por ángulo de contacto, interferometría de luz blanca y XPS. En función de la caracterización física se tiene que los tratamientos de limpieza no modifican la nanorugosidad de las superficies, por tanto pueden seguir siendo consideradas como lisas o mínimamente rugosas. Mientras que la mojabilidad arroja como resultado que ambos tratamientos producen una modificación superficial (*Tabla VII 3*), consiguiendo hacer las muestras más hidrofílicas, ya que se pasa de una muestra control con un valor de $\approx 62^\circ$ a una muestra súper hidrofílica ($\approx 5^\circ$) cuando se utiliza el plasma de oxígeno (PO) y una muestra con 37° para la solución de piraña (PI) ($\approx 37^\circ$).

- A través de un estudio de XPS se tiene que tanto el plasma de oxígeno como la piraña son eficaces en términos de remoción de carbonos, ya que desde un valor inicial de 42% se pasa a 32% para TiPI y 11% para TiOP (*Tabla VII 5*). Sin embargo, la ratio de C2-4/C1 no muestra diferencias significativas.

2) **Determinación de la densidad de grupos activos (grupos OH⁻) introducidos en la superficie metálica en cada proceso de activación.**

- De acuerdo a los resultados de XPS, el PO introduce más oxígeno a la superficie (TiHfNb: 46%, TiPO: 58% y TiPI: 52%) y simultáneamente es este tratamiento el que arroja mejores resultados para el cociente OH⁻/O²⁻, con un valor de 1.12, que se contrapone con 0.53 obtenido para la piraña (*Tabla VII 6*).

- A través de el análisis de ToF SIMS, se tiene que en términos de la ratio OH⁻/O²⁻ es el PO el que produce mejores resultados, teniéndose un valor de 3.38, frente a 1.02 para las muestras tratadas con PI (*Tabla VII 7*).

- La técnica de sustitución del complejo de zinc, sirvió para reafirmar los resultados anteriores; ya que mediante esta se obtuvo una diferencia significativa favorable al PO, en función de la concentración de grupos OH-activos por nm², ver *Figura VII 7*.

A raíz de lo anterior, se puede afirmar que el plasma de oxígeno es mejor que la piraña para la aleación de TiHfNb, en función de ser eficiente en términos de limpieza y de mostrar los mejores resultados para el cociente OH⁻/O²⁻ y la mayor densidad de OH-activos en superficie.

3) **Caracterización química de la capa de óxidos superficial antes y después del proceso de activación.**

- En función de la composición química de la película de óxido, ambos tratamientos generan un incremento en la proporción de TiO₂, pasando de una condición inicial de $\approx 2\%$ a $\approx 7\%$ para Pi y $\approx 10\%$ para PO (*Tabla VII 9*), lo cual es conveniente para futuras etapas del proceso de funcionalización, ya que está reportado que este óxido favorece la biocompatibilidad del Ti y sus aleaciones.

Como conclusión de esta sección y como se ha comentado para la aleación de CoCr la naturaleza química de la capa de óxidos superficiales, tiene una relación directa con las propiedades de resistencia a la corrosión, liberación de iones, citotoxicidad o adsorción de proteínas. Por tanto, para la selección del mejor método de activación se requiere que este sea el más eficiente en términos de limpieza e introducción de grupos hidroxilos, sin modificar la naturaleza de la capa de óxidos, lo cual refuerza la selección del tratamiento de plasma de oxígeno para la aleación de TiHfNb, frente al ataque químico con piraña.

VII.3 PROCESO DE SILANIZACIÓN.

VII.3.1 OBJETIVOS.

VII.3.1.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el proceso de silanización para la aleación de TiNbHf previamente activada y seleccionar el mejor organosilano en términos de porcentajes de silano adherido y estabilidad de la unión silano-metal.

En este estudio se utilizaran tres organosilanos:

- CPTES
- GPTES
- APTES + Maleimido

VII.3.1.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS.

- **Caracterización del proceso de silanización para cada organosilano estudiado.**

A priori, aquellas superficies metálicas que presentan un mayor porcentaje de organosilanos adheridos serán las más susceptibles a enlazar mayor cantidad de biomoléculas y por tanto, de obtener una mejor respuesta celular.

Para obtener este objetivo se procedió a:

- La búsqueda de técnicas de caracterización superficial que permitieran identificar la presencia de los organosilanos en superficie.
- La caracterización físico-química y cuantificación del silicio presente en las superficies silanizadas, antes y después del proceso de silanización
- **Determinación de la estabilidad térmica, química y mecánica de la unión silano-metal.**

Los procesos de silanización deben formar enlaces covalentes o lo suficientemente fuertes, por tanto si se demuestra que son estables térmica, química y mecánicamente, se podría garantizar que se ha creado una interfaz eficiente para la unión metal-silano-biomolécula.

Tras la caracterización físico-química de las superficies activadas se tiene que: Ya que para elegir un método de activación interesa aquel que limpie e introduzca grupos hidroxilos, sin modificar la naturaleza de la capa de óxidos superficiales, los resultados refuerzan la utilización del plasma de oxígeno

frente al ataque ácido

VII.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.3.2.1 MATERIALES.

Se trabajó con triplicados de cada tipo de muestra de la aleación de TiHfNb, previamente activada con plasma de oxígeno.

La nomenclatura utilizada para cada tipo de muestra fue:

- Aleación de Ti con CPTES TiC
- Aleación de Ti con GPTES TiG
- Aleación de Ti con APTES +Maleimido TiAM

VII.3.2.2 MÉTODOS.

VII.3.2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para la preparación de las muestras, se siguió el protocolo descrito en el capítulo III, apartado III.2.2.1

VII.3.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

VII.3.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.

Resultados de Ángulo de Contacto.

Para obtener una caracterización física cualitativa de las superficies silanizadas, se empleó como técnica de medición el ángulo de contacto, mostrándose los resultados obtenidos en la *Figura VII 11*, en la cual es notorio que las muestras de titanio silanizadas, exhiben valores muy similares a los obtenidos en la aleación de CoCr, lo cual es perfectamente justificable ya que la gota no está en contacto directo con los óxidos de la superficie metálica, sino que esta interactuando con la capa nanométrica de organosilanos que está recubriendo cada una de las superficies.

También puede observarse que las todas las muestras silanizadas pasaron de un ángulo de contacto de aproximadamente 5° a valores superiores a los 65° , comprobándose así que hubo una modificación superficial.⁴³ Del mismo modo, se tiene

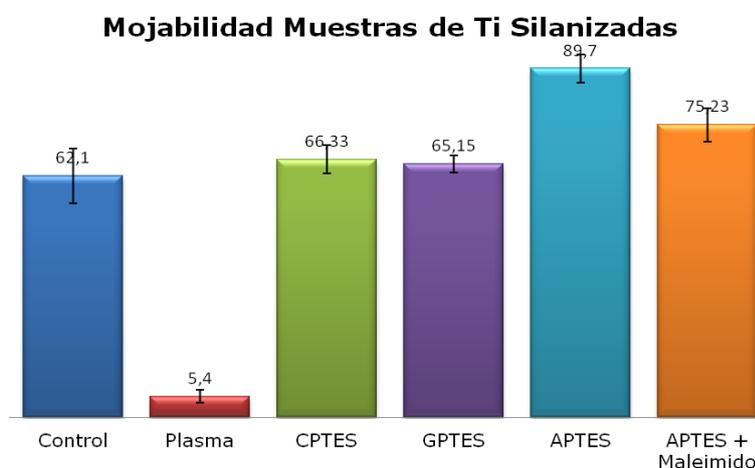


Figura VII 11 Mojabilidad de las Muestras de Ti Silanizadas

que el crosslinker también produce cambios sobre la superficie silanizada con APTES, ya que el ángulo decrece de $\approx 90^\circ$ a $\approx 75^\circ$.

Si se observa la desviación estándar de las mediciones, se puede concluir que ***aun cuando las medidas son realizadas de manera aleatoria en diferentes puntos de cada muestra, la tendencia está orientada a un valor constante, por tanto se deduce que las superficies se han silanizado homogéneamente.***

Ahora bien, con el objetivo de profundizar en cómo la composición química de cada organosilano, influye en el proceso de silanización y al mismo tiempo de determinar si los mismos se encuentran enlazados al metal, se realizó una caracterización química de las capas silanizadas.

VII.3.3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS CAPAS SILANIZADAS.

Para evaluar la eficiencia del proceso de silanización, en términos de detección de la presencia de los órganos silanos y determinación de los enlaces Si-O-metal, se utilizaron dos técnicas de caracterización química: ToF SIMS y XPS.

Resultados de ToF SIMS.

Aun cuando mediante el ToF SIMS no se pueden identificar los tipos de enlaces entre los organosilanos y el metal, esta técnica es de gran utilidad, ya que permite conocer fragmentos de moléculas presentes en la capa superficial (0 nm-5 nm).

Los resultados de ToF SIMS son mostrados en la *Figura VII 12* y *Figura VII 13*, donde en el espectro positivo (*Figura VII 12*), se tiene que en todas las muestras silanizadas aparecen los picos de Si^+ y Si-OH^+ , ($m/z \approx 28$ y 45), que sugieren la presencia del silano sobre la superficie. Al mismo tiempo puede verse el TiO^+ ($m/z \approx 57$), TiO_2^+ ($m/z \approx 80$) y Ti^+ ($m/z \approx 48$), este elemento metálico se aprecia en todas las muestras, menos en TiAM, ya que este silano tiene una cadena más larga y por ende forma una capa más gruesa, y como esta técnica realiza una medición entre 0 nm y 5 nm, se hace imposible apreciar los metales.^{36,37,44,45}

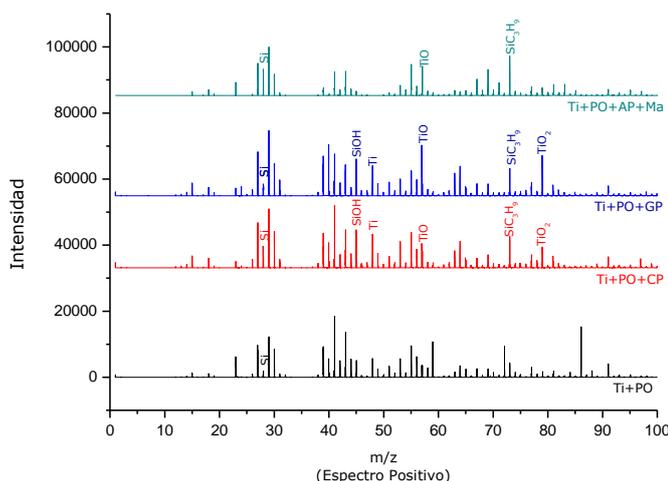


Figura VII 12 Espectro Positivo a través de ToF SIMS de las Muestras de Ti Silanizadas

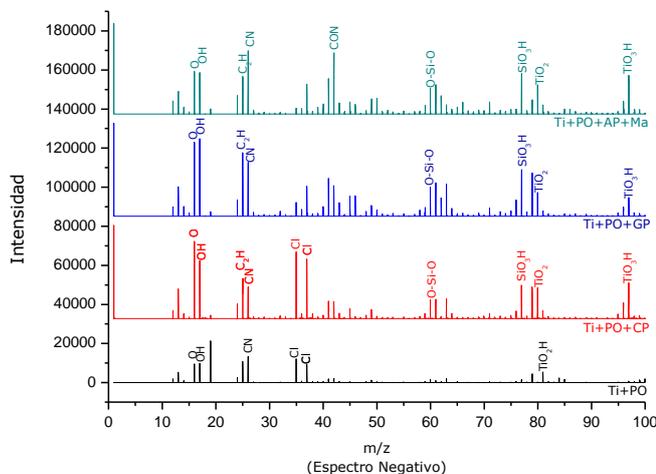


Figura VII 13 Espectro Negativo a través de ToF SIMS de las Muestras de Ti Silanizadas

En el espectro negativo (*Figura VII 13*), se puede confirmar que todas las superficies han sido silanizadas, ya que muestran la presencia de **O-Si-O⁻** a $m/z \approx 60$. Adicionalmente en este espectro, otros datos comprobatorios de la presencia de los organosilanos, son la presencia del Cl⁻ ($m/z \approx 35$ y 37) para las muestras con CPTES y el incremento de CN⁻ y CON⁻ ($m/z \approx 26$ y 42) para el caso del APTES+Ma. Además aparecen los picos de O⁻ ($m/z \approx 16$), OH⁻ ($m/z \approx 17$) TiO₂⁻ ($m/z \approx 80$) y TiO₂OH⁻ ($m/z \approx 97$).^{37,44,46}

La identificación de fragmentos de O-Si-O⁻ y Si⁺, en todas las capas silanizadas, es una forma cualitativa de confirmar la presencia de los organosilanos en superficie. Ahora bien, para saber si los silanos están enlazados covalentemente se hará uso del XPS.

Resultados de XPS.

Con el fin de conocer la composición química de las superficies y determinar la efectividad de cada uno de los silanos, se realizó un barrido general mediante XPS y los resultados son presentados en la *Tabla VII 10* en las filas de sombreadas.

Tabla VII 10 Alta Resolución de las Muestras de Ti Silanizadas por XPS

PICOS	TiHfNb	TiPO	TiC	TiG	TiAM	BE
C 1s	42_{±2.6}	10_{±0.5}	31_{±3.0}	28_{±2.4}	55_{±3.7}	
C-C, CH ₂ , C-H	C1	32	9	22	20	46 284.8 ± 0.1
CH ₂ N, C-N, C-O, C-OH	C2	6	1	7	6	7 286.6 ± 0.4
O-C=O, C=O, Grupo imida	C3	4	0	2	2	2 288.7 ± 0.6
N 1s	1_{±0.2}	1_{±0.1}	1_{±0.1}	1_{±0.1}	10_{±0.9}	
NSi ₃ , TiN	N1	0.7		0.3	0.3	0.8 397.4 ± 1.1
NCO, NH ₃ , NH ₂ Grupo imida	N2	1.3		0.7	0.7	8.6 399.8 ± 0.4
O 1s	46_{±3.1}	60_{±2.9}	50_{±3.4}	55_{±3.2}	23_{±1.9}	
O ²⁻ , TiO ₂	O1	23	25	27	31	2 530.2 ± 0.4
Ti-O-Si, OH ⁻	O2	3	27	16	17	19 531.3 ± 0.9
H ₂ O, C=O, C-O	O3	20	11	7	7	2 533.2 ± 0.4
Si 2p	1_{±0.3}	1_{±0.1}	5_{±0.3}	2_{±0.1}	12_{±1.0}	
SiC, SiO _x	S1	1	1	2.1	1.3	7.1
Si-O-Ti O-Si-O	S2	0	0	2.9	0.7	4.9
Cl 2P	0_{±0.0}	1_{±0.3}	2_{±0.1}	1_{±0.1}	0_{±0.0}	
Ti 2P	7_{±0.6}	22_{±2.1}	8_{±0.4}	10_{±0.7}	0_{±0.0}	
Nb 3d	2_{±0.3}	4_{±0.3}	2_{±0.1}	2_{±0.1}	0_{±0.0}	
Hf 4F	1_{±0.1}	1_{±0.2}	1_{±0.1}	1_{±0.2}	0_{±0.0}	
O2/Si2			5.51	24.29	3.87	
Cl/Si2			0.69			
N2/Si2					1.75	

Con los datos obtenidos se puede confirmar la presencia de los silanos en superficie, ya que:

- 1) En las muestras silanizadas se exhibe la presencia de Si 2p,
- 2) Se observa un incremento del porcentaje atómico del carbono, que ha de ser debido a las cadenas carbonadas de los silanos y
- 3) Se presenta una disminución de los elementos metálicos, debido a la formación de una capa de silanos sobre ellos.
- 4) Se observa la presencia de Cl 2p en las muestras de TiC

De lo anteriormente expuesto, y **en función de los resultados del barrido general se puede inferir que la muestra de TiAM, genera un mejor resultado, porque:**

1) Contiene mayor cantidad de de Si (12%) que TiC (5%) y TiG (2%) y

2) Presenta menor porcentaje de elementos metálicos, debido a que posee una capa más gruesa, por poseer una cadena de mayor longitud.

Con el objeto de profundizar en el tipo de enlaces que efectúan los silanos con las superficies metálicas se realizó un estudio de alta resolución del Si 2p, Cl 2p, N 1s, C1s y O 1s, para determinar los enlaces del proceso de silanización (Tabla VII 10). Las razones de selección de estos elementos fueron explicadas en el capítulo III, apartado III.3.2.

Pico de Si 2p.

Como se ha mencionado anteriormente, los silanos contienen un átomo de Si, por tanto la presencia de este elemento es un indicativo de que el silano se encuentra en la superficie de las muestras. Ahora bien, para determinar ¿de qué manera este silano se enlaza con el metal? se realizó su deconvolución (Figura VII 14, correspondiente a una muestra de TiC), mediante la cual se obtuvo que, tal cual como ocurrió con las muestras de CoCr, aparece una muy baja cantidad de Si1 en las muestras sin silanizar proveniente del papel de SiC usado en el desbastado, pulido y SiO_x (Tabla VII 10).

Las aportaciones del pico Si2 son atribuidas a los enlaces **Si-O-metal** y el enlace siloxano (O-Si-O)^{13,28,31,35} razón por la cual es totalmente justificable que este pico solo aparezca en las muestras silanizadas, y el mismo permite deducir que gran parte del silano presente está enlazado con el metal.

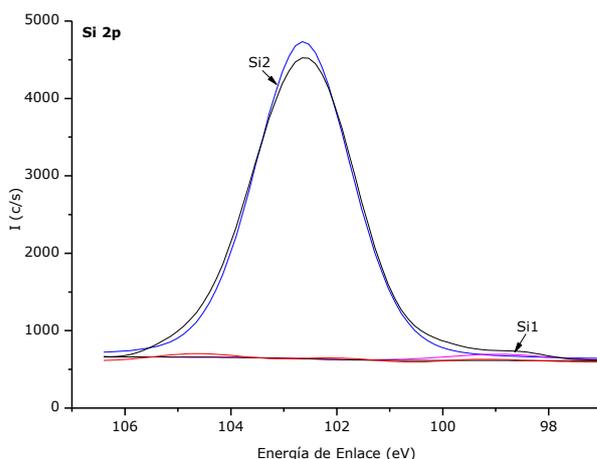


Figura VII 14 Deconvolución de los Espectros de Si 2p de las muestras de Ti silanizadas

En referencia a las muestras de TiAM y TiC se tiene que el mayor porcentaje de Si presente se debe a las aportaciones del Si2. Por tanto, se puede decir que para estas muestras la mayor parte del silano se ha unido a las superficies.

Es importante acotar que en las muestras silanizadas con GPTES, se aprecia un 2% de contenido de Si 2p ubicado mayoritariamente en el pico Si1, debido a contaminantes y no al enlace del silano con el metal.

Pico de O 1s.

El espectro del O 1s, como se ha mencionado con anterioridad, está conformado por tres picos de los cuales:

El O1 a 530.15 eV se adjudica en las muestras silanizadas tanto a los óxidos de Ti como a los enlaces **O-Si**^{2,28,29,31,46-48} y al igual que en la aleación de CoCr, este valor es mayor para el CPTES y el GPTES, ya que estos al poseer una cadena carbonada más corta, permiten al detector del XPS medir parte de la capa silanizada y parte de la película de óxido.

Por el contrario, para el caso de TiAM, el valor en este pico es más bajo, porque las muestras se encuentran recubiertas por las cadenas carbonadas más largas, propias del silano y del maleimido, por tanto la contribución del pico O1 ha de ser mayoritariamente debida al enlace **O-Si**.^{2,8,28}

El nivel de enlace del pico de O2 a 531.3 eV, se asocia a los grupos hidroxilos (**OH-metal**) y a la contribución de **Si-O-Ti**, enlace que indica que el silano, no sólo, está depositado sobre la superficie; sino que se encuentra adherido al metal.²⁸ Por tanto el proceso de silanización ha sido exitoso. En este pico se han reportado otras contribuciones, tales como COOH y O=C-N, que en el caso de los silanos estudiados, estarán asociados al APTES y al crosslinker.

El pico en O3 muestra la presencia de agua adsorbida en las superficies y de los enlaces Si-OH y C=O.^{28,35}

Para profundizar en estos resultados, se ha realizado el cociente O2/Si2 y partiendo de la premisa que por cada metal-OH se debe producir un enlace metal-O-Si, se tiene que el valor teórico de esta ratio es igual a 1. Por tanto, de las muestras estudiadas el mejor resultado lo presentan las muestras de TiAM (3.87), seguidas por TiC (5.51) y sin embargo el GPTES presenta un valor de 24.29 que se aleja mucho de la unidad.

Estos resultados demuestran que el tratamiento más eficiente es el APTES+Ma, aun cuando el CPTES también presenta una ratio aceptable, no obstante por medio de ellos se infiere que la silanización con GPTES para la aleación de Ti, no ha sido efectiva; ya sea porque se requería de una mayor concentración inicial del silano, o porque el proceso se ha visto afectado a causa de

- 1) la hidrólisis,
- 2) de estabilidad química-mecánica, o
- 3) que cierto porcentaje de OH⁻ no ha reaccionado con el silano.

Pico de Cl 2p.

La aparición del cloro sobre una superficie silanizada con CPTES, es un indicativo de que la superficie ha sido silanizada, ya que este contiene un átomo de cloro en su grupo organofuncional (Figura III.3).

En los resultados experimentales **se identifica el CPTES, mediante la aparición del pico Cl, correspondiente al grupo organofuncional de dicho silano,** no obstante relación Cl/Si2 resultó igual a 0.69 y teóricamente debiera ser 1.

En el capítulo III, apartado III.3.2, se obtuvo un resultado similar para la aleación de CoCr y se han planteado dos hipótesis para justificar la disminución de esta ratio, que de una manera resumida, podría decirse que es debida a 1) ataques

nucleófilos del Cl con grupos OH^- que no han reaccionado, durante el proceso de silanización, y/o 2) ataques nucleófilos, producto de no trabajar en un ambiente 100% anhídrido.

Pico de N 1s.

La deconvolución de este pico para la aleación de Ti es mostrada en el capítulo III, Figura III.13, y según lo presentado en la *Tabla VII 10* es notorio el incremento del porcentaje atómico de N2, para las muestras de TiAM, y el mismo se debe a la presencia del grupo imida propio del crosslinker (maleimido).^{29,31,46-48}

Para cuantificar la efectividad del proceso se realizó el cociente N/Si2,^{29,31,47} y en esta aleación se vuelve a demostrar que existe una polimerización lateral ya que teóricamente, esta relación debería dar 2 y experimentalmente se ha presentado una disminución a 1.75.

Hipotéticamente, a causa de esta polimerización se puede justificar que las muestras silanizadas con APTES presentan una capa más gruesa y por ello mediante el XPS no es posible la detección de los metales.

Pico de C 1s.

Sabiendo que en todos los silanos usados existen enlaces de CH_2 , se justifica el hecho que en todas las muestras el C1 es mayoritario, predominando este aumento en el caso del TiAM; por contener una cadena carbonada de mayor longitud. No obstante es conveniente acotar que C1 también es consecuencia del carbono presente sobre la superficie.⁴⁹

El pico de C2 aumenta ya que todos los organosilanos al enlazarse con la superficie, presentan enlaces del tipo C-O. Para las muestras con APTES+ Ma este pico es asignado a la aminas, CH_2N y a los grupos $\text{CH}_2\text{-O}$.^{16,26-31,46-48,50}

En resumen de los estudios de alta resolución de los diferentes espectros, se puede afirmar que: ***el silicio presente en las superficie es debido mayoritariamente a la presencia del enlace Si-O-Ti, lo cual se traduce a un enlace covalente entre el silano y las superficies activadas, al mismo tiempo que en términos de la ratio O2/Si2, el APTES+Ma es el que arroja los mejores resultados.***

VII.3.3.3 ESTABILIDAD QUÍMICA, TÉRMICA Y MECÁNICA DE LAS MUESTRAS SILANIZADAS.

Resultados de Ángulo de Contacto.

Para determinar si los enlaces de Si-O-metal, mostrados en el apartado anterior son covalentes, las muestras se sometieron a un ensayo de estabilidad química, térmica y mecánica, cuyas condiciones se han explicado en el capítulo IV, apartado IV.3.3. El criterio de selección ha sido la permanencia del enlace Si-O-Ti pasadas las 24 h del ensayo.

En cuanto a la estabilidad del proceso de silanización, se tiene que hipotéticamente una muestra es estable si su mojabilidad permanece constante, luego de estar sometida a agitación constante durante 24h a 37 °C y dentro de una solución a pH neutro.

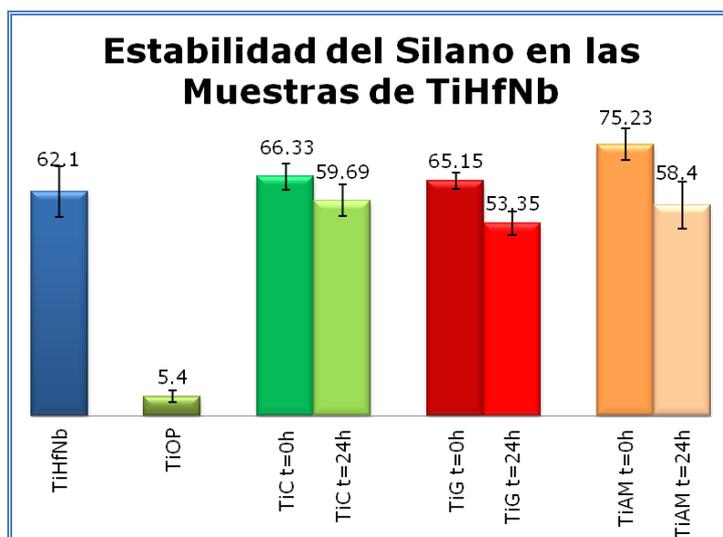


Figura VII 15 Estabilidad de la Mojabilidad de las Muestras de Ti Silanizadas

En la Figura VII 15, se observa, como **pasadas 24h todas las muestras, exhiben una leve disminución de la hidrofiliidad, pero continúan teniendo un ángulo de contacto mucho mayor que la muestra activada con plasma de oxígeno, lo cual demuestra que la modificación superficial efectuada por la silanización ha soportado las condiciones del ensayo.**

Este resultado sugiere la estabilidad del proceso de silanización, pero no aporta información sobre la estabilidad del enlace Si-O-Ti, el cual garantiza la unión covalente entre el organosilano y la superficie metálica, razón por la que se procedió a realizar un estudio de XPS.

Resultados de XPS.

La caracterización química por XPS del ensayo de estabilidad del silano, se muestra en la Tabla VII 11. Analizando estos datos se tiene que luego de 24h todas las muestras contienen Si 2p, sin embargo, como es sabido, este resultado no indica que todo el Si presente se encuentre enlazado covalentemente al metal.

Tabla VII 11 Estabilidad Química, Térmica y Mecánica de las Muestras de Ti Silanizadas

	C1s	N1s	O1s	Si2s	Cl2p	Ti2p	Nb3d	Hf4f
Control	42±2.6	1±0.2	46±3.1	1 ±0.3	0±0.0	7±0.6	2±0.3	1±0.3
CPTES	31±3.0	2±0.1	50±3.4	5 ±0.3	2±0.1	8±0.4	2±0.1	1±0.1
CPTES 24 h	33±2.3	2±0.3	55±3.3	2 ±0.2	2±0.3	4±0.3	1±0.1	0±0.0
GPTES	28±2.1	1±0.1	55±3.2	2 ±0.1	1±0.1	10±0.7	2±0.1	1±0.2
GPTES 24 h	34±2.9	2±0.3	57±3.6	1 ±0.2	1±0.0	3±0.2	1±0.1	0±0.0
APTES CL	55±3.7	10±0.9	23±1.9	12 ±1.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
APTES CL 24 h	43±3.1	5±0.4	44±3.9	7 ±0.6	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0

Para poder profundizar en la estabilidad del enlace Si-O-Metal se realizó un estudio de alta resolución del Si 2p, el cual arrojó una información más precisa sobre la estabilidad del proceso de silanización.

Si el silano se encuentra enlazado covalentemente, el pico Si2 debería poseer una gran aportación, ya que con ello se demuestra que el enlace Si-O-metal es estable.

Tal como puede observarse en los resultados de la Tabla VII 12, en todas las muestras hubo una disminución del pico Si2 (Si-O-Ti) pero lo más llamativo, es que **pasadas las 24 horas las muestras silanizadas con GPTES, han perdido todo el Si2, por tanto, este silano no ha sido efectivo sobre la aleación de Ti.** Adicionalmente si este resultado se correlaciona con la ratio O2/Si2, del apartado anterior, parece ser que el enlace de este silano no se ha realizado, por esta razón en las siguientes fases de estudio, se excluirá el uso del GPTES para esta aleación.

Tabla VII 12 Resolución del Si 2s del Ensayo de Estabilidad en Ti Silanizado

	Si 2s	SiC SiO _x	Si-O-Ti O-Si-O
CPTES	5_{±0.3}	2.1	2.9
CPTES 24 h	2_{±0.2}	0.7	1.3
GPTES	2_{±0.1}	1.3	0.7
GPTES 24 h	1_{±0.2}	1.00	0.0
APTES CL	12_{±1.0}	7.1	4.9
APTES CL 24 h	7_{±0.6}	2.3	4.7

Por otra parte se puede observar que aun cuando el APTES+Ma presenta un alto porcentaje de Si a t=0 gran parte de este se debe a la contaminación proveniente del pulido y/o desbastado, o a SiO_x, el cual no es un resultado deseado en el proceso de silanización, no obstante luego del ensayo de estabilidad, la fracción de Si que se pierde en estas muestras, corresponde justamente al pico S1, por tanto el pico S2 se considera estable y por ende se puede afirmar que se ha efectuado el enlace covalente **Si-O-Ti**.

En resumen se tiene que **las muestra silanizadas con CPTES y con APTES+Ma, luego de un ensayo tan agresivo, siguen demostrando que se ha efectuado el proceso de silanización, porque aun cuando han perdido silicio, el pico de Si2, ha permanecido prácticamente invariable.**

VII.3.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS SUPERFICIES SILANIZADAS, EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

1) Caracterización del proceso de silanización para cada organosilano estudiado.

- La silanización es un proceso que origina una modificación física de la capa superficial de las muestras, en términos de mojabilidad, ya que se presentó un incremento de 5° para la muestra control, a valores superiores a 65° para todas las muestras silanizadas (*Figura VII 11*), lo cual es un indicador que en esta medida no interfiere el que se esté trabajando con silanos diferentes y que el recubrimiento es homogéneo.

- Por medio del ToF SIMS se pudo determinar la efectividad del proceso de silanización, ya que se detectaron fragmentos de los organosilanos (Si^+ , Si-O^+ y O-Si-O^-) y para las muestras silanizadas con CPTES, se observó la presencia del Cl^- que es el grupo funcional de éste órgano silano; estos resultados indican la presencia de los silanos sobre la superficie de las muestras. (*Figura VII 12 y Figura VII 13*).

- Por XPS se detectó la presencia de los órgano silanos sobre las capas silanizadas, a través del Si 2p, resultando para APTES+Ma: 12%, CPTES 5% y GPTES 2% (*Tabla VII 10*), sin embargo una mayor presencia de silano no garantiza una mayor efectividad del proceso de silanización, ya que una cadena polimerizada (en el caso del APTES+Ma) o un organosilano que sufre de ataques nucleófilos, causa una disminución de la efectividad en el momento de la inmovilización de las biomoléculas.

- Para profundizar en el tipo de enlace, se realizó un estudio de alta resolución, donde resultó que el proceso más eficiente fue la silanización de las muestras con APTES+Ma, ya que: 1) Presentó una mayor concentración en porcentaje atómico de Si 2p y 2) La ratio O2/Si2 fue de: TiAM: 3.87, TiC: 5.51 y TiG: 24.29, los valores más cercanos a la unidad los presentan las muestras silanizadas con APTES+Ma, seguida de la silanizada con CPTES (*Tabla VII 10*), lo cual sugiere que estos organosilanos son más eficientes que el GPTES, cuando se está trabajando con la aleación de TiHfNb.

2) Determinación de la estabilidad térmica, química y mecánica de la unión silano-metal.

- Se realizó el ensayo de estabilidad y mediante los análisis de alta resolución, se observaron los enlaces de Si-O-Ti, O-Si-O, y la estabilidad de los mismos para con ello afirmar que para esta aleación los resultados más favorecedores en términos de adhesión y estabilidad de los organosilanos, fueron el CPTES y el APTES+Ma (*Tabla VII 12*).

Por lo expuesto anteriormente se puede concluir que el proceso de silanización produce modificaciones físicas de las superficies, ya que modifica la mojabilidad de las muestra aumentando el ángulo de contacto de las mismas. Al mismo tiempo mediante la caracterización química se deduce que los tres silanos se adhieren sobre las superficies, no obstante

demonstraron ser más estables el APTES+Ma y el CPTES, en términos de cantidad de silicio y estabilidad del mismo.

VII.4 PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.

VII.4.1 OBJETIVOS.

VII.4.1.1 OBJETIVO GENERAL.

Optimizar el proceso de inmovilización de biomoléculas para la aleación de TiNbHf previamente silanizada, en términos de porcentaje de péptido adherido y estabilidad de su enlace con las superficies metálicas.

En este estudio se evaluará la inmovilización de las siguientes secuencias peptídicas: CGGRGDS, CGGFHRIKA y CGGPHSRN. Y de forma paralela, se evaluará el efecto de las mezclas en relación 1:1 de CGGRGDS+CGGFHRIKA y de CGGRGDS+CGGPHSRN.

VII.4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Detección de las secuencias peptídicas.

Como se ha mencionado en el capítulo V, a la hora de caracterizar secuencias peptídicas sobre la superficie de un material, existe una diversidad de técnicas de caracterización, tales como: radiomarcado, espectroscopia de infrarrojos (ATIR-IR) o espectroscopia de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo (ToF SIMS).⁵¹ No obstante para esta tesis se ha decidido explorar las posibilidades de la técnica de XPS para la caracterización de la capa de biomoléculas sobre las superficies silanizadas y de esta manera continuar con el hilo conductor de los capítulos anteriores, en función de la caracterización y optimización de superficies con XPS.

Por tanto, para determinar las secuencias peptídicas utilizadas, se planteó:

- Detectar mediante XPS el azufre presente en la cisteína; ya que este aminoácido se encuentra en todas las secuencias estudiadas y la aparición de este elemento determinará la efectividad del proceso de inmovilización de la biomolécula.
- Identificar mediante estudios de alta resolución, los enlaces típicos de las secuencias peptídicas (grupos carboxilos, amida, guanidina y dipéptidos), así como también el enlace S-C, debido al enlace de la cisteína con los organosilanos.

Caracterización físico-química del proceso de inmovilización de las secuencias peptídicas en superficies.

Los procesos de inmovilización introducirán modificaciones físicas en las superficies silanizadas y modificaran su composición química. A priori, aquellas superficies que presenten mayor variabilidad en la mojabilidad y mayor porcentaje de azufre, han de contener mayor cantidad de péptido sobre la superficie, por tanto inducirán a una mejor respuesta celular.

VII.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.4.2.1 MATERIALES.

En función de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se utilizarán el CPTES y el APTES+Ma. La nomenclatura usada para identificar cada una de las opciones fue: Ti: aleación de Ti, luego de la identificación del metal se colocó la inicial de cada silano (C:CPTES, AM: APTES+Maleimido) y por último la inicial de cada motivo reactivo (R:CGGRGDS, F:CGGFHRRIKA, P:CGGPHSRN, RF:CGGRGDS+CGGFHRRIKA y RP:CGGRGDS+CGGPHSRN)

El diseño de las secuencias peptídicas utilizadas, fue descrito en el capítulo IV. Y las muestras a caracterizar son las presentadas en Tabla VII 13.

Tabla VII 13 Muestras utilizadas en la Aleación de Ti

SILANO	CGGRGDS	CGGFHRRIKA	CGGPHSRN	CGGRGDS + CGGFHRRIKA	CGGRGDS + CGGPHSRN
CPTES	TiCR	TiCF	TiCP	TiCRF	TiCRP
APTES+Ma	TiAMR	TiAMF	TiAMP	TiAMRF	TiAMRP

VII.4.2.2 MÉTODOS.

VII.4.2.2.1.PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

El proceso de inmovilización de las biomoléculas se ha explicado en el capítulo V, ítem V.2.2.1.

VII.4.2.2.2.CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

Como técnica de caracterización física del proceso se utilizó el ángulo de contacto y la caracterización química de la superficie se evaluó mediante el XPS.

VII.4.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

VII.4.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.

Antes de la inmovilización de las biomoléculas la aleación de Ti se activó con plasma de oxígeno y sobre ella se emplearon como silanos el CPTES y el APTES+Ma, por tanto la adhesión de las secuencias peptídicas se realizará a pH 11 o a pH 7 respectivamente.

Como se demostró en el capítulo IV, la mojabilidad de las muestras silanizadas presenta resultados similares en ambas aleaciones, debido a que la gota de agua entra en contacto con la capa nanométrica que recubre el metal y no directamente

con los óxidos y/o con el bulk. Por ello en este capítulo se extrapolan los resultados de mojabilidad de la aleación de CoCr.

Resultados de XPS.

Para la caracterización química se analizaron cada una de las secuencias peptídicas adheridas sobre los diferentes silanos y los resultados en porcentajes atómicos son mostrados en la Tabla VII 14 para las muestras silanizadas con CPTES y en la Tabla VII 15 las que han sido silanizadas con APTES+Ma.

Ya que todas las secuencias peptídicas utilizadas poseen al menos una cisteína, la cual en su cadena lateral tiene un tiol (-SH), entonces según los resultados se puede identificar la presencia de los péptidos en superficie, por la aparición del S 2p. Este pico aparece en cantidades muy pequeñas, por tanto, al igual como se hizo con las muestras de CoG, se infiere que con la aparición de este pico, se evidencia la presencia del péptido en superficie.

En cuanto al carbono presente sobre las superficies, se observan en el caso de las muestras de TiC, diferencias significativas en las superficies a las que se le han añadido las mezclas, posiblemente por la presencia de dipéptidos y carboxilos.

Tabla VII 14 Composición Química por XPS de las Muestras de TiC con Péptidos Adheridos en Superficie

Picos	TiC	TiCR	TiCF	TiCP	TiCRF	TiCRP
C 1s	31±3.0	29±2.1	32±2.6	28±2.6	52±3.9	44±4.0
Cl 2p	2±0.1	3±0.2	5±0.4	4±0.3	1±0.0	1±0.2
N 1s	1±0.1	1±0.0	4±0.3	2±0.3	13±0.9	6±0.5
O 1s	50±3.2	56±3.7	52±3.9	54±4.1	26±2.1	40±3.3
S 2p	0±0.0	1±0.0	1±0.1	1±0.3	2±0.3	1±0.2
Si 2p	5±0.3	9±0.6	6±0.4	7±0.6	4±0.2	6±0.5
Ti 2p	8±0.4	4±0.3	0±0.0	4±0.3	2±0.3	0±0.0
Hf 4f	1±0.1	1±0.2	1±0.1	1±0.2	1±0.1	1±0.1
Nb 3d	2±0.1	1±0.1	1±0.0	1±0.1	1±0.2	1±0.1

Tabla VII 15 Composición Química por XPS de las Muestras de TiAM con Péptidos Adheridos en Superficie

Picos	TiAM	TiAMR	TiAMF	TiAMP	TiAMRF	TiAMRP
C1s	55±3.7	43±4.1	41±3.6	42±3.9	39±2.8	42±3.8
N1s	10±0.9	6±0.5	6±0.4	7±0.5	6±0.7	7±0.7
O1s	23±1.9	36±3.2	38±2.9	36±3.3	39±2.7	36±3.1
S2p	0±0.0	1±0.1	1±0.1	1±0.2	1±0.0	1±0.2
Si2p	12±1.0	10±0.8	8±0.6	8±0.7	10±0.4	8±0.7
Ti2p	0±0.0	1±0.2	2±0.1	2±0.1	3±0.1	2±0.2
Nb3d	0±0.0	1±0.1	1±0.0	1±0.2	1±0.1	1±0.2
Hf4f	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0

Adicionalmente las muestras de TiC a las que se les colocó FHRIKA, solo o en mezcla, exhiben un considerable incremento del N 1s, ya que tal como se puede observar en el capítulo V, Figura V 2, esta secuencia posee mayor porcentaje atómico de nitrógeno. De igual manera un incremento del N 1s en las muestras de TiCRP, es justificable, ya que al ser una mezcla, se tiene mayor cantidad de aminoácidos y por ende, mayor cantidad de grupos amidas, propios de los

dipéptidos. También se observa que la cantidad de elementos metálicos en la superficie luego de la adición del péptido disminuye, ya que se encuentran recubiertos por las secuencias peptídicas.

Como conclusiones generales del barrido general se tiene que **la presencia del péptido puede ser determinada por la aparición del pico de S 2p sobre todas las superficies estudiadas.**

No obstante, es necesario hacer un estudio más detallado, con el objeto de profundizar en los enlaces propios de las biomoléculas y de las mismas con los silanos.

En función de los enlaces mostrados en el capítulo V, Figura V.8 se definió realizar un análisis de alta resolución del C 1s, O 1s y N 1s.

La deconvolución del carbono y del oxígeno ha sido mostrada en el capítulo III, (Figura III.6 y Figura III.8 respectivamente) y la del nitrógeno en el capítulo IV, (Figura IV 11). Los resultados de este estudio se presentan en porcentaje atómico en las Tabla VII 16 y , por medio de la alta resolución se pueden identificar los carboxilos en los picos **C4** y **O2**, el enlace peptídico en los picos **C4** y **O2**, el grupo guanidina mediante los picos **C4** y **N2** y la presencia del grupo amida, a través del pico **N2**.^{29,30,46,48,52-54}

Como se ha mencionado en el capítulo V, el resultado obtenido de este estudio de alta resolución sugerirá la presencia o la ausencia de las secuencias peptídicas sobre las superficies silanizadas. Sin embargo ha de tenerse en cuenta que varias especies de las estudiadas, coinciden en los niveles de energía de enlace reportados para el XPS, por tanto no se podrá realizar un estudio totalmente independiente entre ellas.

Tabla VII 16 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras TiC con Péptidos

		TiC	TiCR	TiCF	TiCP	TiCRF	TiCRP	B.E.(eV)	
C 1s		31±3.0	29±2.1	32±2.6	28±2.6	52±3.9	44±4.0		
C1	C=C, C-H	22	19	18	16	35	27	284.4	±0.4
C2	C=O, C-OH,	7	6	8	8	10	9	286.5	±.01
C3	CH2-O, C-S	2	2	4	2	2	4	287.8	±0.3
C4	Dipéptido COOH Guanidina	0	2	2	2	5	4	288.9	±0.2
N 1s		1±0.1	1±0.0	4±0.3	2±0.3	13±0.9	6±0.5		
N1	TiN, C-N	0.4	0.3	0.5	0.2	2	1	398.3	±0.5
N2	N-H Grupo Amida Guanidina	0.6	0.7	3.5	1.8	11	5	401.1	±0.5
O 1s		50±3.2	56±3.7	52±3.9	54±4.1	26±2.1	40±3.3		
O1	O ² , TiO ₂	27	23	19	19	8	22	529.9	±0.3
O2	OH,Ti-O-Si, COOH Dipéptido	16	20	14	14	17	16	531.6	±0.3
O3	-C=O, SO ₄	7	13	19	21	1	1	532.6	±0.3

Tabla VII 17 Alta Resolución del C 1s, N 1s y O 1s de las muestras TiC con Péptidos

Picos		TiAM	TiAMR	TiAMF	TiAMP	TiAMRF	TiAMRP	B.E.(eV)
C1s		55±3.7	43±4.1	41±3.6	42±3.9	39±2.8	42±3.8	
C1	C=C, C-H	46	33	32	31	31	30	284.7 ±0.1
C2	C=O, C-OH,	7	8	7	9	6	8	286.4 ±0.3
C3	CH2-O, C-S C=O Grupo Imida	2	2	2	2	1	3	287.9 ±0.3
C4	Dipéptido COOH Guanidina	0	1	2	1	1	1	288.9 ±0.2
N1s		10±0.9	6±0.5	6±0.4	7±0.5	6±0.7	7±0.7	
N1	TiN, C-N	2	4	4	5	2	3	399.5 ±0.2
N2	N-H Grupo Amida Guanidina	8	2	2	2	4	4	401.1 ±0.2
O1s		23±1.9	36±3.2	38±2.9	36±3.3	39±2.7	36±3.1	
O1	O ² , TiO ₂	2	10	12	12	12	13	530.3 ±0.2
O2	OH, Ti-O-Si, COOH Dipéptido	19	25	25	24	26	24	531.9 ±0.3
O3	-C=O, SO ₄	2	1	1	1	1	1	532.9 ±0.3

Grupos Carboxilos.

Como se ha descrito en el párrafo anterior, los grupos carboxilos de la cadena terminal de las secuencias peptídicas pueden ser identificados ya sea por el pico C4, o por el pico O2.

Para el caso de las muestras silanizadas con GPTES, el pico C4 aparece en todas las muestras, lo cual comprueba la presencia del péptido en sus superficies. En cuanto a las muestras silanizadas con APTES+Ma, la presencia de carboxilos es detectada en todas las muestras mediante el incremento del pico O2

Enlace Peptídico.

La identificación del enlace peptídico o dipéptido, se confirma por el incremento de los picos C4 y O2 en las muestras en las que se han inmovilizado biomoléculas; por tanto según los resultados obtenidos, se tiene que **por medio del pico C4, se confirma la presencia de este enlace en todas las muestras de TiC de igual manera mediante el pico O2, se comprueba la existencia del dipéptido en todas las muestras silanizadas con APTES+Ma.**

Grupo Guanidina.

La guanidina puede ser detectada mediante el pico N2 y el carbono con el mayor valor de energía de enlace (C4). **El incremento del pico C4 es notorio en todas las muestras, al mismo tiempo que se aprecia un aumento del pico N2 en**

todas las muestras silanizadas con CPTES (excepto TiCR), lo cual confirma la presencia del péptido en sus superficie.

Grupo Amida.

La presencia del grupo amida es evidenciada, solo en las muestras silanizadas con CPTES (excepto TiCR), mediante el aumento en el porcentaje atómico del pico N2.

De la información obtenida mediante ***los estudios de alta resolución, se puede concluir que las secuencias peptídicas se encuentran adheridas a las superficies; ya que además de la presencia del S 2p, se exhiben diferencias significativas en los picos correspondientes a los grupos carboxilos, grupos amidas, guanidina y a los enlaces peptídicos.***

VII.4.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE LAS BIOMOLECULAS EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

En función de los objetivos específicos de este apartado se tiene que:

1) Detección de las secuencias peptídicas.

- La espectroscopia de fotoelectrones de rayos X permitió detectar la presencia de las secuencias peptídicas sobre la superficie a través de la identificación del azufre proveniente de la cisteína. Sin embargo, por XPS no fue posible sacar conclusiones sobre el enlace covalente entre los péptidos y los silanos, por tanto se podría concluir que se ha llegado al límite máximo de detección de la técnica

2) Caracterización química del proceso de inmovilización de las secuencias peptídicas en superficies.

- Se comprobó la presencia de las secuencias peptídicas en superficie por la detección del S 2p mediante el barrido general de XPS, sin mostrar diferencias significativas ni entre los diferentes tipos de secuencias peptídicas, ni entre los silanos empleados (CPTES y APTES+Ma) (*Tabla VII 14* y *Tabla VII 15*).

- A través del estudio de alta resolución de los picos de C 1s, N 1s y O 1s, se puede afirmar la presencia de péptidos en superficie debido a:

- Que las muestras con secuencias peptídicas que fueron previamente silanizadas con GPTES presentan la aparición del pico C4, el cual surge a causa de la introducción dipéptidos y del grupo guanidina de la arginina (*Tabla VII 16*).

- Las muestras con APTES+Ma, en las cuales se inmovilizaron las diferentes secuencias de péptidos, presentaron un incremento en el pico O2 debido a la presencia de los enlaces peptídicos y los carboxilos propios de cada aminoácido (*Tabla VII 17*).

Como conclusión de este capítulo se tiene que para evaluación de la inmovilización de las siguientes secuencias peptídicas: CGGRGDS, CGGFHRIKA y CGGPHSRN y de las mezclas en relación 1:1 de CGGRGDS+CGGFHRIKA y de CGGRGDS+CGGPHSRN, la técnica de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), ha llegado al límite de detección, por tanto solo se puede afirmar la presencia de las biomoléculas en las superficies, mas no el enlace covalente de las mismas con los organosilanos.

De los resultados obtenidos se extrae que las secuencias peptídicas se encuentran enlazadas a las superficies de TiAM y de TiC mediante la presencia del azufre sobre la superficie y al incremento de los picos C4 en todas las muestras, el cual es adjudicado a los carboxilos, grupo guanidina y a los enlaces peptídicos. No obstante, no se producen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras silanizadas con APTES+Ma y las tratadas con CPTES, aun cuando se ha comprobado que las muestras con APTES+Ma tienen mayor porcentaje atómico de silicio en superficie.

VII.5 RESPUESTA CELULAR IN VITRO.

VII.5.1 OBJETIVOS.

VII.5.1.1 OBJETIVO GENERAL.

Validar la optimización de las superficies de TiHfNb biofuncionalizadas con secuencias peptídicas cortas, mediante la respuesta celular in Vitro, en términos de cantidad de células adheridas, morfología y proliferación.

En este estudio se evaluará la influencia de la inmovilización de secuencias peptídicas (CGGRGDS, CGGFHRRIKA, CGGPHSRN, CGGRGDS+ CGGFHRRIKA, CGGRGDS+ CGGPHSRN) en la respuesta celular obtenida con células mesenquimales de ratas. Realizando para cada biomolécula, un estudio comparativo entre las muestras previamente silanizadas con CPTES o con APTES+Ma.

VII.5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Evaluar la influencia de las secuencias peptídicas cortas, sobre la morfología y la cantidad de células adheridas en superficie, para seleccionar los péptidos mas favorecedores para la respuesta celular in Vitro.

Se analizarán la cantidad de células adheridas y su morfología; ya que estos parámetros son indicativos de su adaptación con el entorno, debido a que una célula bien extendida representa que la misma se ha adaptado bien al material.

Caracterizar el proceso de proliferación celular.

Se analizará la capacidad de proliferación de las células adheridas y se determinará si las secuencias seleccionadas, además de promover la adhesión, inducen la proliferación.

VII.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.5.2.1 MATERIALES.

VII.5.2.1.1 SUPERFICIES ESTUDIADAS.

Se estudiaron dos grupos de superficies mostrados en la Tabla VII 18.

Tabla VII 18 Muestras Utilizadas en los Distintos Estudios Celulares.

Material	Proteína	Adhesión	Proliferación
TiAM	RGD	√	√
	FHRRIKA	√	∅
	PHSRN	√	∅
	RGD+FHRRIKA	√	√
	RGD+PHSRN	√	√
TiC	RGD	√	∅
	FHRRIKA	√	∅
	PHSRN	√	∅
	RGD+FHRRIKA	√	∅
	RGD+PHSRN	√	∅

√: incluido,

∅: excluido en función de los resultados de adhesión.

En cada experimento se incluyeron muestras de control, que variaron en función del ensayo, por lo que se detallarán en cada apartado

VII.5.2.2 MÉTODOS.

Los procesos de sembrado celular, adhesión y proliferación se encuentran descritos en el capítulo VI, ítem VI.2.2.2

VII.5.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.

VII.5.3.1 EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN CELULAR.

Para cada uno de los ensayos de adhesión de esta aleación se colocaron 6×10^3 células por pocillo de 0.95 cm^2 , con lo cual se tiene una concentración de 6.32×10^3 cel/ cm^2 en cada una de las muestras de la *Tabla VII 18* y en las muestras de control.

Como se ha comentado anteriormente, el número de células adheridas a la superficie del implante y la morfología celular son indicadores que definen el éxito del proceso de adaptación de las células con el entorno.

Resultados de Inmunofluorescencia (DAPI).

Para la cuantificación del proceso de adhesión celular se realizó un estudio mediante la tinción de los núcleos celulares con DAPI y los resultados son mostrados en la *Figura VII 16*.

Estos resultados reflejan que en la muestras silanizadas con CPTES, la variación de secuencias peptídicas, no produjo diferencias

estadísticamente significativas. Sin embargo en las muestras previamente silanizadas con APTES+Ma, los mejores resultados se consiguen en las muestras que contienen RGD, tanto solo, como en mezclas.⁵⁵⁻⁶²

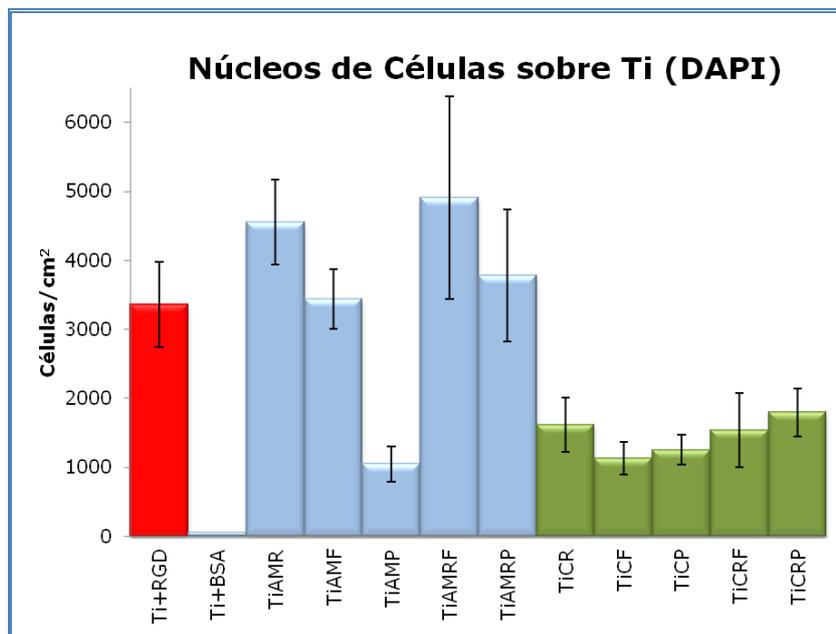


Figura VII 16 Cuantificación de Células Adheridas sobre Ti mediante Tinción de los Núcleos con DAPI

También es evidente que se adhirió un mayor número de células en las muestras con APTES+Ma. Esto puede ser justificado por la presencia de mayor cantidad de grupos $-NH_2$, $-COOH$ que según estudios previos, provocan una mayor adhesión celular.²⁰

El hecho de que la muestra control presente una adhesión celular similar a la de las muestras biofuncionalizadas puede ser justificado en función de que esta aleación contiene mayoritariamente TiO_2 en la superficie y bibliográficamente ha sido reportado que este tipo de óxido favorece el proceso de adhesión celular,³ sin embargo al momento de realizar la evaluación de la respuesta de adhesión celular se debe establecer un compromiso entre la cantidad de células adheridas y su morfología; razón por la cual se procedió a usar una técnica de imágenes que permita visualizar la forma de las células y estimar su área.

Resultados SEM.

Con el objeto de evaluar la morfología de las células se decidió hacer un estudio por medio del SEM, cuyas imágenes se muestran en las *Figura VII 17* y *Figura VII 18*. Al observar las imágenes, queda comprobado que la adición de secuencias peptídicas influye en la morfología de las células, ya que es evidente que en la muestra control las células presentan una menor extensión o una menor área, así mismo se puede afirmar que la secuencia RGD las hace sentir más cómodas, por tanto en las superficies que poseen dicho péptido se observan células con mayor área y exhiben la presencia de filopodios.

De las imágenes también se puede deducir que las células se encuentran más a gusto en las muestras que antes de la inmovilización de biomoléculas fueron silanizadas con APTES+Ma.

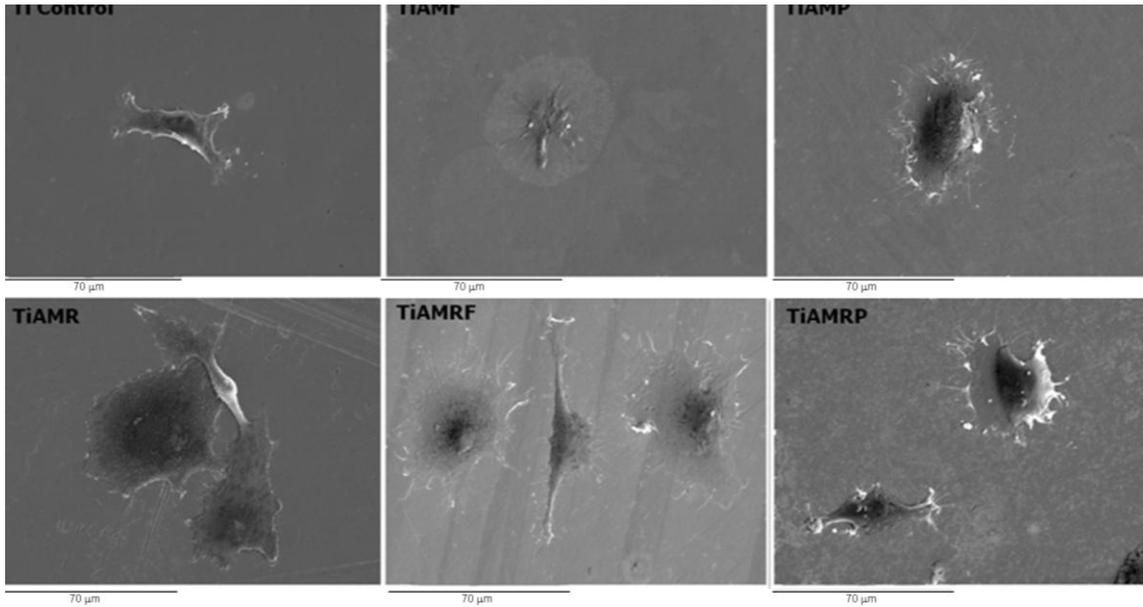


Figura VII 17 SEM de las células Adheridas sobre TiAM

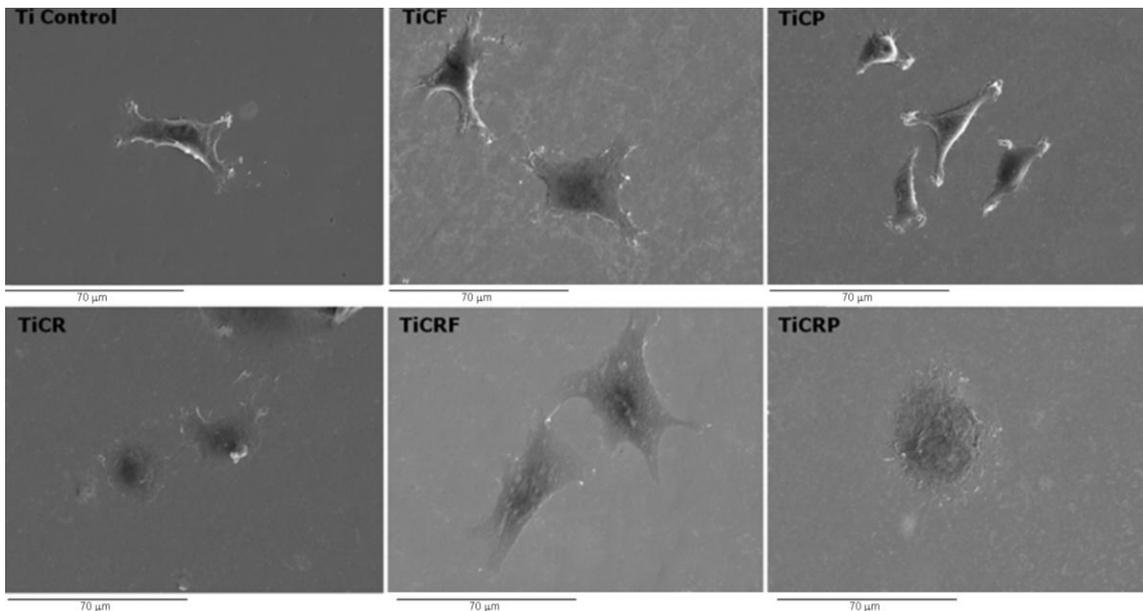


Figura VII 18 SEM de las células Adheridas sobre TiC

La cuantificación del área celular de este ensayo se muestra en la *Figura VII 19*, en la cual se evidencia que para las muestras silanizadas con CPTES, solo las que contienen RGD+FHRRIKA, presentan diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de las muestras de TiAM se tienen células con mayor área, en las cuales los mejores resultados los arrojan las superficies con RGD y las mezclas, aun cuando la desviación estándar presenta un rango tan amplio que no genera diferencias estadísticamente significativas entre ellas con respecto a TiCF, TiCP y TiCR.

En función de los resultados obtenidos, se puede resumir que en cuanto a la densidad de células adheridas, las que generan mejor resultados son las muestras silanizadas con APTES+Ma.

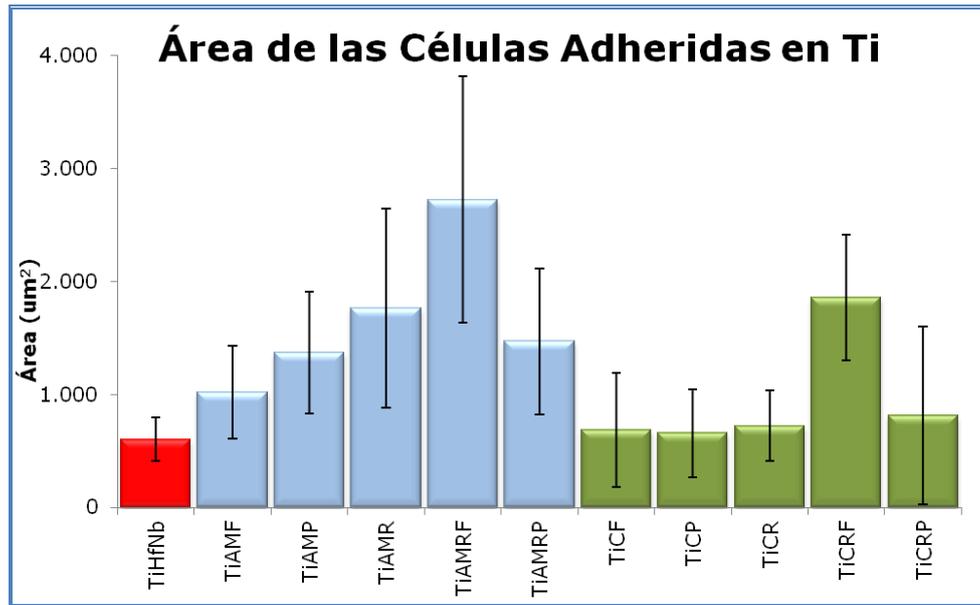


Figura VII 19 Área de las Células Adheridas sobre la aleación de Ti

Correlacionando la morfología y el área celular se tiene que aun cuando sobre la aleación sin ningún tratamiento previo, se adhiere gran cantidad de células, las mismas se presentan contraídas, por tanto no se encuentran a gusto en esta superficie.

Igualmente las muestras que arrojan mejores resultados son las que han sido las silanizadas con APTES+Ma, siendo favorecedores los resultados para las muestras que contienen RGD+FHRRIKA, ya que son las que presentan mayor extensión y presencia marcada de filopodios.

Con respecto a las muestra silanizadas con CPTES, aun cuando en la las imágenes del SEM, muestran que están más extendidas en comparación con las células adheridas sobre la TiHfNb sin tratamiento, la cuantificación del área no exhibe diferencias estadísticamente significativas, exceptuando el caso de la biofuncionalizada con TiCRF.

Por tanto a partir de este momento se estudiará el proceso de proliferación de las muestras silanizadas con APTES+Ma y que poseen como secuencias peptídicas el RGD y sus mezclas.

VII.5.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PROLIFERACIÓN.

La cuantificación de la cantidad de células para cada uno de los tiempos de medición se realizó a través de la cuantificación de LDH. Los resultados de los análisis de proliferación se presentan en la *Figura VII 20*. Al evaluar la proliferación se observa que para la muestra de TiHfNb no se producen diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la muestra con BSA, aunque en la fase inicial presenta la menor cantidad de células adheridas, con el paso del tiempo, las pocas células debieron haber generado su propia matriz extracelular, lo cual les permitió comenzar un lento proceso de proliferación donde a tiempos 7d y 14d tienen diferencias significativas con respecto a los tiempos 0h, 1d y 3d, sin embargo no superan la densidad celular que sirvió de punto de partida para el resto de los casos.

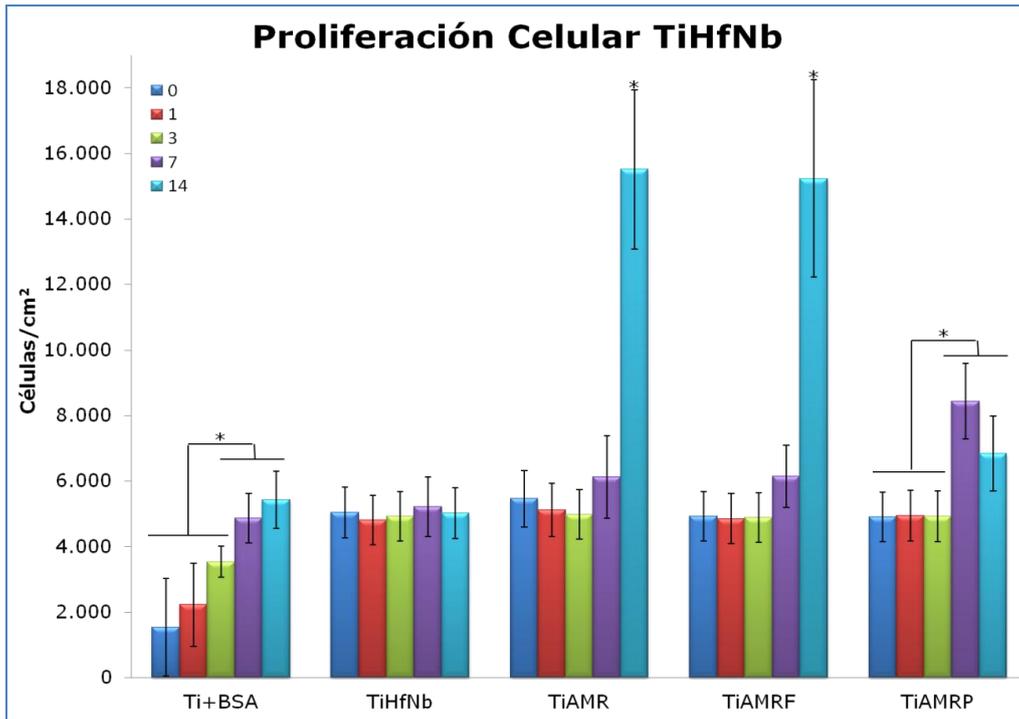


Figura VII 20 Proliferación Celular en las Muestras de CoAM por LDH

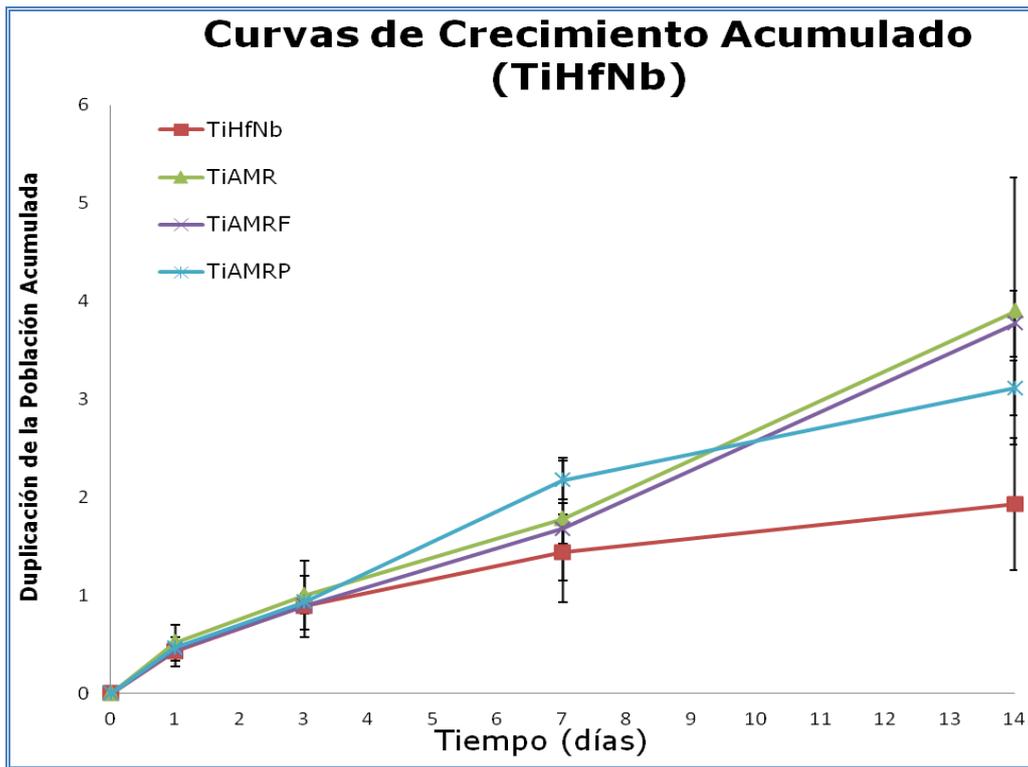


Figura VII 21 Velocidad de Proliferación Celular en las Muestras de TiAM

Con respecto a las muestras con biomoléculas adheridas se tiene que tanto en las superficies con RGD como con RGD+FHRRIKA se presenta una evidente proliferación para el día 14, sin embargo antes de este rango de tiempo no se muestran diferencias estadísticamente significativas.

Las muestras con RGD+PHSRN, comienzan un proceso de proliferación a los 7 días, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los días 7 y 14.

Con respecto a la velocidad con la cual se efectúa la proliferación se tiene la *Figura VII 21*, donde se puede apreciar que:

- 1) En todo momento las curvas poseen pendientes positivas, resultando entre 0h y el día uno un aumento muy leve de la concentración celular.
- 2) Durante el día 1 y el día 3; sigue la proliferación, pero aún ninguna de las muestras logra la duplicación poblacional.
- 3) A partir del tercer día en las muestras TiHfNb la proliferación se ralentiza, exhibiendo una curva con menor pendiente, trayendo como consecuencia que llegado el día 14 aún no han conseguido la duplicación poblacional.
- 4) Entre los días 3 y 7 logran duplicarse las células sembradas en las muestras con RGD+PHSRN, no obstante, entre el tiempo de 7d y 14 d, también ocurre un proceso de proliferación más lento, que pudiera deberse a que se satura el cultivo por estar las células en confluencia.²⁰
- 5) Las muestras con RGD y RGD+FHRRIKA muestran un comportamiento totalmente inverso a las demás, ya que aun cuando consiguen la duplicación celular después del séptimo día, en el período de los días 7 y 14, su pendiente se incrementa, con lo cual hasta el día 14 presentan un proceso de proliferación celular.

En resumen, de la *Figura VII 21 se puede concluir que las secuencias utilizadas sobre la aleación de titanio tienen un excelente efecto en la adhesión celular, sin embargo para inducir la proliferación los mejores resultados se consiguen con las secuencias de RGD y RGD+FHRRIKA, pero se produce de una manera mucho más lenta y con menor potencial de duplicación que el observado con la aleación de CoCr.*

VII.5.4 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN DE SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS CON SECUENCIAS PEPTÍDICAS CORTAS, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO.

Tomando en consideración los objetivos planteados para la evaluación de la respuesta celular se concluye:

1) Evaluar la influencia de las secuencias peptídicas cortas sobre la morfología y la cantidad de células adheridas en superficie para seleccionar los péptido mas favorecedores para la respuesta celular in Vitro.

- Se analizaron la cantidad de células adheridas y su morfología; ya que estos parámetros son indicativos de su adaptación con el entorno, debido a que una célula bien extendida representa que la misma se ha adaptado bien al material. En función de los resultados obtenidos se puede resumir que:
 - En términos de la densidad de células adheridas, las que generan un mejor resultados son las muestras que previamente fueron silanizadas con APTES+Ma (*Figura VII 16*).
 - Con respecto a la morfología, se tiene que las superficies que contienen RGD, solo o en mezclas, son en las que se visualizan las células más extendidas y mostrando la presencia de filopodios (*Figura VII 17* y *Figura VII 18*).
 - En términos de área, nuevamente son las muestras silanizadas con APTES+MA, las que poseen una mayor área, aún cuando la cuantificación del área no exhibe diferencias significativas entre las diferentes secuencias peptídicas (*Figura VII 5*).

2) Caracterizar el proceso de proliferación celular.

- Se puede concluir que las secuencias utilizadas sobre la aleación de titanio tienen un excelente efecto en la adhesión celular, sin embargo, para inducir la proliferación los mejores resultados se consiguen con las secuencias de RGD y RGD+FHRRIKA, pero se produce de una manera mucho más lenta y con menor potencial de duplicación que el observado con la aleación de CoCr.

Por tanto como conclusión de esta sección, se puede afirmar que la selección del mejor proceso de activación (en términos de limpieza y grupos hidroxilos en superficie (capítulo III)) y de los organosilanos más eficientes (en función de porcentaje y estabilidad del Si (capítulo IV)), da lugar a superficies con mejor respuesta celular.

VII.6 BIBLIOGRAFÍA.

1. Rho, J. Y., Tsui, T. Y. & Pharr, G. M. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* **18**, 1325-30 (1997).
2. Sargeant, T. D., Rao, M. S., Koh, C.-Y. & Stupp, S. I. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **29**, 1085-1098 (2008).
3. Pegueroles Neyra, M. Interactions Between Titanium Surfaces and Biological Components. 263 (2009).
4. Mjöberg, B. The Theory of Early Loosening of Hip Prostheses. *Orthopedics* **20**, 1169-1175 (1997).
5. González, M., Peña, J., Manero, J. M., Arciniegas, M. & Gil, F. J. Design and Characterization of New Ti-Nb-Hf Alloys. *Journal of Materials Engineering and Performance* **18**, 490-495 (2009).
6. Sundfeldt, M., Carlsson, L. V., Johansson, C. B., Thomsen, P. & Gretzer, C. Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta orthopaedica* **77**, 177-97 (2006).
7. González, M., Peña, J., Manero, J. M., Arciniegas, M. & Gil, F. J. Optimization of the Ti-16.2Hf-24.8Nb-1Zr Alloy by Cold Working. *Journal of Materials Engineering and Performance* **18**, 506-510 (2009).
8. Zorn, G., Gotman, I., Gutmanas, E. Y., Adadi, R. & Sukenik, C. N. Surface modification of Ti45Nb alloy by immobilization of RGD peptide via self assembled monolayer. *Journal of materials science. Materials in medicine* **18**, 1309-15 (2007).
9. Sevilla, P. & Aparicio, C. Biomecánica, materiales, diseño, procesos y tipos de prótesis en la artroplastia de rodilla. (2002).
10. Rodrigo Sánchez, A. M. Estudio de la Biocompatibilidad del Polietileno, de la Aleación MA 956 y de la Alumina: Respuesta de Osteoblastos y Macrófagos frente a las Partículas. (2001).
11. Godoy, M. Biofuncionalización de Superficies de Titanio para la Mejora del Proceso de Osteointegración. (2009).
12. Sevilla, P., Godoy, M., Salvagni, E., Rodríguez, D. & Gil, F. J. Biofunctionalization of titanium surfaces for osseointegration process improvement. *Journal of Physics: Conference Series* 252 012009 **252**, 6 (2010).
13. Martin, H. J., Schulz, K. H., Bumgardner, J. D. & Walters, K. B. XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **23**, 6645-51 (2007).
14. Chu, P., Chen, J. & Wang, L. Plasma-surface Modification of Biomaterials. *Materials Science and Engineering R* **36**, 143-206 (2002).
15. Lobo, A. O. *et al.* Fast Functionalization of Vertically Aligned Multiwalled Carbon Nanotubes Using Oxygen Plasma. *Materials Letters* **70**, 89-93 (2012).
16. Cvelbar, U. *et al.* Oxygen Plasma Functionalization of Poly(p-phenylene sulphide). *Applied Surface Science* **253**, 8669-8673 (2007).

17. Huang, N. *et al.* Plasma Surface Modification of Biomaterials Applied for Cardiovascular Devices. *The 30th International Conference on Plasma Science, 2003. ICOPS 2003. IEEE Conference Record - Abstracts.* **36**, 439 (2002).
18. Junkar, I., Vesel, A., Cvelbar, U., Mozetič, M. & Strnad, S. Influence of Oxygen and Nitrogen Plasma Treatment on Polyethylene Terephthalate (PET) Polymers. *Vacuum* **84**, 83-85 (2009).
19. Thomas C, I., Fischione, P. E., O'Keefe, C., Guruz, M. U. & Dravid, V. P. Plasma Cleaning and Its Applications for Electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* **5**, 26-135 (1999).
20. Gonzalez Colominas, M. Optimización de aleaciones B-Ti con Bajo Módulo Elástico, para Aplicaciones Biomédicas. (2011).
21. Wennerberg, A. & Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research* **20 Suppl 4**, 172-84 (2009).
22. Cohen, D. K. Glossary of Surface Texture Parameters. 39
23. López Requejo, S. Propiedades Superficiales del Ti c.p., Esterilizado y Rugoso para Aplicaciones Biomédicas. 5-68 (2005).at <<http://hdl.handle.net/2099.1/5210>>
24. Pegueroles, M. & Aparicio, C. Influencia del Proceso de Esterilización en la Mojabilidad del Titanio Modificado Superficialmente. *Materials Research* **12**, 80-87 (2005).
25. Méndez-Vilas, A., Donoso, M. G., González-Carrasco, J. L. & González-Martín, M. L. Looking at the micro-topography of polished and blasted Ti-based biomaterials using atomic force microscopy and contact angle goniometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **52**, 157-66 (2006).
26. Sakamoto, H. *et al.* Effect of active hydroxyl groups on the interfacial bond strength of titanium with segmented polyurethane through gamma-mercaptopropyl trimethoxysilane. *Dental materials journal* **27**, 81-92 (2008).
27. Tanaka, Y. *et al.* Active Hydroxyl Groups on Surface Oxide Film of Titanium, 316L Stainless Steel, and Cobalt-Chromium-Molybdenum Alloy and Its Effect on the Immobilization of Poly(Ethylene Glycol). *Materials Transactions* **49**, 805-811 (2008).
28. Landoulsi, J. *et al.* Silanization with APTES for Controlling the Interactions Between Stainless Steel and Biocomponents: Reality vs Expectation. *Biomaterials - Physics and Chemistry*, **5**, 99-126 (2011).
29. Xiao, S.-jun, Textor, M., Spencer, N. D., Sigrist, H. & Neucha, C.- Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Peptides* **7463**, 5507-5516 (2007).
30. Tlili, C. *et al.* A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. *Materials Science and Engineering: C* **28**, 861-868 (2008).
31. Iucci, G., Battocchio, C., Dettin, M., Ghezzi, F. & Polzonetti, G. An XPS Study on the Covalent Immobilization of Adhesion Peptides on a Glass Surface. *Solid State Sciences* **12**, 1861-1865 (2010).

32. Hanawa, T., Hiromoto, S. & Asami, K. Characterization of the Surface Oxide Film of a Co-Cr-Mo Alloy After Being Located in Quasi-biological Environments Using XPS. *Applied Surface Science* **183**, 68-75 (2001).
33. Kocijan, A., Milosev, I. & Pihlar, B. Cobalt-based Alloys for Orthopaedic Applications Studied by Electrochemical and XPS Analysis. *Journal of materials science. Materials in medicine* **15**, 643-50 (2004).
34. Briggs, D. *et al.* *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. Surface and Interface Analysis* **3**, (Perkin-Elmer Corp., Physical Electronics Division, Eden Prairie: Minnesota, 1979).
35. Mani, G., Feldman, M. D., Oh, S. & Agrawal, C. M. Surface Modification of Cobalt-Chromium-Tungsten-Nickel Alloy Using Octadecyltrichlorosilanes. *Applied Surface Science* **255**, 5961-5970 (2009).
36. Rossi, A., Elsener, B., Hähner, G., Textor, M. & Spencer, N. D. XPS, AES and ToF-SIMS investigation of surface films and the role of inclusions on pitting corrosion in austenitic stainless steels. *Surface and Interface Analysis* **29**, 460-467 (2000).
37. Aubriet, F., Poleunis, C. & Bertrand, P. Capabilities of static TOF-SIMS in the Differentiation of First-row Transition Metal Oxides. *Journal of mass spectrometry: JMS* **36**, 641-51 (2001).
38. Taylor, G. J. Supernova Confetti in Meteorites. Planetary. *Science Research Discoveries* (2010).at <<http://www.psrdr.hawaii.edu/Nov10/supernova-nanoparticles.html> (25/06/2012).>
39. Agency., B. N. E. S. . I. A. E. Water chemistry of nuclear reactor systems. *The conference organized by the British Nuclear Energy Society and held in Bournemouth* 568 (2000).
40. Yamada, H. *et al.* Analysis By Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy or Nuclear Products In Hydrogen Penetration Through Palladium. *Tenth International Conference on Cold Fusion* (2003).
41. Kilpadi, D. V. *et al.* Effect of Surface Treatment on Unalloyed Titanium Implants: Spectroscopic Analyses. *John Wiley & Sons, Inc.* (1997).
42. John F. Moulder, William F. Stickle, Peter E. Sobol, K. D. B. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy.* (1992).
43. Pesek, J. J. & Matyska, M. T. Methods for the Modification and Characterization of Oxide Surfaces. *Interface Science* **117**, 103-117 (1997).
44. Viorner, C. *et al.* Surface Modification of Titanium with Phosphonic Acid To Improve Bone Bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. *Langmuir* **18**, 2582-2589 (2002).
45. Bexell, U. L. F. Surface Characterisation Using ToF-SIMS, AES and XPS of Silane Films and Organic Coatings Deposited on Metal Substrates. (2003).
46. Xiao, S.-J., Wieland, M. & Brunner, S. Surface reactions of 4-aminothiophenol with heterobifunctional crosslinkers bearing both succinimidyl ester and maleimide for biomolecular immobilization. *Journal of colloid and interface science* **290**, 172-83 (2005).
47. Davis, D. H., Giannoulis, C. S., Johnson, R. W., Desai, T. A. & Hal, D. Immobilization of RGD to < 1 1 1 > Silicon Surfaces for Enhanced Cell Adhesion and Proliferation. *Biomaterials* **23**, 4019-27 (2002).

48. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. S. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg – Gly – Asp – Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. **8**, 867-872 (2007).
49. Godoy, M., Sevilla, P. & Gil, F. J. Unión de péptidos a superficies de titanio para la mejora de la osteointegración. *Biomecánica* **17**, 60-68 (2009).
50. Swan, E. E. L., Popat, K. C. & Desai, T. A. Peptide-immobilized nanoporous alumina membranes for enhanced osteoblast adhesion. *Biomaterials* **26**, 1969-76 (2005).
51. Zhu, M. M., Chitta, R. & Gross, M. L. PLIMSTEX: a novel mass spectrometric method for the quantification of protein–ligand interactions in solution. *International Journal of Mass Spectrometry* **240**, 213-220 (2005).
52. Xiao, S. J. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-72 (1997).
53. Tsiourvas, D., Tsetsekou, A., Arkas, M., Diplas, S. & Mastrogianni, E. Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **22**, 85-96 (2010).
54. S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. S. *et al.* Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg–Gly –Asp–Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of materials science. Materials in medicine* **8**, 867-872 (2007).
55. Schuler, M. *et al.* Comparison of the response of cultured osteoblasts and osteoblasts outgrown from rat calvarial bone chips to nonfouling KRSR and FHRRIKA-peptide modified rough titanium surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **91**, 517-27 (2009).
56. Bellis, S. L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials* **32**, 4205-10 (2011).
57. Feng, Y. & Mrksich, M. The Synergy Peptide PHSRN and the Adhesion Peptide RGD Mediate Cell Adhesion through a Common Mechanism. *Biochemistry* **43**, 15811-21 (2004).
58. Ochsenhirt, S. E., Kokkoli, E., McCarthy, J. B. & Tirrell, M. Effect of RGD Secondary Structure and the Synergy Site PHSRN on Cell Adhesion, Spreading and Specific Integrin Engagement. *Biomaterials* **27**, 3863-74 (2006).
59. Schaffner, P. & Dard, M. M. Review: Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 119- 132 (2003).
60. Satriano, C. *et al.* Surface immobilization of fibronectin-derived PHSRN peptide on functionalized polymer films-effects on fibroblast spreading. *Journal of colloid and interface science* **341**, 232-9 (2010).
61. Livant, D. L. *et al.* The PHSRN Sequence Induces Extracellular Matrix Invasion and Accelerates Wound Healing in Obese Diabetic Mice. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1537-45 (2000).
62. Benoit, D. S. W. & Anseth, K. S. The Effect on Osteoblast Function of Colocalized RGD and PHSRN Epitopes on PEG Surfaces. *Biomaterials* **26**, 5209-20 (2005).

CAPÍTULO VIII.

Conclusiones Finales

De los resultados obtenidos a lo largo la caracterización y optimización de las superficies biomiméticas, se presentarán las conclusiones para cada una de de las etapas involucradas en la modificación superficial y de su valoración en función de la respuesta celular in Vitro

PROCESO DE LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN

De la caracterización físico-química de las superficies activadas se concluye que la selección de la técnica de espectroscopia de fotoelectrones de Rayos X (XPS), ha sido acertada, porque a través de esta, pudo ser detectada la capa de contaminación de carbono presente en cada una de las superficies, al mismo tiempo que se logró estimar semicuantitativamente el porcentaje atómico de los grupos hidroxilos presentes en la capa superficial.

Estos datos son fundamentales ya que para elegir un método de activación interesa aquel que limpie e introduzca grupos hidroxilos sin modificar la naturaleza de la capa de óxidos superficiales.

La optimización del proceso refuerza:

- 1) que un incremento en la relación $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$ es un excelente parámetro para determinar la eficiencia del proceso de activación y
- 2) que la composición química de la capa de óxido puede sufrir modificaciones dependiendo si se utiliza un tratamiento de activación en seco o en húmedo; este parámetro es importante tomarlo en consideración, ya que dependiendo del mismo se puede favorecer o no el proceso de corrosión y por ende de liberación de iones, teniendo como consecuencia problemas de alergias, aflojamiento aséptico, entre otros.

En función de los resultados de cada aleación, se tiene:

Aleación de CoCr

Se ha seleccionado como método de activación el tratamiento con ácido nítrico, debido a que:

- El plasma de oxígeno resultó más efectivo frente al ataque con ácido nítrico en términos de mayor mojabilidad y mayor energía superficial, no obstante ambos tratamientos tuvieron la misma eficiencia en cuanto a remoción de carbonos, lo cual quedó demostrado con los cocientes entre $\text{C}_2+\text{C}_3+\text{C}_4$ y el carbono alifático (C_1). Aunado a ello, los resultados de XPS y ToF SIMS demostraron que el ataque con ácido nítrico representa un tratamiento apropiado para ser usado en la aleación de CoCr; debido a que el mismo fue eficiente en términos de limpieza, mostró una mayor relación $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$ y presentó mayoritariamente Cr_2O_3 , siendo este óxido el principal encargado de los enlaces metal-silano, además dentro de los óxidos presentes, es el más resistente a la lixiviación cuando está en contacto de fluidos corporales. Dichos resultados coincidieron con los datos arrojados en los ensayos con la técnica del zinc, donde se confirmó que las superficies tratadas con ácido nítrico presentan una mayor reactividad en solución.
- Mediante el ensayo de fluorescencia se validó la hipótesis de que el método de activación que introduce una mayor densidad de grupos hidroxilos en superficie (en este caso el ácido nítrico), será susceptible de unir una mayor cantidad de organosilanos y por ende, mayor cantidad de péptido.

Aleación de TiHfNb

Se ha seleccionado como método de activación el tratamiento de plasma de oxígeno, debido a que:

- El plasma de oxígeno (PO) limpia de una forma más eficaz la contaminación superficial presente en la aleación de titanio que la solución de piraña, lo cual se ve al obtener con PO un ángulo de contacto tendiente a 0°, que es un indicativo de que la muestra está totalmente limpia, con enlaces químicos insaturados y con un estado de energía más alto. Adicionalmente los resultados de XPS muestran que el porcentaje de carbono atómico asociado a los productos de contaminación disminuyen con ambos tratamientos.
- Los resultados de XPS y ToF-SIMS indican que el proceso de plasma es el que produce un mayor ratio $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$. Es decir, aunque ambos métodos generan grupos hidroxilos, el PO produce una mayor cantidad de grupos OH^- en función de la capa de óxido, que favorecerán el proceso posterior de silanización. Aunado a ello se obtuvo un resultado similar con la técnica del zinc, cuyos resultados indican que las superficies tratadas con plasma de oxígeno presentan una mayor reactividad en solución.

PROCESO DE SILANIZACIÓN

En cuanto a las técnicas de caracterización, se tiene que tanto la espectroscopia de fotoelectrones de Rayos X (XPS), como la espectroscopia de masas de iones secundarios (ToF SIMS), permitieron determinar la presencia del silicio en las superficies y de los grupos siloxanos (O-Si-O). Al mismo tiempo, a través del XPS se logró determinar la estabilidad de las capas silanizadas y con ello, la presencia de un enlace covalente entre el metal y los organosilanos.

Del proceso de silanización se puede concluir que el mismo produce modificaciones físicas de las superficies, ya que modifica la mojabilidad de las muestras aumentando el ángulo de contacto de las mismas. Paralelamente, mediante la caracterización química se deduce que los tres silanos se adhieren sobre las superficies demostrando ser el más estable, en términos de cantidad de silicio y estabilidad, el APTES+Ma. No obstante el comportamiento del CPTES y el GPTES, varió según la composición química de cada una de las superficies.

En base a la caracterización físico-química de cada una de las aleaciones silanizadas, se tiene:

Aleación de CoCr

Aun cuando todos los organosilanos se adhieren sobre esta superficie, en función del porcentaje de Si y la estabilidad, se decidió que los mejores resultados los ofrecen el APTES+Ma y el GPTES. Esta selección ha sido argumentada, gracias a que:

- Por medio de la técnica de XPS se puso de manifiesto la presencia del organosilano mediante la detección del Si 2s proveniente del grupo siloxano Si-O-Si.
- Como método de valoración del proceso, se propuso como hipótesis evaluar el rendimiento de la reacción de silanización, realizando el cociente entre los porcentajes atómicos correspondientes a los picos O2 (OH-metal)/Si (Si-O-Si), y si

este cociente se acerca a la unidad significaría que todos los átomos de silicio detectados están enlazados con el metal de la forma metal-O-Si y, por tanto, se habrían consumido todos los grupos hidroxilos presentes en la superficie. Los resultados experimentales arrojaron que el mejor silano fue el APTES+Ma con una ratio O₂/Si igual a 1.00, mientras que para el CPTES fue de 5.00 y para el GPTES de 8.00. Estos cocientes indican que tanto para el CPTES, como para el GPTES, el proceso de silanización es deficitario; ya que existen muchos grupos hidroxilos en superficie sin reaccionar, o que se ha producido una hidrólisis. No obstante para determinar si el Si presente se encontraba enlazado covalentemente se realizaron ensayos de estabilidad química, térmica y mecánica, cuyos resultados permitieron afirmar que en el GPTES y el APTES+Ma son organosilanos que se adhieren covalentemente sobre la superficie de CoCr.

Aleación de TiHfNb

Aun cuando todos los organosilanos inicialmente se encontraron presentes sobre esta aleación, se demostró que el GPTES no se enlazó covalentemente, por lo cual se decidió que los mejores resultados los ofrecen el APTES+Ma y el CPTES. Esta selección ha sido fundamentada ya que:

- Por medio de la técnica de XPS se pone de manifiesto la presencia del organosilano mediante la detección del Si y mediante el estudio de alta resolución del Si 2p, se detectó el enlace Si-O-Si (Si₂) y se efectuó el cociente O₂/Si₂, obteniéndose el valor más cercano a la unidad es para el caso del APTES+Ma (3.87), mientras que para el CPTES es de 5.51 y para el GPTES alcanza un valor de 24.29, lo que sugiere que tanto para el CPTES como para el GPTES, el proceso de silanización es menos eficiente y en ambos casos existen bastantes grupos hidroxilos en superficie sin reaccionar.

- Los ensayos de estabilidad térmica y mecánica indican que las muestras silanizadas con APTES+Ma son las que presentan una mayor estabilidad y que las muestras silanizadas con GPTES, al colocarse en agitación constante (150 rpm), a pH 7 y 7 °C, pierden todo el Si₂ que se debía haber enlazado a los grupos hidroxilos de la superficie, lo cual ocasiona, que este silano deba ser descartado para la aleación de Ti.

INMOVILIZACIÓN DE LA BIOMOLÉCULA

- Como conclusión de este apartado se tiene que para la evaluación de la inmovilización de las siguientes secuencias peptídicas: CGGRGDS, CGGFHRRIKA y CGGPHSRN y de las mezclas en relación 1:1 de CGGRGDS+CGGFHRRIKA y de CGGRGDS+CGGPHSRN, la técnica de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), ha llegado a su límite de detección; ya que ésta solo permite determinar la presencia de las biomoléculas sobre la superficie; resultando un estudio de alta resolución insuficiente para la determinación de los enlaces de los silanos con la biomolécula, razón por la cual el enlace covalente entre ellos se comprobó mediante un ensayo de estabilidad térmica, química y mecánica. Adicionalmente fue necesario hacer uso de otra técnica de caracterización (espectrofotometría de luz UV/visible (NanoDrop)) para la cuantificación de la densidad de las biomoléculas.

De los resultados obtenidos se extrae que:

Aleación de CoCr

○ Las secuencias peptídicas se encuentran enlazadas covalentemente a las superficies de CoAM y de CoG, y en términos de densidad de péptido los mejores resultados se obtuvieron con APTES+Ma, de los cual se puede deducir que a mayor cantidad de silano (capítulo IV), mayor adhesión de biomolécula.

Aleación de TiHfNb

○ Las secuencias peptídicas se encuentran adheridas a las superficies de TiAM y de TiC, lo cual se confirmó mediante la presencia del azufre sobre la superficie, y a través del incremento de los picos C4 en todas las muestras, el cual es adjudicado a los carboxilos, grupo guanidina y a los enlaces peptídicos. No obstante, no se producen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras silanizadas con APTES+Ma y las tratadas con CPTES, aun cuando, se ha comprobado que las muestras con APTES+Ma, tienen mayor porcentaje atómico de silicio en superficie.

RESPUESTA CELULAR

Como conclusión de esta sección se puede afirmar que la selección del mejor proceso de activación, en términos de limpieza y grupos hidroxilos en superficie y de los organosilanos más eficientes, en función de porcentaje y estabilidad del Si, da lugar a superficies con mejor respuesta celular.

A través de los estudios celulares in Vitro se puede concluir que:

- La adición de biomoléculas sobre las superficies, mejora el proceso de adhesión celular, lo cual quedó comprobado mediante la tinción con Calceina AM y el conteo de núcleos mediante la tinción con DAPI.

- En función de los resultados obtenidos, se puede resumir que en cuanto a densidad de células adheridas, morfología y en términos de área, las muestras que contienen RGD, solo o en mezclas, son las que presentan mejores resultados. Adicionalmente, se confirma que la concentración de biomolécula adsorbida sobre la superficie es una variable dependiente del proceso de adhesión celular; ya que la mejor respuesta celular se obtuvo en las muestras silanizadas con APTES+Ma por poseer mayor cantidad de biomolécula en la superficie y a su vez mayor porcentaje atómico de silicio.

- Partiendo de la premisa de que las secuencias peptídicas utilizadas se caracterizan por su habilidad para promover o mejorar el proceso de adhesión, el hecho de que RGD y RGD+FHRRIKA, proliferen antes que el resto de las muestras indica que estas secuencias peptídicas no solo promueven la adhesión sobre las aleación de CoCr, sino que también estimulan el proceso de proliferación.

- El mayor valor de duplicación poblacional acumulado es para las células sobre superficies con RGD+FHRRIKA, con un valor superior a 16 para la aleación de CoCr, por ende se puede decir que esta superficie es la que arroja un mejor resultado en términos de proliferación celular. En cuanto a la aleación de TiHfNb se da la proliferación de una manera mucho más lenta y con menor potencial de duplicación.

Lista de Publicaciones

Congresos

Paredes V., Rodríguez E., Gil F.J., Salvagni E., Manero J.M. *Biofunctionalization of New Ti Alloy, for Reparation and Regeneration of Bone Tissue.*

Oral Presentation: 24th European Conference on Biomaterials. The Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB). Dublin, Ireland. 2011. Nº 186, pp 91

Publicaciones

Paredes V., Salvagni E., Rodríguez E., Manero J.M. **THE ASSESSMENT OF DIFFERENT ACTIVATION METHODS OF Co-Cr ALLOY.**

Enviado a revisión en Journal of Materials Science: Materials in Medicine (Manuscript Number: JMSM5249)