



**EFEECTO DE LA
NANOESTRUCTURACIÓN DE
SUPERFICIES DE TITANIO PARA EL
DESARROLLO DE SUPERFICIES
BIOCOMPATIBLES**

Lic. Mariana Pereyra

Tesis para optar al título de Doctora en Química
de la Universidad de la República (Uruguay)

Realizada en los laboratorios de Biomateriales de la Facultad de Ciencias
y de Física del Estado Sólido de la Facultad de Ingeniería
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
Tutor: Dr. Eduardo Méndez

- 2016 -

Para mis amores entrañables

Jose y Juani

CONTENIDO

EFFECTO DE LA NANOESTRUCTURACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO PARA EL DESARROLLO DE SUPERFICIES BIOCOMPATIBLES	0
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
CAPÍTULO 1. BIOMATERIALES.....	7
1. DEFINICIÓN DE BIOMATERIALES	7
1.1. EVOLUCIÓN DE LOS BIOMATERIALES.....	8
1.1.1. <i>Biomateriales de Primera Generación (1950 - 1970)</i>	9
Características generales	9
Metales y aleaciones	10
Cerámicos	10
Polímeros.....	12
Compósitos.....	13
Compositos cerámicos/polímeros	13
1.1.2. <i>Biomateriales de Segunda Generación (1970 - 2000)</i>	13
Polímeros biodegradables	14
Hidrogeles.....	15
Bioactivos y cerámicas biodegradables	15
1.1.3. <i>Biomateriales de Tercera Generación (2000 - presente)</i>	15
Ingeniería de tejidos	15
Micro/ Nanotecnología.....	16
Microfabricación y microtecnología	16
Nanofabricación y Nanotecnología.....	16
1.2. FUNCIÓN DE LOS NUEVOS BIOMATERIALES	17
1.3. MODIFICACIÓN SUPERFICIAL A NIVEL NANO.....	18
1.4. SOBRE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS BIOMATERIALES.....	19
1.5. BIOMATERIALES PARA SUSTITUCIÓN ÓSEA	20
1.5.1. <i>La estructura y composición química del hueso</i>	21
Estructura ósea.....	23
Estructura dentaria.....	24
1.5.2. <i>Las apatitas: compuestos de Calcio y Fosfato</i>	25
1.5.3. <i>Biomateriales basados en Titanio - Hidroxiapatita</i>	28
La unión Titanio – Hidroxiapatita.....	28
1.6. UNA NUEVA VISIÓN PARA BIOMATERIALES DE SUSTITUCIÓN ÓSEA	29
1.6.1. <i>Biomimesis en la estructura del sustrato</i>	29
1.6.2. <i>Biomimesis de la síntesis de apatitas</i>	30
1.7. HACIA LA ELABORACIÓN DE UNA HIPÓTESIS DE TRABAJO	30
1.7.1. <i>Un nuevo marco conceptual para los biomateriales</i>	30
1.7.1.1. La superficie de intercambio: el factor clave para los biomateriales	31
1.7.1.2. La Teoría de West – Brown – Enquist (1999).....	31
1.7.1.3. La definición de objeto biológico.....	31
1.7.2. <i>Antecedentes para una Hipótesis de Trabajo</i>	32
1.7.2.1. Las dimensiones lineal, superficial y volumétrica de las proteínas	33

1.7.2.2. ¿Dimensión fractal o dimensión efectiva? Respuesta matemática	33
1.7.3. <i>Pensando en los biomateriales como objetos biológicos</i>	34
OBJETIVOS.....	35
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS METÁLICAS	36
2.1.1. <i>Síntesis de nanotubos de titanio</i>	36
2.1.2. <i>Síntesis de superficies nanoporosas</i>	38
2.2. SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS	38
2.2.1. <i>Método de precipitación acuosa</i>	38
2.2.2. <i>Método biomimético</i>	38
2.3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN	39
2.3.1. <i>Difracción de rayos X (XRD)</i>	39
2.3.2. <i>Medidas de ángulo de contacto</i>	42
2.3.3. <i>Métodos microscópicos</i>	43
2.3.4. <i>Espectroscopia FTIR</i>	43
2.3.5. <i>Espectroscopia Foelectrónica de rayos X (XPS)</i>	47
2.3.6. <i>Espectroscopia de Dispersión de electrones (EDS)</i>	48
2.3.7. <i>Voltamperometría cíclica</i>	48
2.3.8. <i>Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)</i>	48
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	49
3.1. INTERACCIÓN ENTRE SUPERFICIES CON NANOTOPOGRAFÍAS EQUIVALENTES	49
3.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO	52
3.2.1. <i>Nanotubos de TiO₂</i>	52
3.2.1.1. Caracterización morfológica	53
3.2.1.2. Caracterización química.....	59
Espectroscopia Foelectrónica de rayos X (XPS).	59
Espectroscopia de Dispersión de Electrones (EDS).....	60
3.2.1.3. Caracterización fisicoquímica	61
Estructura cristalina por XRD	61
Propiedades de mojabilidad de la superficie	62
Voltamperometría cíclica (CV)	63
Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	66
Comportamiento de la lámina de Ti	66
Comportamiento del titanio con nanotubos de TiO ₂	69
3.2.2. <i>Superficies porosas por Oxidación de Micro Arco (OMA)</i>	71
3.2.2.1. Morfología de la superficie	71
3.2.2.2. Composición química de las muestras modificadas por OMA.....	73
3.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS	79
3.3.1. <i>Caracterización de hidroxiapatitas sintetizadas ex-situ</i>	79
3.3.2. <i>Deposición de hidroxiapatita sobre ti: método electroforético</i>	82
3.3.3. <i>Deposición de hidroxiapatita sobre ti: método biomimético</i>	86
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	94
4.1. EL EVENTO DE BIORECONOCIMIENTO	94
4.1.1. <i>La superficie Au/TBA: biomimesis de la citocromo c oxidasa</i>	94
4.1.2. <i>¿Nanotopografía o química?</i>	97

4.2. SUSTRATOS DE TITANIO	97
4.2.1. <i>Nanotubos autoensamblados de orientación vertical</i>	98
Comportamiento electroquímico de la superficie	102
Propiedades eléctricas de las superficies por EIS.	103
Comportamiento de la lámina de Ti	103
Comportamiento de la lámina de Ti con recubrimiento de TiO ₂	104
4.2.2. <i>Titanio tratado con Oxidación por Micro Arco (OMA)</i>	104
Características morfológicas y químicas de los depósitos obtenidos	106
4.3. RECUBRIMIENTO DE HIDROXIAPATITA.....	106
4.3.1. <i>Hidroxiapatita obtenida ex situ</i>	108
4.3.2. <i>Hidroxiapatita obtenida in situ: método electroforético</i>	109
4.3.3. <i>Hidroxiapatita obtenida in situ: método biomimético</i>	110
Depósito de Hidroxiapatita sobre la superficie de Titanio lisa.....	110
depósito de hidroxiapatita sobre recubrimiento de nanotubos de TiO ₂	111
Depósito de hidroxiapatita sobre superficies oxidadas por micro arco.....	112
4.4. COMPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS	114
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	116
REFERENCIAS	120
ANEXO 1. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS	124
A1.1. MEDIDAS DE ÁNGULO DE CONTACTO	124
A1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SUPERFICIES	125
A1.2.1. <i>Composición química por EDS</i>	125
A1.2.2. <i>Composición química por XPS</i>	126
A1.3. ESPECTROSCOPIA IR POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	127
A1.4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	127
A1.4.1 <i>Voltamperometría cíclica</i>	127
A1.4.2 <i>Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)</i>	129
ANEXO 2. CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS.....	132
ANEXO 3. ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES.....	134

RESUMEN

Los biomateriales han evolucionado hacia la creación de dispositivos que se adapten al organismo biológico al cual se integran. Diferentes materiales han sido utilizados con el fin de mejorar su resistencia y biocompatibilidad. El presente trabajo de investigación explora una perspectiva diferente a la síntesis de materiales para sustitución ósea. En base a un modelo diseñado de interacción entre superficies (metal – proteína), se formuló como hipótesis de trabajo la idea que la dimensionalidad de la superficie y la dimensionalidad de la estructura debían ser diferentes para cumplir con una adecuada complementariedad de las superficies interaccionantes. Esta hipótesis se trasladó al desarrollo de biomateriales y al estudio de la interacción a nivel de la interface metal – cobertura de hidroxiapatita. Para ello se estudió la morfología y las propiedades fisicoquímicas de tres materiales con superficies modificadas a nivel macro y micro, con y sin hidroxiapatita por técnicas de SEM, FTIR, EDS, XPS, AFM, XRD y EIS. Los resultados mostraron la incidencia de la nanoestructuración del metal y la presencia de regiones no-apatíticas en los eventos de reconocimiento molecular a nivel de la interface. Con base en estos resultados, se discute la formulación de una nueva visión para el diseño de biomateriales implantables.

ABSTRACT

Biomaterials evolved into the development of devices adaptable to the biological organism. Different biomaterials have been used to improve the resistance and biocompatibility. The present research work explores a different perspective about the synthesis of bone replacement material. Based on designed model to show the surface interaction between metal-protein, a hypothesis was formulated suggesting that the dimensionality of the surface and the dimensionality of the structure might be different to meet the complementarity of the interacting surfaces. This hypothesis was applied to the development of biomaterials and the study of the interaction at the interface metal-hydroxyapatite cover. The morphology and physical chemistry properties were studied in three materials with modified surfaces at the macro and micro level with and without hydroxyapatite using SEM, FTIR, EDS, XPS, AFM, XRD and EIS techniques. The results showed the influence of the nanostructure on the metal and the presence of not-apatitical regions in the recognition events in the interface. Based on the results a new approach to the design of biomaterial implants was discussed.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo y culminación de una tesis doctoral no es sólo el resultado del esfuerzo y dedicación personal en llevarla a cabo, sino que también es producto de la colaboración de un grupo de personas.

Por tal motivo quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor y amigo de ruta, Dr. Eduardo Méndez, por todos estos años de dedicación y apoyo en cada etapa del desarrollo de la tesis. Su experiencia como investigador y docente me permitió crecer como investigadora y persona.

En segundo lugar, quisiera agradecer al Dr. Enrique Dalchiele del Laboratorio de Física del Estado Sólido de la Facultad de Ingeniería, UdelaR, por su invaluable apoyo a este trabajo, desde la disposición a orientarme en la primera etapa del desarrollo del material, hasta el préstamo de equipamiento de su laboratorio como de laboratorios del extranjero para la síntesis y análisis de las muestras.

En tercer lugar y no menos importante, quisiera agradecer a mi jefe y amigo entrañable, el M.Sc. Justo Laíz, por permitirme realizar la tesis bajo la dirección del Dr. Méndez y acompañarme en cada momento en este proceso.

En siguiente lugar quisiera agradecer al grupo de investigadores que de una manera u otra colaboraron en el análisis de muestras, en suministrar materiales sintetizados para analizar y comparar, y que enriquecieron este trabajo a través de sus aportes académicos y científicos. Ellos son:

- M.Sc. Ely Dannier V. Niño del Grupo del *Laboratorio de Física y Tecnología del Plasma y Corrosión - FITEK* Universidad Industrial de Santander, Colombia
- Dr. Piotr Tsygankov del *Plasma Research and Education Center* de la Bauman Moscow State Technical University, Rusia
- Dr. Arturo Plata Gómez, del *Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales – GOTS* Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Dr. Dietmar Leinen y su equipo, del *Laboratorio de Materiales y Superficies* (Unidad Asociada al CSIC). Departamentos de Física Aplicada & Ingeniería Química, Universidad de Málaga, España
- Dr. Schrebler y su equipo, de la Universidad de Valparaíso, Chile.
- Lic. Marco Navata, tesista del *Laboratorio Biomateriales*, Facultad de Ciencias, UdelaR

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo financiero de las siguientes entidades:

- ANII a través del SNB para grado de Maestría (2009-2011),
- Beca PEDECIBA Química Maestría (2008-2010),
- Beca PEDECIBA Química Doctorado (2011-2014)
- Fondo Clemente Estable (ANII, Uruguay), por el apoyo financiero al proyecto “Bases moleculares del bioreconocimiento en apatitas nanoestructuradas”, bajo la dirección del Dr. Méndez.

Para culminar quisiera agradecer a mi familia y amigos por su incondicional apoyo en cada etapa de este viaje.

CAPÍTULO 1. BIOMATERIALES

A través de los últimos dos siglos, el campo de la medicina ha incrementado el uso de biomateriales en la investigación y tratamiento de enfermedades. Algunos ejemplos comunes incluyen suturas y agujas para cirugía, catéteres, reemplazos ortopédicos, injertos vasculares, bombas y marcapasos cardíacos.

1. DEFINICIÓN DE BIOMATERIALES

La versatilidad que muestran estos materiales, tanto en sus características como en sus aplicaciones, ha dado lugar a diversas definiciones para los mismos. En *The Williams Dictionary of Biomaterials*[1] se resumen varias de las definiciones comúnmente halladas en los libros de texto:

- Material no-viable empleado en dispositivos médicos con el propósito interactuar con sistemas biológicos (ESB Consensus Conference I)
- Material empleado con el propósito de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función en el cuerpo (ESB Consensus Conference II)
- Material sintético, natural o natural-modificado empleado con el propósito de estar en contacto o de interactuar con los sistemas biológicos (definición ISO)
- Material sólido que existe en o está hecho por organismos vivos, tales como quitina o huesos (diccionario Larousse Science).

La diferencia entre la definición propuesta en la primera y la segunda *Consensus Conference* de la *European Society for Biomaterials* (ESB) radica en la remoción de la palabra “no-viable” y la especificación del uso del biomaterial. Por su parte, la definición ISO no está recomendada ya que implica que los materiales naturales vivos (p. ej. los tejidos) son biomateriales. Adicionalmente, el término “estar en contacto” resulta ambiguo. La definición del diccionario *Larousse Science* es de base estrictamente etimológica, y se considera de poca aplicabilidad debido a lo limitado de la misma.

Los avances en la Ciencia de los Materiales, y en particular, en la nanotecnología, han extendido el campo de aplicación de los biomateriales, y en la actualidad, se entiende por biomaterial a todo aquel material capaz de interactuar con biocomponentes, incluyéndose dentro de este último, tanto a órganos, tejidos y células, así como también a biomoléculas. Esta definición amplia incluye entonces dos conceptos que se encuentran íntimamente ligados al de biomateriales: el concepto de biocompatibilidad y el de bioreconocimiento.

El desarrollo y las aplicaciones de los biomateriales, ha experimentado una significativa influencia de los avances en medicina, cirugía, biotecnología y ciencia de los materiales. Hoy en día existen alrededor de 8000 diferentes tipos de dispositivos médicos que cumplen con las varias definiciones de biomateriales; algunos de ellos se ejemplifican en la Tabla 1.

TABLA 1. USO DE LOS BIOMATERIALES EN MEDICINA

AREA	EJEMPLOS
Reemplazo de zona dañada o enferma	Prótesis para implantes de tejido duro y blando, remplazo de válvulas cardíacas, máquinas de diálisis renal
Asistencia en curación	Suturas, adhesivos, placas óseas, tornillo
Mejorar la función (Corregir anomalía funcional, corregir problemas cosméticos, ayuda para tratamiento y diagnóstico de enfermedad)	Lentes intraoculares, desfibrilador cardíaco, Implante de tejido blando, catéteres, biosensores

1.1. EVOLUCIÓN DE LOS BIOMATERIALES

El desarrollo histórico de los materiales biomédicos coincide con el comienzo mismo de las cirugías, cuando los antiguos egipcios utilizaban prótesis para sustituir miembros amputados. Uno de los materiales más utilizados para la fabricación de prótesis era la madera, debido a su dureza y elevada relación resistencia – peso. También se sabe que en la antigua India (1500 - 1800 DC) se fabricaban prótesis de piernas, ojos y dientes [2]. El primer reporte clínico del uso de biomateriales data de 1759, cuando Hallowell reparó una arteria dañada con una clavija de madera y un hilo trenzado. Recién hacia mediados del 1800, con el uso de técnicas de cirugía asépticas llevadas a cabo por Lister, es que el uso de biomateriales fue una realidad [3]. Sin embargo, los materiales implantados en el cuerpo, generaban serias complicaciones, siendo generalmente foco de infecciones que la respuesta inmune natural del cuerpo no podía controlar efectivamente. Una vez controladas las infecciones por medio del uso de procedimientos estériles en la implantación, las propiedades físicas de los materiales de uso médico tomaron un lugar de preponderancia en el interés científico [3]. A comienzos del siglo XX, las placas óseas eran utilizadas para fijar las fracturas de huesos largos, sin embargo, muchas de éstas fallaron como resultado del pobre diseño mecánico que poseían. A estos factores meramente biomecánicos, hay que sumarle los factores químicos de deterioro, como la corrosión de los materiales metálicos en el medio fisiológico. Hacia los años '30, la utilización de aceros inoxidable y aleaciones de cromo - cobalto tuvieron un gran éxito en la fijación de fracturas, así como en la primera cirugía de reemplazo articular. Un hallazgo interesante surge de los pilotos aéreos durante la Segunda Guerra Mundial, en quienes se observó que las heridas producidas por los fragmentos plásticos de los aviones no producían reacciones crónicas adversas, lo que promovió el uso de los polímeros y plásticos como biomateriales.

La elección de los materiales para poder ser usados como biomateriales se basa en propiedades tales como la tolerancia por el cuerpo humano, y la reproducción de las funciones naturales de la parte anatómica a ser sustituida. La primera característica mencionada se relaciona con lo que hoy se conoce como *biocompatibilidad*, que se define como la capacidad de un material para llevar a cabo con una respuesta del huésped apropiada, en una aplicación específica [4]. La biocompatibilidad es un indicativo de la respuesta del tejido circundante frente a la presencia de un objeto extraño en el organismo [2]. La

segunda característica mencionada es la *biofuncionalidad*, que se refiere a las propiedades mecánicas y físicas de un implante que le permiten cumplir las funciones para lo que fue construido [4].

De acuerdo a las características de los materiales y a la evolución que han tenido en el tiempo, se los puede clasificar en generaciones.

1.1.1. BIOMATERIALES DE PRIMERA GENERACIÓN (1950 - 1970)

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los biomateriales de primera generación fueron especialmente diseñados para ser implantados en el cuerpo humano, por lo que encontraron un ámbito principal de aplicación en disciplinas médicas como la cirugía cardiovascular, la ortopedia y la oftalmología. Se utilizaban como materiales de base aquellos que eran fácilmente accesibles, y habían sido desarrollados con fines de uso en ingeniería o durante la Segunda Guerra Mundial. Por ejemplo, los primeros tubos de diálisis fueron confeccionados con acetato de celulosa; los primeros injertos vasculares fueron realizados con Dacron, un polímero desarrollado para la industria textil [4].

Los biomateriales de primera generación pueden ser de origen natural o sintético, y se clasifican por su composición química (Tabla 2). En la siguiente tabla se detallan los biomateriales más comunes de primera generación y sus aplicaciones. Se podrá observar más adelante que existe una superposición de las tres generaciones de biomateriales.

TABLA 2. MATERIALES UTILIZADOS EN LA FABRICACIÓN DE BIOMATERIALES DE PRIMERA GENERACIÓN, Y SUS APLICACIONES

MATERIALES	APLICACIONES
METALES Y ALEACIONES	
316L acero inox.	Fijación de fracturas, stens, instrumentos quirúrgicos
CP-Ti, Ti-Al-V, Ti-Al-Nb, Ti-13Nb-13Zr, Ti-Mo-Zr-Fe, Co-Cr-Mo	Reemplazo de huesos y uniones, fijación de fractura, implante dental,
Ni-Ti	Placas de hueso, stens, alambres para ortodoncia
Aleaciones de oro	Reconstrucción dental
Productos de plata	Agentes antibacteriales
Platino y Pt-Ir	Electrodos
CERAMICOS Y VIDRIOS	
Alúmina	Implantes dentales, reemplazo de uniones
Zirconio	Reemplazo de uniones
Fosfato de calcio	Reparación de hueso, recubrimiento de superficies metálicas
Porcelana	Reconstrucción dental
Carbono	Válvulas, dispositivos subcutáneos
POLIMEROS	
Polietileno	Reemplazo de uniones
Polipropileno	suturas
PVC	Tubos
Poliéster	Prótesis vasculares, sistema de liberación de drogas
COMPOSITOS	
PMMA – vidrios rellenos	Cemento dental
Goma	Catéteres, resinas dentales

METALES Y ALEACIONES

Los metales han sido utilizados por décadas principalmente como dispositivos de fijación en quebraduras y reemplazo de articulaciones. También han sido utilizados en cirugías cardiovasculares e implantes dentales y maxilofaciales [4]. Los dispositivos de fijación y las articulaciones artificiales corresponden al 44% de los dispositivos de reemplazos médicos [5]. Los materiales utilizados para la construcción de implantes deben tener ciertos requerimientos mecánicos, físicos, químicos y biológicos [6]. Más allá de tener propiedades mecánicas apropiadas como fuerza de fatiga alta, suficiente deformabilidad y una elasticidad alta, al igual que el resto de los materiales utilizados como implantes, deben tener una resistencia a la corrosión y ser biocompatibles [4, 6].

Los metales como el oro, la plata y el platino se han utilizado inicialmente en forma pura [4]. Uno de los últimos metales puros en incorporarse como biomaterial fue el titanio hacia 1940. Posteriormente, fueron reemplazados por aleaciones que mejoraban su dureza y biocompatibilidad. Las aleaciones más comúnmente utilizadas han sido las de acero inoxidable, aleaciones de titanio y aleaciones de cobalto. La primera aleación desarrollada para uso en humanos fue el acero de vanadio a comienzos de 1900 [3]. Posteriormente se desarrollaron aleaciones de acero inoxidable para mejorar la dureza y la resistencia a la corrosión, como por ejemplo los aceros 18/8 o tipo 302 (18 % Cr y 8 % Ni), así como aleaciones 18/8s Mo o tipo 316, el agregado de 2 - 3% de molibdeno mejora la resistencia a la corrosión del material en agua salada. Las aleaciones del tipo 316 y 316L son conocidas como aceros austeníticos y han sido los más ampliamente utilizados en biomateriales. Así mismo, aleaciones de Cr-Co fueron inicialmente desarrolladas para usos comerciales y posteriormente se utilizaron en biomateriales. Estas aleaciones se utilizaron como reemplazo del oro en odontología y actualmente se utilizan en articulaciones artificiales [3]. Como se mencionó anteriormente, el titanio ha sido el más reciente metal en utilizarse como biomaterial. Desde su descubrimiento en 1791 por Gregor, estuvo restringido a una curiosidad de laboratorio hasta el año 1946 cuando Kroll desarrolla un proceso comercial para la obtención de titanio a partir de la reducción del tetracloruro de titanio con magnesio [7]. El titanio es un metal reactivo que forma una capa de óxido a la exposición al aire, agua y determinados electrolitos [4]. Debido a la capa de óxido que presenta en su superficie, le brinda propiedades termodinámicas, físicas y químicas que lo hace el biomaterial metálico por excelencia.[6] Adicionalmente, es insoluble en fluidos biológicos, por lo que no libera iones que podían reaccionar con otras moléculas [3]. Más allá de las propiedades mecánicas el titanio y sus aleaciones, presentan bioadhesión gracias a los grupos oxhidrilos libres en la superficie de óxido [6]. Otra ventaja de los materiales de titanio es su alta elasticidad, el módulo de Young de estos materiales es el 50% del módulo de las aleaciones de CoCr y el acero inoxidable [5].

En el grupo de las aleaciones encontramos los materiales de memoria de forma (SMAs) que presentan la propiedad de memoria de forma térmica, super-elasticidad y fuerzas de histéresis. El más utilizado es el nitinol, que está compuesto por una relación equimolar de níquel y titanio. Se utiliza en prótesis de cirugías, *stents* endovasculares, clips para aneurismas intracraneales y anclaje de sutura vascular [3].

CERÁMICOS

Las cerámicas son otro de los grupos de materiales denominados de primera generación. Son los materiales artificiales más antiguos, utilizados originalmente en alfarería. Son compuestos policristalinos que incluyen los silicatos, óxidos metálicos, carburos, sulfuros, selenoides y varios hidruros refractarios [3]. En años recientes se han desarrollado cerámicas *high-tech* que mejoraron la biocompatibilidad y aumentaron la resistencia compresiva. Estos implantes cerámicos se han llamado biocerámicos [8], y se clasifican según la composición química y forma (Tabla 3) en dos grupos: i) fosfatos de calcio (CP) y ii)

otros compuestos como Zirconio tetragonal (ZrO_2) Ytria-estabilizada (Y_2O_3), alúmina (Al_2O_3) y algunos silicatos y fosfatos de la familia de los vidrios y cerámicas vítreas [8].

TABLA 3. COMPOSICIÓN Y FORMAS DE MATERIALES BIOCERÁMICOS

CATEGORÍA	MATERIALES	APLICACIONES
FOSFATOS DE CALCIO grupo (CP)	Hidroxiapatita (HAp o HA)	Cuerpo sinterizado (denso y poroso) Polvos Recubrimientos Composites Fibras
	β -Tricalcio fosfato (β -TCP)	Cuerpo sinterizado (denso y poroso) Polvo
	Fosfato de dicalcio anhidro (monetita, DCP o DCPA)	Polvo
	Fosfato de dicalcio dihidratado (brushita, DCP2 o DCPD)	Polvo
	Pirofosfato de calcio (CPP)	Polvo
	α -Tricalcio fosfato (α -TCP)	Polvo
	Fosfato de tetracalcio (TeCP)	Polvo
	Octacalcio fosfato (OCP)	Polvo
	Fosfato de calcio amorfo (ACP)	Polvo
	OTROS	Zirconio tetragonal Ytria-estabilizada (Y-TZP) $Y_2O_3-ZrO_2$
Óxido de Aluminio (alumina) Al_2O_3		Cuerpo sinterizado (denso)
Óxido de titanio (titania) TiO_2		Cuerpo sinterizado (denso)
Nitruro de silicio Si_3N_4		Cuerpo sinterizado (denso)
Carburo de Silicio SiC		Cuerpo sinterizado (denso)
Carbón C		Fibra
Sistemas de vidrios bioactivos $SiO_2-P_2O_5-Na_2O-CaO$		Bulk
$SiO_2-P_2O_5-Na_2O-K_2O-CaO-MgO$		Bulk
$SiO_2-P_2O_5-CaO-Al_2O_3$		Bulk
Sistema bioactivo de cerámicas vítreas. $SiO_2-P_2O_5-CaO-MgO$ (A-W)		Bulk
$SiO_2-P_2O_5-Na_2O-K_2O-CaO-MgO$ (Ceravital)		Bulk

También se clasifican en tres categorías de acuerdo a la respuesta biológica según el ambiente: cerámicas bioinertes, cerámicas bioactivas o de superficies reactivas y cerámicas reabsorbibles o biodegradables [3]. Las cerámicas bioinertes son no absorbibles y contienen carbón, zirconio, alúmina y nitruros de silicio. Estos materiales bioinertes mantienen sus propiedades mecánicas y físicas en medios biológicos y son utilizadas en implantes de soporte de estructuras como placas óseas y tornillos para huesos [3]. Las cerámicas bioactivas incluyen el vidrio, vidrios cerámicos y materiales a base de fosfato de calcio. Tienen la característica de activar la respuesta al crecimiento del hueso y tejido alrededor debido a sus propiedades osteogénicas, osteoconductor y/o osteoinductor [5], por lo cual se utilizan como anclaje para el implante. Las cerámicas biodegradables o cerámicas reabsorbibles incluyen a los fosfatos de aluminio y calcio, corales, yeso blanco, hidroxiapatitas y tricalcio fosfatos [3]. Difieren de las cerámicas bioactivas en dos aspectos: a) son más solubles y en consecuencia son degradadas por el tejido circundante; b) debido a su estructura porosa estimula el crecimiento interno del tejido. La ventaja de la estructura porosa radica en una mayor relación superficie-volumen que resulta en una mayor superficie de contacto para el tejido. Así mismo los poros interconectados permiten el crecimiento interno del tejido y facilita el transporte de sangre y nutrientes [3].

POLÍMEROS

Los polímeros han sido ampliamente utilizados en la fijación de fracturas, reemplazo de huesos, reparación de cartílagos y fijación de ligamentos [5]. Consisten en pequeñas unidades o isómeros repetidos a lo largo de una cadena principal, unidas por enlace covalente. Las mismas pueden orientarse de manera lineal, ramificaciones o estructuras de redes, dependiendo de la funcionalidad de las unidades repetidas. Las cadenas largas se mantienen unidas una con otras mediante enlaces secundarios como fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno, y enlaces primarios como fuerzas de enlaces covalentes a través de enlaces cruzados entre cadenas. Este entrecruzamiento puede aumentar la densidad del material mejorando su resistencia y dureza, lo cual trae como desventaja la disminución de la flexibilidad volviéndose más quebradizo [3]. Las propiedades físicas y químicas del material pueden cambiar modificando los grupos funcionales o el largo de la cadena. Estas modificaciones provocan cambios en sus propiedades mecánicas, por ejemplo, un aumento del peso molecular del polímero puede generar estructuras más largas, con menor movilidad resultando en un material más rígido. El aumento de tamaño de los grupos laterales o del número de entrecruzamientos de la cadena principal, disminuye el grado de empaquetamiento de la molécula provocando cambios en los puntos de fusión o ebullición [3]. Por ejemplo, la *temperatura de transición vítrea* refiere al punto entre el rango de temperaturas en la que un polímero es relativamente rígido (región vítrea) y el rango de temperaturas en que el material es muy dócil (región gomosa). Dependiendo de la temperatura un único material polimérico puede adquirir diferentes formas. Dentro de los polímeros más antiguos se encuentran el nylon desarrollado en el año 1930, siendo el primer polímero comercial. En el año 1954 el Profesor G. Natta desarrolló una nueva técnica de polimerización donde obtenía estructuras con una alta regularidad química y geométrica. Esta técnica permitió el desarrollo del polipropileno, polímero derivado del petróleo que se utiliza en varias aplicaciones médicas. Actualmente unas altas variedades de polímeros son utilizados como biomateriales. Entre ellos se incluyen: cloruro de polivinilo (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS), polímeros fluorocarbonados (PTFE), poliamidas o nylons, resinas y polisiloxanos (siliconas) [3]. Estos polímeros han sido ampliamente utilizados en dispositivos implantables, superficies de dispositivos, catéteres y tubos, transportadores inyectables de drogas e injertos vasculares. Polímeros como el poliláctido (PLA), poliglicólico (PGA) y polihidroxibutiratos (PHBV) son los tipos más comunes de polímeros que se utilizan en ingeniería de tejidos duros [5].

COMPÓSITOS

Materiales híbridos cuyas propiedades son significativamente diferentes a las originales de cada material por separado. El nuevo material presenta la ventaja de potenciar las propiedades de los materiales originales. Por ejemplo, la goma utilizada en catéteres es comúnmente llena con finas partículas de sílice para aumentar la resistencia y tenacidad del material. Así mismo, los biomateriales composites utilizados en clínica incluyen composites de resina que se utilizan como relleno en dientes por ejemplo, matrices poliméricas con barrio, vidrio o inclusiones de sílice [3].

COMPOSITOS CERÁMICOS/POLÍMEROS

En la búsqueda de mejorar las propiedades de los materiales, estudios recientes han integrado las propiedades de los cerámicos y polímeros para obtener los materiales del futuro [5]. En estos composites el polímero y la cerámica son utilizados para mimetizar el colágeno y los minerales del hueso, respectivamente. Crecimientos celulares observados sobre las matrices cerámico-poliméricas, mantienen sus características morfológicas y de crecimiento en multicapas. El uso de partículas de hidroxiapatitas en polímeros ha demostrado servir como anclas para la adsorción celular [5]. Los cristales de apatitas permiten mantener el pH del entorno del implante en el rango fisiológico, por tanto, se utilizan para prevenir las reacciones ácidas en torno a los sitios de implantación con PLA y PGA. Así mismo, el balance entre el polímero y la cerámica demostró ser delicado y los eventos químicos y las reacciones celulares durante la degradación del polímero deben contrarrestar el crecimiento interno del hueso [5].

1.1.2. BIOMATERIALES DE SEGUNDA GENERACIÓN (1970 - 2000)

A lo largo de tres décadas los biomateriales fueron evolucionando hacia el uso de diferentes materiales y al mejoramiento de las características del mismo. Si bien propiedades como biocompatibilidad y biofuncionalidad se mantuvieron en el tiempo, los materiales bioinertes fueron reemplazados por materiales bioactivos o biodegradables. A estos materiales se los llamó de segunda generación. Un material bioactivo es creado para generar interacciones específicas y controladas con el tejido circundante, mientras que un material bioabsorbible/biodegradable tiene la característica de generar reacciones químicas controladas que permiten la degradación y reabsorción del material, permitiendo que el tejido funcional crezca en ese lugar [3].

Un ejemplo de material bioactivo es la hidroxiapatita (HA) que se utiliza como implante poroso para recubrimiento de prótesis metálicas para controlar la respuesta y crecimiento del tejido óseo a lo largo del implante. Esta respuesta llamada osteoconducción, promueve la formación de una interface mecánicamente fuerte entre el implante y el hueso nativo [3].

Del mismo modo, los biomateriales biodegradables o bioabsorbibles, fueron diseñados para presentar una descomposición y absorción clínicamente relevante. En ese sentido la interface de integración entre el implante y el tejido circundante, donde se ubica el material extraño, es reemplazada por el tejido. Se pueden clasificar en naturales (almidón, colágeno) o sintéticos (PLA, PGA). Un ejemplo común son las suturas absorbibles, que consiste de un polímero compuesto por poliacrilamida (PLA) y ácido poliglicólico (PGA), estas suturas se descomponen en dióxido de carbono y agua luego de un período de tiempo [3]. En la Tabla 4 se resumen algunos biomateriales de segunda generación y sus aplicaciones.

TABLA 4. APLICACIONES MÉDICAS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES

MATERIALES	APLICACIONES
POLÍMEROS BIODEGRADABLES	
Naturales: almidón, colágeno	vendajes para heridas, sistemas de liberación controlada
Sintéticos: polianhídridos, polifosfazonas, policaprolactonas	Suturas, matrices biodegradables para ingeniería de tejidos, sistemas de liberación controlada de fármacos.
HIDROGELES	
MAA, BM, MMA	lentes de contacto
PVA, PEG, celulosa, PEGME	Absorción de agua u otros fluidos biológicos, implantes oftalmológicos, reconstrucción maxilofacial, reconstrucción de cuerdas vocales
PNVP, PHEMA	piel artificial, tendones artificiales
HEMA, MMA	mamoplastía, liberación controlada de drogas, cartílago articular
PLA-PGA, PLA-PGE, quitosano, dextrano	hidrogeles biodegradables

POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Los polímeros biodegradables fueron desarrollados para permanecer en el cuerpo un tiempo determinado permitiendo la generación de tejido alrededor y degradarse posteriormente. Los mecanismos de degradación incluyen degradación hidrolítica y enzimática; factores como el peso molecular, composición química de la cadena principal, morfología, temperatura de transición vítrea y condiciones ambientales (pH, temperatura, etc.) influyen en la degradación del mismo [3].

Los polímeros pueden ser naturales (almidón, colágeno, quitina) o sintéticos (familia de poli- α -hidroxi ácidos, poli-orto-ésteres, polianhídridos, polifosfacenos y policaprolactona. Ejemplos del uso de polímeros biodegradables como biomateriales son los implementos de suturas, vendajes para heridas, placas y tornillos de fractura y sistemas de liberación controlada. Así mismo, los soportes de andamiaje para crecimiento tisular en la ingeniería de tejidos, presentan un futuro promisorio para estos biomateriales [3].

HIDROGELES

Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos entrecruzados que forman redes, las cuales pueden absorber agua u otros fluidos biológicos. Las características de los hidrogeles dependen principalmente de la estructura polimérica de la red, en ese sentido tienen características difusivas, de expansión por absorción de agua u otros fluidos y propiedades de superficie. Las propiedades difusivas les han permitido utilizarse en la liberación de drogas y proteínas. Características como el tamaño y estructura del poro del hidrogel, composición del polímero, el contenido de agua y el tamaño del soluto, determinan la velocidad y el patrón de difusión. La modificación de la superficie de los hidrogeles les permite tener una única o varias características, lo cual favorece la versatilidad del mismo. Por ejemplo, pueden incorporarse oligopéptidos promotores de la adhesión dándole la propiedad de mediadores de adhesión celular.[9] Inclusive la utilización de bicapas lipídicas modificadas en la superficie de hidrogeles ha permitido simular membranas celulares [7]. Esta propiedad ha permitido la liberación controlada de medicamentos, donde el fármaco se encuentra en un reservorio rodeado por el polímero biodegradable. Recientemente se han desarrollado hidrogeles de liberación controlada que reaccionan a los cambios ambientales como temperatura, pH, potencial iónico, concentración de solvente y campos magnéticos o eléctricos.

BIOACTIVOS Y CERÁMICAS BIODEGRADABLES

Las cerámicas bioactivas como se mencionó anteriormente incluyen vidrio, vidrios cerámicos y materiales basados en fosfatos de calcio. Se caracterizan por promover el crecimiento del hueso y del tejido circundante lo cual le da la ventaja de anclaje al implante. Son únicas en el sentido de que son solubles y por tanto degradadas y absorbidas por el tejido circundante. Debido a su característica porosa estimula el crecimiento interno del hueso. Se han utilizado en implantes ortopédicos para el desarrollo de recubrimientos porosos en implantes [10].

1.1.3. BIOMATERIALES DE TERCERA GENERACIÓN (2000 - PRESENTE)

La tercera generación de materiales está integrada por materiales que conjugan las propiedades de ser bioactivos y biodegradables a la vez. Estos nuevos biomateriales han sido diseñados gracias al avance en el campo de la ingeniería de tejidos, micro y nanofabricación. En este sentido los biomateriales de tercera generación han sido creados para ayudar en la regeneración del tejido y no simplemente en reemplazar el tejido dañado o perdido. Tanto la micro como la nanofabricación han sido utilizadas para crear biomateriales “inteligentes” e implantes que pueden detectar y responder a varios estímulos celulares y tisulares [3].

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos refiere al proceso a través del cual se crean tejidos y órganos fisiológicamente vivos y tridimensionales, utilizando una combinación específica de células, andamiaje celular y señalización celular química y mecánica. Estos biomateriales se han utilizado de tres maneras, i) Inducir la migración celular o regeneración de tejido, ii) encapsulamiento de células que actúa como una barrera de aislamiento inmune y iii) proveer una matriz como soporte del crecimiento y la organización celular. El primero de los usos implica generar materiales bioactivos para facilitar la reparación local. La inyección de proteínas morfogénicas del hueso dentro del implante ortopédico, así como el uso de glicosaminoglicano y colágeno como sustituyente de piel artificial son algunos ejemplos [3]. La segunda estrategia utiliza polímeros como inmunoaislantes encapsulando células. Un ejemplo de ello son las membranas de fibras huecas que encierran los hepatocitos, que han sido utilizadas para construir un

hígado bioartificial para el tratamiento de la insuficiencia hepática. El tercero y más extendido uso de los biomateriales son el uso de soportes para dirigir la organización tridimensional de las células *in vivo* e *in vitro*. Los soportes más recientes han sido creados embebidos en factores de crecimiento o ligandos celulares, utilizados como señales necesarias para la migración celular y la proliferación [3].

MICRO/ NANOTECNOLOGÍA

En los últimos años ha surgido el interés de utilizar la micro y nanofabricación para el desarrollo de nuevos biomateriales. Estas técnicas que originalmente se desarrollaron en el campo de la ciencia de la informática, ingenierías, física y biología, han encontrado amplias aplicaciones en la industria de la electrónica, la manufactura y biotecnología. A pesar de que la aplicación de éstas tecnologías para el desarrollo de biomateriales es relativamente nueva, es muy promisorio el futuro para el desarrollo de implantes y dispositivos más pequeños, activos y dinámicos [3].

MICROFABRICACIÓN Y MICROTecnología

La microfabricación es el proceso por el cual se construyen materiales y dispositivos con dimensiones en el rango de los micrómetros y milímetros. Desde 1950, estas técnicas se utilizaron para la producción de semiconductores basados en microelectrónica. En general la microfabricación utiliza una técnica *top-down*, en la cual, a partir del material en bruto se construye microestructuras ya sea utilizando el *bulk* del material o sólo modificando la superficie. Estas técnicas incluyen crecimiento/deposición de film delgados, fotolitografía y etching, entre otras [3].

A partir de las últimas décadas, los dispositivos de microfabricación que contienen componentes mecánicos y eléctricos son conocidos como sistemas de microelectromecánica (MEMS). Algunos ejemplos de ellos son los sistemas de air bag de los autos, sensores de presión sanguínea, de análisis químico de la sangre. En el campo de los biomateriales, los MEMS están siendo utilizados en sistemas de liberación de drogas donde microjeringas liberan cantidades reguladas de drogas al organismo [3].

NANOFABRICACIÓN Y NANOTecnología

La nanotecnología se define como la investigación y desarrollo a nivel atómico, molecular y macromolecular en escala en el rango de 1 a 100 nm. A esta escala se presentan una serie de fenómenos que permite construir materiales a nanoescala, utilizar estructuras, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones debidos a su pequeño tamaño.

Existen características específicas que distinguen las nanoestructuras y la nanotecnología de su contraparte micro y macro. Primeramente, la nanotecnología refiere a la escala de trabajo que se sitúa en el rango de 1 a 100 nm. Segundo, la nanotecnología está concebida en la caracterización y aplicación de las propiedades físicas, químicas y biológicas únicas que la nanoescala provee por su tamaño (Tabla 5) [3].

Nanofabricación se refiere al proceso de creación de materiales a nanoescala utilizando métodos de fabricación *top-down* y *botton-up*. La fabricación de estructuras por método *botton-up* se realiza mediante el autoensamblaje de átomos y moléculas, tomando la ventaja de los materiales en nanoescala. En este sentido, la nanofabricación ha sido inspirada en la naturaleza, las estructuras biológicas son ejemplos de rearrreglos y ensamblado en el rango de nanoescala utilizando las interacciones moleculares como las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, y dipolos electroestáticos. En los últimos años varios países han desarrollado programas en nanotecnología con inversiones millonarias, en la búsqueda de nuevos desarrollos a través de la nanotecnología y la nanofabricación. Hoy en día encapsulamiento en

diferentes nanoestructuras, soportes de nanopartículas que facilite el crecimiento de hueso, son algunos de los ejemplos que se han desarrollado.

TABLA 5. TAMAÑO DE NANOESTRUCTURAS EN COMPARACIÓN CON ESTRUCTURAS NATURALES

ESTRUCTURA	TAMAÑO (nm)
<i>Estructuras nanotecnológicas</i>	
Nanopartículas	1-100
Fulerenos (C60)	1
Quantum dots (CdSe)	8
Dendrímeros	10
<i>Estructuras naturales</i>	
Átomo	0.1
DNA (ancho)	2
Proteínas	5 - 50
Virus	75 - 100
Bacterias	1000 - 10000
Glóbulos blancos	10000

1.2. FUNCIÓN DE LOS NUEVOS BIOMATERIALES

Como ha sido mencionado antes, una definición común utilizada para definir los biomateriales es: “material utilizado como dispositivo médico, destinado a interactuar con los sistemas biológicos” [4]. Constituyen un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos e inorgánicos, naturales o sintéticos que, insertos en el cuerpo, cumplen una misión de sustituir la función de un tejido u órgano. Una característica esencial es la biocompatibilidad que describe las interacciones entre el sistema vivo y el material en el sistema. Los biomateriales típicos están compuestos por metales, vidrio, cerámicos, polímeros, carbono y materiales composites. Sin embargo los materiales más nuevos emplean materiales adicionales en combinación con pequeñas moléculas, proteínas terapéuticas, moléculas biológicas y poblaciones de células vivas [4].

En la actualidad, la ciencia de los biomateriales incluye las siguientes subáreas [4]:

- *Biomateriales modificados superficialmente* - biomateriales de desarrollo ingenieril cuya superficie fue modificada para controlar la adhesión celular y la adsorción de proteínas.
- *Biomateriales inteligentes* - biomateriales que cambian sus propiedades en respuesta a cambios en el ambiente como pH, temperatura y especies químicas.
- *Biomateriales bioactivos* - biomateriales que incorporan agentes farmacológicos, factores de crecimiento, antibióticos, citoquinas, factores de adhesión, o enzimas de reconocimiento de sitios para hacer a los materiales biológicamente activos.
- *Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa* - biomateriales que reemplazan tejido u órganos con construcciones poliméricas que contienen una población de células vivas, con el objetivo de regenerar el tejido para restablecer la función normal.

Estas categorías de biomateriales no son mutuamente excluyentes, por el contrario, el biomaterial ideal, debe integrar uno o varias de estas características. Un biomaterial perfecto no sólo sirve de defensa frente a enfermedades y mantiene el tejido u órgano dañado, sino que provee de elementos requeridos para curar y reparar, estimular el sistema inmune del cuerpo y regenerar las capacidades del mismo, y al mismo tiempo interactuar con el cuerpo vivo [4].

Los biomateriales modernos deben cumplir con estrictos requisitos de rendimiento y superar difíciles desafíos prácticos. Primeramente deben demostrar suficientes propiedades físicas y mecánicas para adaptarse al medio fisiológico [4]. En ese sentido el biomaterial debe ser i) no tóxico, esto implica que sea no citotóxico, no hemolítico, y que no genere inflamación, ii) resistente a la corrosión en fluidos biológicos, iii) resistencia a los movimientos, iv) promotor de la adhesión celular y por último que exista una biocompatibilidad con el tejido huésped u órgano. Una baja biocompatibilidad del material implantado provocará daños tanto a los tejidos como al propio material. Los productos de corrosión producidos por las interacciones electroquímicas entre el material implantado y el ambiente del organismo puede provocar efectos negativos en el tejido [11] o en el propio implante [12]. En muchos casos es deseable que el biomaterial sea biodegradable sobre todo en los materiales de cirugía y regeneración de tejidos. En este caso el biomaterial debe cumplir con los requerimientos del metabolismo fisiológico, y la degradación debe ser llevada a cabo a través de la hidrólisis o clivaje por enzimas [4]. Por este motivo el producto de degradación debe ser fácilmente excretado por los riñones. El peso molecular que deben tener los residuos no pueden exceder los 70.000 Da, tamaño que está cercano al de la seroalbúmina.

Por último, los biomateriales deben satisfacer los requerimientos del mercado y las necesidades clínicas. En ese sentido un biomaterial ideal para uso médico debe ser suministrado a través de un dispositivo fácil de usar. Los sistemas deberían demostrar una adecuada estabilidad, ser guardados a temperatura ambiente y que presenten poco tiempo de preparación previa. Por su parte, los biomateriales deben ser escalables para permitir mejorar la relación costo-beneficio de manufactura. El impulso desde los aspectos clínicos, es un componente esencial del proceso de diseño, por lo que las necesidades del cirujano y las necesidades del paciente pueden ser traducidas a las especificaciones técnicas. El objetivo clínico continuamente deben guiar e inspirar la creación de nuevos biomaterial [4].

1.3. MODIFICACIÓN SUPERFICIAL A NIVEL NANO

Los materiales fabricados para ser empleados en implantes deben poseer las propiedades mecánicas adecuadas para el fin buscado. Este criterio ha sido básico desde la fabricación masiva de implantes que tuvo lugar luego de la Segunda Guerra Mundial. El tiempo permitió ver que estas características, si bien importantes, no eran suficientes para conseguir el éxito de la sustitución, ya que se presentaban problemas a nivel de la interface entre el sistema biológico receptor del material, y la superficie del biomaterial. Este es el origen de la ciencia de la modificación superficial, que se concentra más en la interface que se forma entre el biomaterial y el hospedero.

Las modificaciones superficiales pueden considerarse como aquellos procesos que cambian las características existentes de la superficie de un material para cumplir con determinados objetivos. Ejemplos habituales de estas modificaciones incluyen cambios en el grado de hidrofobicidad, cambios a nivel de topografía, cambios a nivel químico. Los estudios surgidos a partir de la llamada “revolución nano” sugieren que muchos de estos cambios pueden conseguirse con cambios topográficos que incluyan rugosidades a nivel nano.

Cuando se diseña un implante médico, usualmente es necesario definir las cualidades de la superficie en contacto con el medio biológico que producirán el beneficio médico buscado. Estas características superficiales incluyen: la mojabilidad, la lubricidad y el estado de oxidación (pasivación). En la actualidad, también se incluyen aspectos de la descripción topográfica de la superficie, para verificar el nivel de la rugosidad (micro, nano, etc.).

1.4. SOBRE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS BIOMATERIALES

Durante muchos años se ha usado el término “biocompatibilidad” para cualificar a los biomateriales. Se habla de biomateriales *biocompatibles* o *no-biocompatibles*, en función de diferentes criterios. Por ejemplo, un material con una superficie superhidrofóbica sobre la que no se adsorban proteínas se considera no-biocompatible, ya que permite su funcionamiento sin interferencias, mientras que otro material sobre el que se adsorban proteínas de interés se considera como biocompatible porque es reconocido por el organismo para cumplir una función específica. Otro enfoque para el uso de este término confunde biocompatibilidad con biotoxicidad. Tal es el caso del empleo de puntos cuánticos (*quantum dots*) a base de cadmio para la detección de ciertos cánceres por imagenología. La adhesión de estas partículas al tejido canceroso resulta el objetivo esperado y el material sería considerado biocompatible, mientras que su inherente toxicidad queda manifiesta en la reacción del organismo para expulsar esas partículas, lo que, desde este punto de vista, las hace no-biocompatibles.

David Williams, editor de la revista *Biomaterials* durante 15 años, llama la atención sobre este aspecto en un artículo editorial titulado “*There is no such thing as a biocompatible material*” (No hay tal cosa como un material biocompatible) [13]. En primer lugar, este autor reconoce que la biocompatibilidad no es una propiedad de un material, sino que es una característica del sistema biomaterial – objeto biológico hospedero del mismo. De esta manera, el término “(bio)material biocompatible” deja de tener sentido, y es necesario describir el sistema interaccionante.

Williams propone establecer una aproximación unificada a los posibles mecanismos involucrados en la biocompatibilidad, basadas en los procesos guiados por el material por un lado, y en los procesos guiados biológicamente (Figura 1).

Finalmente, se propone sustituir el término “material biocompatible” por “sistema biocompatible”, de manera de hacer valer la idea que la biocompatibilidad es una propiedad del sistema interactuante, y no una característica del material. En el caso de esta Tesis, no se busca saber si el titanio nanoestructurado es biocompatible, sino si el sistema titanio nanoestructurado – hidroxiapatita pueden formar un sistema biocompatible. Esto surgirá del estudio de la interacción titanio nanoestructurado con el medio fisiológico circundante.

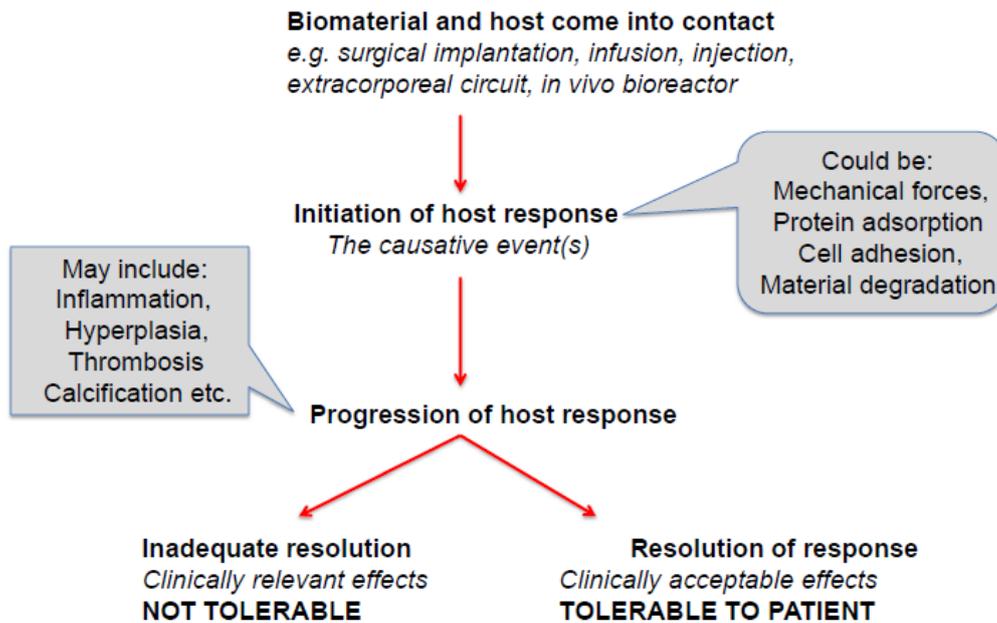


FIGURA 1. PROCESO UNIFICADO PROPUESTO PARA EL ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE BIOCOMPATIBILIDAD. ADAPTADO DE REF.[13]

1.5. BIOMATERIALES PARA SUSTITUCIÓN ÓSEA

Los reemplazos óseos o también llamados injertos óseos, tienen como función reparar el tejido luego de una lesión, así como recuperar volumen perdido del mismo. Es así que su composición es importante dado que deben tener propiedades de osteoconducción de células osteogénicas hacia el sitio del implante y al mismo tiempo servir de soporte para la regeneración del nuevo tejido óseo. Otra propiedad importante es la de ser osteoinductivo, proceso que se caracteriza por regenerar tejido óseo mediante inducir la diferenciación de células que aún no pertenecen al linaje osteogénico, pero que pueden transformarse en células osteoprogenitoras. Para que el reemplazo sea exitoso, y el hueso no sólo pueda recuperar el tejido dañado luego de la lesión, así como recuperar sus propiedades funcionales de soporte y movimiento, debe cumplir con la función original del tejido sano, cual si fuera un proceso de biomimesis.

Los implantes a base de Titanio han sido los de elección por los equipos médicos, debido a sus propiedades superiores respecto al acero inoxidable y las aleaciones de cobalto. Las reacciones desfavorables de los implantes de titanio en el hospedero son mínimas o nulas [14], sumado a la formación espontánea de una capa de óxido que provee la resistencia a la corrosión necesaria. Pero la principal característica de los implantes a base de Titanio, es su capacidad de unirse mediante enlaces al hueso natural.

¿Qué diferencia esta unión al hueso mediante enlaces a la presentada por otros biomateriales? Otros biomateriales, una vez colocados en el cuerpo, son reconocidos por el cuerpo como un objeto extraño, y se desencadena la reacción de respuesta que conduce a la encapsulación del material. Esta respuesta puede culminar allí, sin constituir un verdadero rechazo (en el sentido de tener que remover el implante), pero el aislamiento llevado a cabo por el cuerpo produce el aislamiento en sí del implante, que al no

integrarse al cuerpo, pierde sus capacidades funcionales (Figura 2). Algunos aspectos químicos de esta unión son tratados más adelante en esta Tesis.

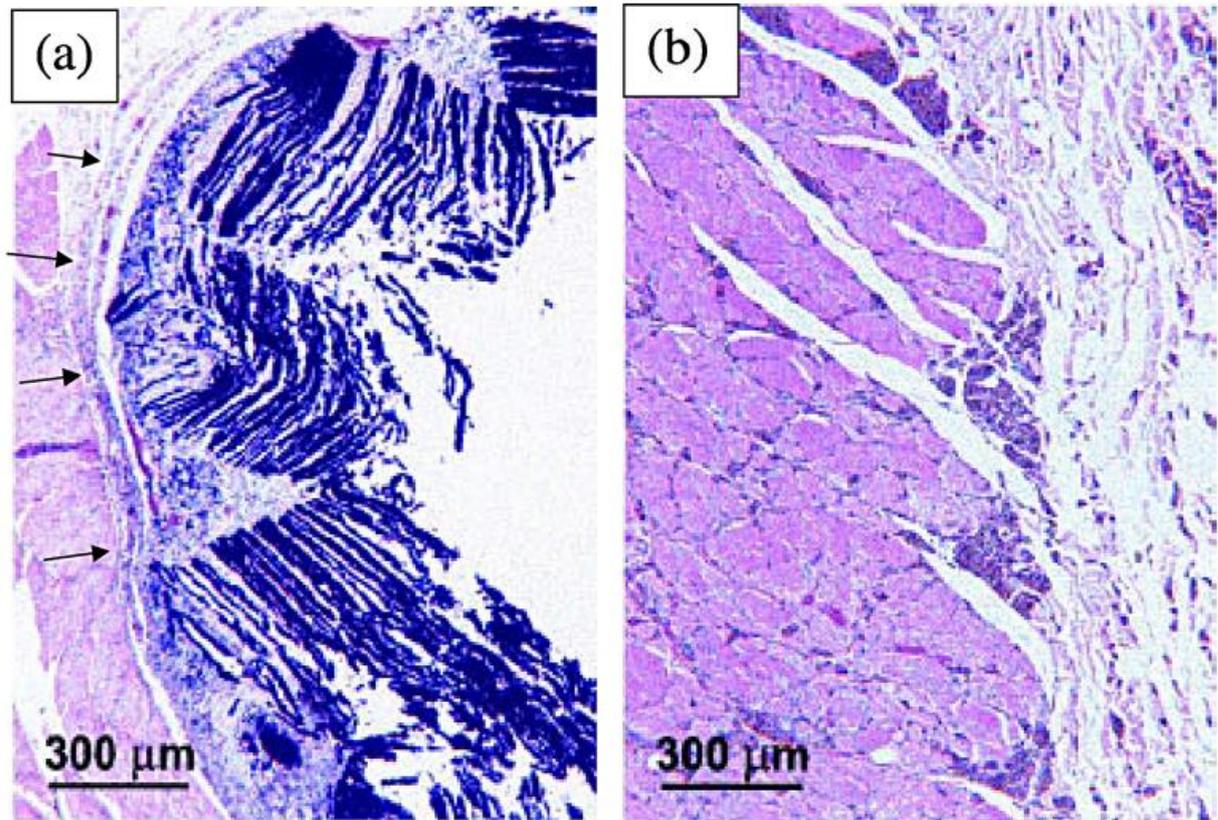


FIGURA 2. (A) ENCAPSULACIÓN DE UN IMPLANTE CON LA FORMACIÓN DE UNA MEMBRANA AISLANTE (CÁPSULA, INDICADA POR LAS FLECHAS). (B) INTEGRACIÓN DE UN IMPLANTE DEL TITANIO AL TEJIDO CIRCUNDANTE. ADAPTADO DE REF. [14]

1.5.1. LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL HUESO

El hueso es un tejido conectivo altamente especializado, diseñado por la Naturaleza para dar soporte físico a los vertebrados superiores. Al mismo tiempo provee protección a órganos vitales (cerebro, corazón, médula ósea) y actúa de anclaje de músculos y tendones esenciales para la locomoción. Adicionalmente a estas funciones mecánicas, los huesos juegan un papel metabólico fundamental como almacenamiento de calcio y fósforo, que pueden ser utilizados en casos de necesidad para el mantenimiento de la regulación homeostática de estos iones en la sangre y otros fluidos corporales.

La composición química proximal del hueso está formada en aproximadamente un 60 % de minerales (principalmente carboxiapatitas tipo AB), 10 % de agua y 30 % de matriz orgánica (predominantemente colágeno tipo I, proteoglicanos y proteínas no colagénicas como osteocalcina y osteopontina).

La estructura ósea se basa en una doble capa que varía de acuerdo a su función: compacto y trabecular. Morfológicamente la capa externa compacta, o córtex es lisa, densa y continua. Se encuentra recubriendo los huesos y en el eje medio de los huesos largos. La capa interna o trabecular, es esponjosa, y se organiza en una red formada por pequeños tejidos óseos interconectados entre sí y orientados a lo largo de la dirección principal de manera de adaptarse al tipo de carga que soporta. Las cavidades internas o intersticios son llenados por vasos sanguíneos, médula y tejido adiposo.

Durante la formación del esqueleto, las células mesenquimales se agregan para formar condensados de tejido mesenquimal, que funcionan como precursores de los elementos del esqueleto. En estos agregados, las células se diferencian a osteoblastos los que, con una adecuada vascularización, comienzan el proceso de osificación que puede culminar en la formación de hueso compacto o trabecular. Los procesos observados en estas etapas se dan por la participación de estructuras macro y microscópicas influenciadas por factores genéticos, metabólicos y mecánicos. Estos factores intrínsecos son los que definen la variedad de estructuras macromoleculares del hueso.

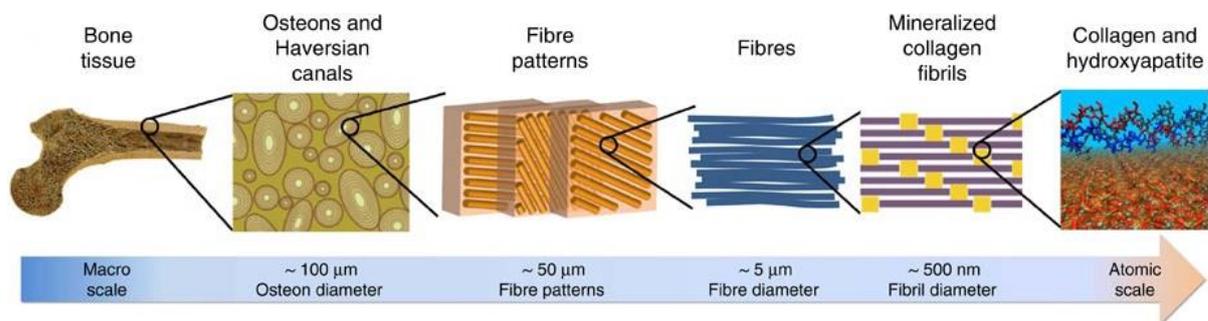


FIGURA 3. ESTRUCTURA JERÁRQUICA DEL HUESO. TOMADO DE REF. [15]

El hueso es un tejido dinámico que sufre a lo largo de la vida del huésped un proceso de regeneración mediante un ciclo coordinado de reabsorción y formación que se compone de las siguientes etapas: i) activación de osteoclastos, ii) reabsorción del hueso, iii) activación de osteoblastos, y iv) formación de hueso nuevo en el mismo lugar donde se dio la reabsorción. Los procesos intrínsecos de remodelación fisiológica, remoción y reemplazo del hueso se dan sin que el nuevo tejido afecte la forma y densidad de la estructura original. Este proceso permite la recuperación luego de una fractura o tejido defectuoso de manera rápida, siempre que la extensión de la lesión no sea mayor a un parámetro llamado *defecto crítico*, el cual establece que la recuperación de la lesión excede el tiempo de vida del huésped. En estos casos la intervención de la lesión se hace necesaria para estimular y ayudar la recuperación del tejido.

La matriz del hueso está formada por hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que da cuenta de las 2/3 partes del peso del mismo. Este componente inorgánico es el que le aporta al hueso su fuerza a la compresión. El 1/3 en peso restante está formado por fibras de colágeno, que son firmes pero flexibles, por lo que aportan al hueso sus propiedades mecánicas.

Como se mencionó anteriormente, el hueso mineral o esmalte (apatita biológica) está compuesto por apatitas carbonadas de calcio y fosfato del tipo AB. Las apatitas encontradas en los huesos corresponden principalmente a apatitas tipo B, mientras que las apatitas de los esmaltes de los dientes corresponden a una mezcla de apatitas tipo B y A. El estudio de su composición estructural generó una amplia controversia [16] y fue en los años 60 cuando el estudio de apatitas carbonatadas sintéticas reveló que los iones carbonatos podrían ser parte de la estructura en dos ubicaciones aniónicas de la estructura de la apatita: en los sitios PO_4^{3-} (apatitas carbonatadas tipo B) o en los sitios OH^- (apatitas carbonatadas tipo

A). Estudios por espectroscopia infrarroja revelaron que la composición de apatita carbonatada tipo A corresponde al 10% del esmalte en los dientes. La apatita mineral ósea también está compuesta por grupos no apatíticos de calcio y fosfato. Estos compuestos tienen la característica de ser altamente reactivos proporcionando ciertas propiedades fisicoquímicas, biológicas, funcionales y químicas fundamentales para la disolución y formación de cristales en el tejido biológico. El hueso también contiene trazas de elementos que aún no se ha definido si pertenecen a la fase mineral u orgánica de la matriz. Los tejidos mineralizados como el hueso se componen de placas delgadas de cristales irregulares de tamaños que oscilan entre 20 Å y 1100 Å. Estos cristales abarcan largas extensiones de la superficie del hueso y están expuestas al fluido extracelular, siendo críticas para el rápido intercambio de iones en la interface generada por la superficie del hueso y los fluidos.

A continuación, trataremos por separado la estructura química de los huesos y los dientes.

ESTRUCTURA ÓSEA

El hueso y sus elementos asociados como cartílagos, tejido conectivo, elementos vasculares y componentes nerviosos, actúan como un órgano funcional. Ellos aportan soporte y protección al tejido blando, y actúan junto con el músculo esquelético para que los movimientos sean posibles. Los huesos son estructuras relativamente rígidas y sus formas se asocian a la función que desempeñan, y su metabolismo está principalmente controlado por el sistema endócrino, inmune y neurovascular [17].

Desde el punto de vista de los materiales, el hueso es el tejido calcificado más típico de los mamíferos y puede ser considerado como un ensamblaje de siete niveles diferentes de unidades de estructura jerárquica que van de lo macro, pasando por lo micro y hasta la nanoescala, para cumplir numerosas funciones [18]. En todos estos niveles, el hueso interactúa permanentemente con células y macromoléculas biológicas.

A nivel nanoestructural, pequeños cristales de apatita biológica en forma de placas, crecen en los espacios entre las fibras de colágeno, a lo largo de la orientación del eje c, siendo aproximadamente paralelas a los ejes longitudinales de las fibrillas de colágeno (Figura 4). El colágeno constituye un tercio del proteoma humano, proporciona estabilidad mecánica, elasticidad y resistencia a los organismos y es el principal bloque orgánico de construcción de la mayoría de los tejidos biológicos [19, 20]. Su estructura jerárquica a nanoescala le proporciona propiedades mecánicas únicas a las microfibrillas de colágeno, donde los mecanismos claves de deformación están dados por el acortamiento de moléculas de triple hélice enroscadas en pequeñas deformaciones, seguido de estiramiento axial y algunas moléculas desenrolladas. Cada molécula de colágeno está formada por tres cadenas de péptidos que forman una molécula de triple hélice de 300 nm de longitud. Grupos de moléculas de colágeno se agregan en dirección longitudinal y lateral formando fibrillas [19]. El colágeno Tipo I se autoensamblan en fibras y presentan una característica nanoscópica dada por el espaciamiento D periódico, poco común en tejidos biológicos. Presenta una periodicidad de ~ 67 nm de distancia, entre el final de cada molécula, lugar donde se sitúa la apatita nanocristalina, las cuales le brindan rigidez y resistencia local compresiva [19, 20].

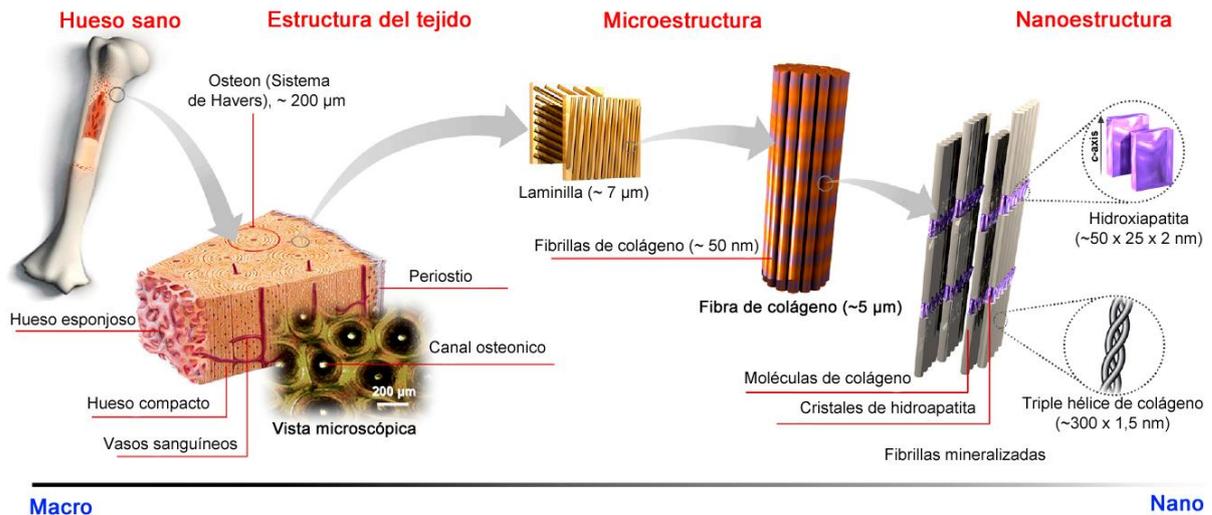


FIGURA 4. AUTO-ENSAMBLAJE DE LAS MOLÉCULAS DE COLÁGENO DESDE LA NANOESTRUCTURA A LA MACROESTRUCTURA DEL HUESO. TOMADO REF. [21].

La combinación de ambos constituyentes forma la mineralización de las fibras. Las fibras también pueden entrecruzarse, proporcionando un sistema altamente dinámico, capaz de ser modificado a través de la selección de diferentes aminoácidos para variar las propiedades mecánicas y permitir diferentes aplicaciones en biomateriales. Por tal motivo, es que el hueso es considerado una fibra reforzada de material compuesto, de origen biológico, en el cual inclusiones duras de tamaño nanométrico están embebidas en una matriz de proteínas [18, 22]. Las dimensiones reportadas en la literatura de las apatitas biológicas están entre los rangos de 30 - 50 nm de largo, 15 - 30 nm de ancho y de 2 - 10 nm de espesor. Dadas estas dimensiones es de esperar que la escala nanométrica sea importante en la estructura de los huesos. Estudios recientes demostraron que nanocomposites naturales (colágeno/HA) exhiben un gran potencial en su aplicación clínica debido a la mejora en el material producto de la suma de las propiedades de ambos. Las partículas de HA se utilizan como relleno de la matriz de colágeno y esto se espera que mejore la resistencia mecánica y el rendimiento biológico del recubrimiento de colágeno [23]. Así mismo la apatita nanoestructurada tiene una función crucial en el organismo, es un reservorio importante de calcio e iones ortofosfatos necesarios para una amplia variedad de funciones metabólicas llamadas procesos de "remodelación" en donde la apatita nanoestructurada es reabsorbida y formada por los osteoclastos y osteoblastos, respectivamente en un delicado equilibrio [18]. Los composites biomiméticos formados de apatitas y colágeno también sirven de soporte para el crecimiento celular permitiendo la adhesión de proteínas como la fibronectina, vitronectina y laminina. Estas proteínas permiten un anclaje más estrecho a la matriz por parte de las células [23, 24]. Recientes estudios realizados a nivel nanoscópico de deformaciones de huesos sanos y con osteoporosis demostraron que las propiedades mecánico-estructurales a escala atómica sugiere que el funcionamiento del hueso cortical está correlacionado con la función, disposición, movimiento, deformación, y fractura de la hidroxiapatita nanocristalina [25].

ESTRUCTURA DENTARIA

Los dientes son también un tejido calcificado basado en ortofosfato de calcio. Sin embargo, a diferencia de los huesos, los dientes consisten en dos diferentes biomateriales: esmalte (corona) y la dentina (raíz). El esmalte dental está compuesto por 98% de apatita biológica, ~1 % de componentes bioorgánicos y un

2 % de agua [18]. De mismo modo que en el hueso, el esmalte presenta una estructura jerárquica altamente organizada que le proporciona mayor resistencia y propiedades anti-abrasivas. Su estructura está formada por subunidades autoensambladas de nanocristales de hidroxiapatita carbonatada, de 50-70 nm de ancho, 20-25 nm de espesor, con una relación longitud-ancho de 1000 [26]. Los nanocristales de apatita biológica primeramente forman nanofibrillas, que se alinean longitudinalmente, y se agregan en finas fibras. Las fibras forman prismas que a microescala se autoensamblan en bandas, las cuales presentan diferentes arreglos a lo largo de la capa delgada de esmalte [27]. El esmalte debido a su estructura presenta una alta densidad de empaquetamiento de material inorgánico lo que le brinda características especiales como un módulo elástico anisotrópico, propiedades de viscosidad efectivas, mayor resistencia a la fractura y una relación tensión-deformación similar a los metales más que a las cerámicas [26]. Durante la mineralización del esmalte, el ensamblado supramolecular de las macromoléculas extracelulares fue encontrado por los investigadores como crucial. La amelogenina, componente principal de la matriz orgánica extracelular, está siendo continuamente secretada, transformada, procesada y mineralizada durante el desarrollo del esmalte [26]. Se cree que el autoensamblaje de la amelogenina es el factor clave en el control del crecimiento orientado y la elongación de cristales de hidroxiapatita carbonatada fluorada es los prismas de esmalte.

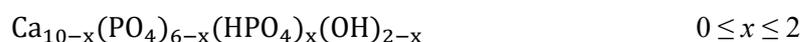
La dentina contiene ~50 % de apatita biológica, ~30 % de componentes bioinorgánicos y ~20 % de agua [18]. En la dentina las apatitas biológicas forman bloques nanodimensionales (~25 nm de ancho, ~4 nm de espesor y ~35 nm de largo), y son más pequeños que en el esmalte.

1.5.2. LAS APATITAS: COMPUESTOS DE CALCIO Y FOSFATO

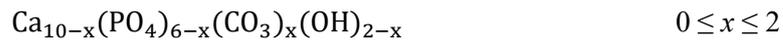
La diversidad de biominerales (apatitas) se debe a tres compuestos que están siempre presentes en su estructura en diferente proporción: calcio, fosfato y carbonatos. Su composición varía dependiendo de la especie, el huésped, su localización, la edad y el tipo de tejido mineralizado, en cambio el carbonato de calcio, otro de los minerales principales presenta una composición más constante. De acuerdo a la hipótesis de Haüy sobre la composición de los minerales fosfato-carbonato de calcio coexisten varias fases en los tejidos duros de los vertebrados, principalmente fosfatos y carbonatos de calcio [28].

Como se mencionó anteriormente los biominerales de fosfato de calcio de los vertebrados corresponden a estructuras de apatitas y los minerales del hueso son identificados como Hidroxiapatitas (HA), de fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Su estructura cristalina corresponde a un sistema hexagonal (grupo espacial $P6_3/m$), monoclinico y estequiométrica a temperatura ambiente. Durante el estudio de la estructura de las apatitas se observó la existencia de un compuesto que presentaba un arreglo cristalino diferente. A este compuesto se lo identificó como precursor de fase de la apatita, muy cercano a ésta estructuralmente y se lo identificó como *octacalcio fosfato* (OCP), $[\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$. Su estructura consiste de la asociación de una capa similar a la apatita y una capa hidratada. Precipita en forma de estructuras cristalinas de las láminas, esta fase presenta una alta velocidad de crecimiento de cristal y se hidroliza fácilmente en apatita en medio acuoso, formando compuestos intercalados con hidroxiapatita, manteniendo la forma original de láminas.

La composición química de las apatitas biológicas ha sido objeto de estudio a partir de la síntesis de minerales análogos o de minerales existentes (Tabla 6). La fórmula general para apatitas que contienen HPO_4^{2-} fue propuesta por Winand en 1961 [28]:

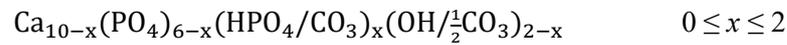


mientras que para las apatitas carbonatadas:

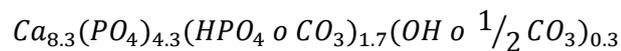


Estas fórmulas establecen un comportamiento similar cuando se sustituyen iones bivalentes por iones trivalentes como los fosfatos. Las fórmulas químicas presentan un límite en su composición dado por $x = 2$, y la disminución del contenido de OH^- cuando la cantidad de carbonato y/o HPO_4^{2-} aumenta.

La combinación de ambas fórmulas es una buena aproximación a la composición de las apatitas biológicas, tomando en cuenta la existencia de las apatitas tipo A:

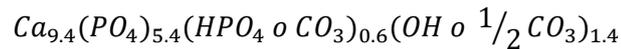


La recopilación de diferentes análisis de hueso cortical sugiere la siguiente composición relativamente homogénea:



con una relación HPO_4/CO_3 cercana a un máximo de $x = 1.7$. El contenido de carbonato varía con la edad pasando de ser muy bajo en hueso embrionario hasta alcanzar un 80% de iones bivalentes en minerales de huesos de animales vertebrados más viejos [28]. En cambio, el contenido de OH^- es relativamente constante a lo largo de la vida y se mantiene en niveles muy bajos.

Por su parte, la composición química de los cristales de esmalte de los dientes es radicalmente diferente:



Otras sustituciones menores se encuentran en las apatitas biológicas que incluyen cationes trivalentes (tierras raras, actínidos) o cationes monovalentes (principalmente Na^+) en sustitución de los iones Ca^{2+} , iones tetravalentes que remplazan PO_4^{3-} , y divalentes que remplazan OH^- .

El intercambio iónico de la superficie del hueso puede sugerir una estructura de la superficie diferente del *bulk* a nivel de nanocristal. Si bien el reemplazo de tejido óseo ha sido área de estudio a lo largo de la historia, el uso de fosfato de calcio es reciente para sustitución y reparación. El primero en ser utilizado ha sido la hidroxiapatita estequiométrica (HA) y β -tricalciofosfato (β -TCP) el cual presenta una relación estable de Ca/P (calcio y fósforo) a altas temperaturas y puede ser fácilmente sintetizado como cerámica. El β -TCP ha demostrado ser bioabsorbible y es reemplazado por el hueso por tal motivo es principalmente utilizado como biocerámica. Sin embargo la HA constituye un material no degradable, es utilizada en otros biomateriales como recubrimiento de prótesis metálicas donde se encontró que actúa como material osteoconductor en la reparación de hueso, o en composites de polímero-cerámicos presentando analogía mecánica con el tejido óseo y una excelente capacidad de unión del hueso. Los fosfatos de calcio bifásicos (BCP) están asociados con ambos Ca/P de altas temperaturas, permitiendo una velocidad de reabsorción mayores y se ha reportado que presentan propiedades biológicas superiores. A pesar de sus pobres propiedades mecánicas presentan un número importante de ventajas y están siendo utilizados en muchas aplicaciones. Recientemente recubrimientos biomiméticos que involucran Ca/P nanocristalinos de baja temperatura han sido propuestos, algunos inclusive presentan propiedades osteoinductivas [17].

TABLA 6. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS DE CALCIO Y FÓSFORO

RELACIÓN Ca/P	COMPONENTE	FÓRMULA QUÍMICA	SOLUBILIDAD A 25°C, g L ⁻¹	RANGO DE ESTABILIDAD DE pH EN SOLUCIONES ACUOSAS A 25 °C
0.5	Monocalcio fosfato monohidratado (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	~18	0.0–2.0
0.5	Monocalcio fosfato anhidro (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	~17	[c]
1.0	Dicalcio fosfato dihidratado (DCPD), mineral brushita	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	~0.088	2.0–6.0 [c]
1.33	Octacalcio fosfato (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	~0.0081	5.5–7.0
1.5	α-Tricalcio fosfato (α-TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	~0.0025	[a]
1.5	β-Tricalcio fosfato β-TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	~0.0005	[a]
1.2 – 2.2	Fosfato de calcio amorfo (ACP)	Ca _x H _y (PO ₄) _z ·nH ₂ O, n = 3–4.5; 15–20% H ₂ O	[b]	~5–12 [d]
1.5 – 1.67	Calcio deficiente de hidroxiapatita (CDHA) ^[e]	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} ^[f] (0 < x < 1)	0.0094	6.5–9.5
1.67	Hidroxiapatita (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	~0.0003	9.5–12
1.67	Fluoroapatita (FHA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	~0.0002	7–12
2.0	Tetracalcio fosfato (TTCP), mineral hilgenstockite	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	~0.0007	[a]

[a] Estos compuestos no se pueden precipitar a partir de solución acuosa.

[b] No pueden ser medidos con precisión, sin embargo, los siguientes valores fueron encontrados: 25.7 ± 0.1 (pH = 7.40), 29.9 ± 0.1 (pH = 6.00), 32.7 ± 0.1 (pH = 5.28).

[c] Estable a temperaturas por encima de los 100 °C.

[d] Siempre metaestable.

[e] Ocasionalmente, CDHA es llamado HA precipitada.

[f] En el caso que x = 1 (condición límite con Ca/P = 1.5), la fórmula de CDHA se define como: Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅(OH).

El comportamiento mecánico pobre es más evidente en cerámicas altamente porosas y aquellas utilizadas como soportes debido a que porosidades mayores a 100 µm son consideradas como requerimiento para la vascularización y la colonización de células del hueso [29-31]. Este es el motivo por el cual los octacalcio fosfatos son utilizados en aplicaciones biomédicas, como recubrimientos.

Una superficie rugosa potencia la función de los osteoblastos mientras que una superficie porosa mejora la osteoinducción comparado con superficies lisas y estructuras no porosas, respectivamente [32, 33]. La fuerza de las interacciones interfaciales entre HA nanocristalina y varios sustratos depende no solamente de la naturaleza de los grupos funcionales del sustrato, sino también de la rugosidad de la superficie generada por los nanocristales y el sustrato [34, 35].

1.5.3. BIOMATERIALES BASADOS EN TITANIO - HIDROXIAPATITA

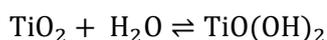
El titanio, por un lado, y la hidroxiapatita (HA) por otro constituyen materiales que, de por sí, aportan interesantes propiedades para ser empleados como biomateriales de sustitución ósea. Por un lado, el titanio y sus aleaciones muestran una resistencia a la corrosión por la formación de una capa de óxido pasivante de TiO₂. A su vez, los estudios histológicos post-implante revelan la ausencia de encapsulamiento, lo que redundará en una vida más larga del implante. Por otro lado, la hidroxiapatita es un material natural existente en nuestro organismo, y que se forma espontáneamente en condiciones fisiológicas. En este sentido, este material no ofrece resistencia por parte del organismo, que lo reconoce como propio. En consecuencia, la formación de materiales mixtos Ti-HA, ya sea como material compuesto o como superficies de Ti recubiertos por HA resultan un material ideal para su empleo como biomaterial de sustitución ósea.

Sin embargo, el uso continuado de este tipo de implantes ha mostrado que el éxito en su uso queda limitado al corto plazo, encontrándose problemas a largo plazo, que incluyen baja adhesión de la HA sobre el Ti, rajaduras en los depósitos, y formación de depósitos no homogéneos que producen crecimientos ulterior desparejos de nuevo tejido óseo. La solución a estos problemas tecnológicos aún está en ensayo, pero se reconocen algunos aspectos claves para mejorar la interacción entre el Ti y la HA [36]: i) coberturas más finas de HA y ii) mejorar el control de la textura superficial.

LA UNIÓN TITANIO – HIDROXIAPATITA

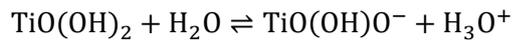
De entre todos los biomateriales metálicos, el titanio es el único capaz de formar enlaces químicos con el hueso, lo que evita el fenómeno de encapsulamiento que muestran otros biomateriales metálicos como las aleaciones de cobalto. La formación de estos encapsulamientos en lugar de la unión directa al hueso (proceso conocido como *osteo-integración*) es lo que puede producir el desprendimiento de los implantes.

El punto isoeléctrico del TiO₂ es 6.2 [37], a pH por debajo de este punto las superficies de TiO₂ se encuentran cargadas positivamente, y por encima negativamente. En medio acuoso, las superficies de TiO₂ pueden hidrolizarse de acuerdo con:



Este óxido hidroxilado que se forma presenta una relación atómica Ti:O de 1:3, diferente a la observada por el TiO₂, por lo que en principio aquellas técnicas espectroscópicas basadas en dispersión de rayos X permiten una identificación. En términos generales, para relaciones atómicas Ti:O 1:2...3 estaría indicando la presencia de un óxido superficial de fórmula TiO_{2-x}(OH)_{2x}.

Por otra parte, el óxido hidroxilado posee un comportamiento ácido-base dado por:



lo que en principio permite establecer las interacciones con los grupos HPO_4^{2-} y Ca^{2+} :



La preponderancia del carácter ácido o básico de la superficie del TiO_2 hidroxilada dará lugar a una mayor incorporación de iones fosfato o calcio.

1.6. UNA NUEVA VISIÓN PARA BIOMATERIALES DE SUSTITUCIÓN ÓSEA

La Naturaleza puede entenderse como un enorme laboratorio en el que se han llevado a cabo experimentos a lo largo de millones de años, de manera de obtener máquinas que se encuentran en un grado avanzado de optimización [38]. Recientemente, ha surgido una pregunta obvia: ¿por qué no imitar a la Naturaleza para resolver los problemas tecnológicos? En forma amplia, la *biomimesis* es justamente eso: es la ciencia que estudia a la Naturaleza como fuente de inspiración para desarrollar tecnologías innovadoras, o para resolver problemas que la Naturaleza ya ha resuelto.

El término *biomimesis* se aplica en ciencias con diferentes significados. Por un lado, se aplica a los *procedimientos tecnológicos* que imitan a los ya existentes en la Naturaleza. Por otro lado, se aplica a los *materiales* cuyas estructuras imitan a las ya existentes en la Naturaleza. Las aplicaciones no sólo se encuentran en los biomateriales, incluyen también, por ejemplo, el diseño de textiles [39], la arquitectura [22], los materiales en general [40] y hasta el estudio de las sociedades civiles [41].

El proceso de imitar a la Naturaleza como fuente de inspiración se enmarca en lo que se conoce como *Ingeniería Inversa*. La aplicación de los procesos de ingeniería inversa no constituye una mera copia de lo ya existente, sino que toma lo ya existente para eventualmente mejorarlo o adaptarlo a aplicaciones concretas. Pero más importante que esto, los procesos de ingeniería inversa requieren de una comprensión cabal del fenómeno u objeto sobre el cual se inspira. No sólo hay que imitar: hay que entender cómo funciona y por qué funciona de la manera que lo hace.

1.6.1. BIOMIMESIS EN LA ESTRUCTURA DEL SUSTRATO

La osteointegración de los implantes depende de varios factores, entre los cuales se encuentra la topografía de la superficie. Se ha observado que los implantes rugosos son mejores inductores del crecimiento óseo que los lisos. En los últimos años varios estudios se han centrado en la nanoestructuración de la superficie de los implantes, a modo de mejorar tales propiedades osteointegradoras [42], incluyendo especialmente la nanoestructuración de la superficie de las prótesis de titanio [43]. Este metal es ampliamente utilizado debido a sus excelentes propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión, bajo peso y a que presenta una aceptable biocompatibilidad [43, 44]. La formación de nanoestructuras en su superficie aporta una mayor área superficial, mejorando la unión de matrices proteicas y celulares (osteoblastos) a la misma, estimulando la osteogénesis y por ende

umentando la osteointegración [43, 45]. Además disminuye la unión de las bacterias a la prótesis, disminuyendo así la probabilidad de infección [43].

1.6.2. BIOMIMESIS DE LA SÍNTESIS DE APATITAS

Otros avances en relación a los biomateriales de sustitución ósea están enfocados en las apatitas. Estos compuestos, que se forman espontáneamente en el organismo, constituyen un biomaterial en el sentido que se sintetizan para recubrir los soportes (de acero o titanio) y quedan así en contacto con el medio celular. En este sentido, la síntesis de las apatitas tiene un doble propósito: i) recubrir los componentes metálicos que resultarían ajenos al organismo y producirían reacciones de rechazo, y ii) interaccionar en forma adecuada con el sustrato por un lado y con el organismo por otro. Este segundo aspecto es clave, ya que la adecuada interacción con el sustrato asegurará el mantenimiento del recubrimiento a largo plazo, y la adecuada interacción con el medio asegurará su no-rechazo, y eventualmente el crecimiento de nuevo tejido óseo.

Una forma de incluir las propiedades de la nanoestructuración en los recubrimientos de hidroxiapatitas es la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita [42], que presentan una mejora en las propiedades de osteoconducción, osteointegración, biocompatibilidad y bioactividad [46]. Las nanopartículas de hidroxiapatita presentan una mejor interacción con las células de hueso debido al aumento de su área superficial, rugosidad, y humectabilidad, además de su similitud con las apatitas naturales del hueso [46]. Estudios *in vitro* evidenciaron una correlación entre el incremento de la adhesión de los osteoblastos con el incremento de la proporción de la nanofase [47, 48]. Más aún, la nanoestructuración disminuye, o por lo pronto no estimula, la adhesión de otros tipos celulares competidores de los osteoblastos por los mismos sitios, como los fibroblastos o las células musculares [47]. Estudios *in vivo* en modelos animales mostraron que el uso de placas de titanio recubiertas con hidroxiapatitas nanoestructuradas incrementa la formación de hueso nuevo en su superficie [42]. Todos estos resultados sin duda alientan a innovar en los métodos de síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas, así como también en las técnicas de adhesión de las mismas a placas de titanio.

1.7. HACIA LA ELABORACIÓN DE UNA HIPÓTESIS DE TRABAJO

De los antecedentes resumidos en la Sección anterior, surge claramente que las innovaciones en nanotecnología están realizando aportes significativos al área de los biomateriales. No solamente en lo que se refiere a los aportes tecnológicos, de fabricación y modificación, sino también en la mejor comprensión de los fenómenos biológicos asociados a la interacción de los biomateriales con el medio: el bioreconocimiento, y la interacción a nivel molecular.

Existe abundante evidencia acerca de las ventajas de la nanoestructuración en la mejora de los eventos de adhesión y bioreconocimiento. Sin embargo, falta una visión globalizadora que permita comprender mejor estos fenómenos. Por ejemplo, aún son válidas las siguientes preguntas. ¿Cualquier tipo de rugosidad es necesaria? ¿Por qué la rugosidad a nivel nano afecta los fenómenos de bioreconocimiento y adhesión, y no lo hace la rugosidad a nivel micro?

1.7.1. UN NUEVO MARCO CONCEPTUAL PARA LOS BIOMATERIALES

Esta visión globalizadora del fenómeno en estudio lo puede dar la geometría fractal. En el marco de este concepto, se ha definido al objeto biológico, de acuerdo con la propuesta de los científicos Geoffrey West,

James Brown y Brian Enquist [49]. En lo que sigue haremos una breve introducción a la teoría de escalado fractal de los objetos biológicos, y resumiremos algunos resultados previos que hemos obtenido en el Laboratorio de Biomateriales, específicamente en el marco de mi Tesis de Licenciatura de Grado en Bioquímica [50, 51].

1.7.1.1. LA SUPERFICIE DE INTERCAMBIO: EL FACTOR CLAVE PARA LOS BIOMATERIALES

Medir las superficies que presentan rugosidades es uno de los desafíos mayores en el área de interfaces. Para el caso de las proteínas, las medidas de superficie se encuentran bastante resuelto, ya que existen una diversidad de métodos computacionales para ello. En breve, la medida de la superficie de una macromolécula puede hacerse empleando como elemento de medida una esfera denominada “esfera de prueba” que recorre toda la molécula de manera que los puntos de contacto representan los puntos de una hipersuperficie que puede ser evaluada computacionalmente. En general se emplean esferas de prueba correspondiente al tamaño de una molécula de agua (1.4 Å), y de esta manera se definen la “superficie accesible al solvente” y la “superficie con exclusión del solvente”.

Más allá de esta convención, cabe pensar qué sucede si se cambia el tamaño de la esfera de prueba. En el caso de que sea mayor de 1.4 Å, los puntos de contacto serán menos, y por lo tanto la hipersuperficie tendrá menos detalles, dando lugar a valores finales más pequeños. Por el contrario, esferas de prueba menores de 1.4 Å darán lugar a hipersuperficies más detalladas, y con un mayor valor para la superficie expuesta. De esta manera, surge un primer elemento a considerar: el valor medido de la superficie dependerá del elemento de medida utilizado.

¿Cómo se relacionan los valores medidos de las superficies con el tamaño de la esfera de prueba? Mandelbrot definió que, si estos elementos se encuentran ligados a través de un número racional en una ley de tipo exponencial, podía definirse a ese número racional como la “dimensión fractal” de la superficie. Al tratarse de un número racional, la dimensionalidad queda definida en un marco geométrico no-euclidiano, y las superficies ya no poseen dimensión 2, sino que presentan una dimensión en el rango comprendido entre 2 y 3. Aquellas superficies que presentan una dimensión fractal próxima a 2, corresponderán a lo que conocemos habitualmente como “superficies lisas”, y cuando se aproximan a 3 corresponderán a “superficies rugosas”. Los valores intermedios quedan de esta manera cualificados según un grado de rugosidad determinado.

1.7.1.2. LA TEORÍA DE WEST – BROWN – ENQUIST (1999)

La Teoría de West-Brown-Enquist (WBE) fue propuesta para explicar la ley de escalado biológico [52]. Estos autores consideran el marco de la geometría fractal para describir la geometría del crecimiento biológico, y encontraron que la misma quedaba determinada para maximizar la distribución de materia (alimento). De esta manera, los objetos biológicos se encontrarían ligados entre sí a través de una red de distribución con una maximización de su eficiencia, la cual involucraría a todos los objetos biológicos con independencia de su tamaño. De hecho, teniendo en cuenta la geometría de cada objeto biológico analizado, pudieron determinar que esta red escalaba con un exponente de 0.75, que podía ser explicado teóricamente en el marco de la geometría fractal.

1.7.1.3. LA DEFINICIÓN DE OBJETO BIOLÓGICO

Los objetos que integran esta ley de escalado van desde enzimas hasta mamíferos gigantes como la ballena, abarcando un rango de tamaño de 27 órdenes.[53] De esta manera, surge una nueva definición de objeto biológico, que es todo aquel objeto que cumple con la ley de escalado fractal dada por la teoría fractal.

La descripción del tamaño y la forma de los objetos puede realizarse empleando dos marcos geométricos diferentes: la geometría euclidiana y la geometría fractal. En la geometría euclidiana, los objetos se describen a través de una superficie externa S , que encierra un volumen V , con dimensiones 2 y 3, respectivamente. La geometría fractal, por su parte, describe una superficie de intercambio efectiva s , que encierra un volumen v del material biológicamente activo (Tabla 7).

TABLA 7. ESCALAMIENTO DEL LARGO, ÁREA, VOLUMEN Y MASA DEL OBJETO BIOLÓGICO PARA LA GEOMETRÍA EUCLIDEANA Y FRACTAL

VARIABLE	MARCO EUCLIDEANO	MARCO FRACTAL
Largo	$L \propto S^{1/2} \propto V^{1/3} \propto M^{1/3}$	$l \propto s^{1/3} \propto v^{1/4} \propto M^{1/4}$
Área	$S \propto L^2 \propto V^{2/3} \propto M^{2/3}$	$s \propto l^3 \propto v^{3/4} \propto M^{3/3}$
Volumen	$V \propto L^3 \propto M$	$v \propto l^4 \propto M$

Adaptado de Ref.[53]

Se puede observar que en el marco de la geometría fractal, existe un exponente fraccionario (ϵ) que se agrega al exponente euclidiano, y que se define de la siguiente manera:

Largo:	exponente $b = 1 + \epsilon_l$	$0 \leq \epsilon_l \leq 1$
Área:	exponente $b = 2 + \epsilon_s$	$0 \leq \epsilon_s \leq 1$
Volumen:	exponente $b = 3 + \epsilon_v$	$0 \leq \epsilon_v \leq 1$

Estos exponentes fraccionarios corresponden a la fracción por encima de la dimensión euclidiana que da lugar al exponente de escalado fractal b . De acuerdo con estas definiciones, se pueden establecer las siguientes proporcionalidades entre las variables geométricas:

$$l \propto s^{\frac{1}{2+\epsilon_s}} \quad s \propto v^{\frac{2+\epsilon_s}{3+\epsilon_s+\epsilon_l}} \quad l \propto v^{\frac{1}{3+\epsilon_s+\epsilon_l}}$$

Si de acuerdo con la Teoría WEB los organismos han evolucionado de forma de maximizar el área de intercambio, s , esta condición se verificará con la maximización del exponente $(2+\epsilon_s)/(3+\epsilon_s+\epsilon_l)$, que implica valores de $\epsilon_s = 1$ y $\epsilon_l = 0$. Esta condición queda matemáticamente explícita en la proporcionalidad $s \propto v^{3/4}$, relación que cumplen los objetos biológicos en un amplio rango de tamaños.

Un análisis más detallado de esta proporcionalidad indica que la efectividad en el transporte de materia está asociada a una minimización de las distancias en las estructuras internas ($\epsilon_l = 0$) y la maximización del llenado de volumen a través de la superficie de intercambio ($\epsilon_s = 1$).

1.7.2. ANTECEDENTES PARA UNA HIPÓTESIS DE TRABAJO

De acuerdo con las descripciones realizadas en la Sección anterior, la sustitución de una estructura biológica que cumpla con la definición de objeto biológico dada en el marco de la Teoría de WBE debería ser sustituida por otro objeto biológico, como representación máxima de la biomimesis. Nuevamente, es

bueno recalcar que la biomimesis no consiste en reproducir la misma estructura, sino tomar la esencialidad de las estructuras para replicar su funcionalidad. Por lo tanto, tomando en cuenta la definición de objeto biológico, sería deseable la generación de una estructura que cumpliera con esa definición. Para ello, contamos con una primera aproximación, surgida del estudio de las dimensionalidades de una proteína, estudio que fue objeto de mi Tesis de Grado, y que resumiremos a continuación las principales conclusiones a las que arribamos.

1.7.2.1. LAS DIMENSIONES LINEAL, SUPERFICIAL Y VOLUMÉTRICA DE LAS PROTEÍNAS

Cuando se aplican estos conceptos al estudio de la estructura del citocromo c, se obtuvieron resultados que por un lado confirman lo esperable: el citocromo c es un objeto biológico en el marco de la Teoría WBE, pero su estructura no es fractal. Vamos a detallar estos resultados.

Por un lado, cuando la esfera de prueba empleada es de un radio del orden de los 2 Å se obtiene un valor para la dimensión fraccional de superficie $\epsilon_s = 1$, en acuerdo con lo reportado por otros autores para otras proteínas [54-58]. En forma adicional, para este tamaño de esfera de prueba, la dimensión fraccional lineal obtenida es $\epsilon_l = 0$. De esta manera, se pudo comprobar que, para este tamaño de esfera de prueba, el citocromo c integra la red de crecimiento de naturaleza fractal, siendo hasta el momento el objeto biológico más pequeño reportado [59]. Por otra parte, cuando la esfera de prueba es de un tamaño mayor (radio > 2 Å), la dimensión fraccional obtenida para la superficie (ϵ_s) está entre 0.15 y 0.20, lo que implica una superficie de dimensión 2.15 – 2.20, es decir, con una ligera rugosidad.

¿Qué implicancia tienen estos resultados? Por un lado, y siguiendo la Teoría de WBE, el citocromo c puede considerarse como un objeto biológico integrante de una red de intercambio fractal solamente cuando las distancias internas son del orden de los 4 Å (dos veces el radio de prueba), lo que da cuenta de una optimización de sus estructuras internas para cumplir su función. Por otra parte, la superficie externa es la encargada no de la distribución de materiales en el seno de su estructura, sino de su capacidad de interactuar con el medio, más específicamente, con la citocromo c oxidasa. Este aspecto no está incluido dentro de las necesidades de la red fractal, sino que hace a su capacidad de interactuar como el medio como una entidad biológica cualquiera. De este modo, puede considerarse que el citocromo c posee dos dimensiones diferentes: una específica, que corresponde a su estructura interna, y que da cuenta de una estructura que maximiza su capacidad de intercambio de material a través del llenado del volumen con una superficie interna muy invaginada, manteniendo al mismo tiempo las distancias interatómicas en el mínimo posible (de hecho, 4 Å es una típica distancia de van der Waals). La otra dimensión da cuenta de la capacidad del citocromo c para interactuar con el medio, para lo cual necesita de una ligera rugosidad que aporte mayor cantidad de contactos físicos que aseguren una buena interacción.

1.7.2.2. ¿DIMENSIÓN FRACTAL O DIMENSIÓN EFECTIVA? RESPUESTA MATEMÁTICA

Las dimensiones obtenidas para el citocromo c, ¿son dimensiones fractales?. Esta pregunta, aplicada a otros objetos, ha dado lugar a interminables discusiones [58, 60, 61]. La respuesta, sin embargo, se encuentra en las matemáticas, y su aplicación estricta. La definición de fractal requiere verificar el cumplimiento del escalado en al menos 6 órdenes de magnitud [62]. Por ejemplo, en el caso de los objetos biológicos, el cumplimiento se verifica en 27 órdenes de magnitud. Sin embargo, la dimensión superficial para el citocromo c se ha verificado en 2 órdenes de magnitud. De esta manera, la aplicación estricta de la denominación “dimensión fractal” no es correcta, y conviene designar a las dimensiones obtenidas como “dimensión efectiva” [63].

Resulta entonces que las proteínas no son objetos fractales (por su estructura), sí son objetos biológicos (por su comportamiento) y poseen dos dimensiones efectivas: una que da cuenta de su estructura, y otra que da cuenta de su interacción con el medio.

1.7.3. PENSANDO EN LOS BIOMATERIALES COMO OBJETOS BIOLÓGICOS

De acuerdo con los estudios antes mencionados, la formación de un biomaterial que vaya a interactuar con un medio biológico debe poseer al menos dos dimensiones claramente distinguibles: una asociada a su estructura física, y por lo tanto, responsable de las propiedades adecuadas para definir un material con la fuerza y resistencia necesaria para cumplir el propósito con el que fue diseñado (sostén); y otra dimensión asociada a los fenómenos superficiales en contacto con el medio circundante, es decir, todos aquellos fenómenos asociados con el bioreconocimiento.

Para poder hacer una aproximación a la descripción de los biomateriales con dos dimensiones efectivas asociadas de los fenómenos asociados a su uso, en este trabajo de Tesis se proponen realizar estudios empleando superficies planas y rugosas, a nivel nano y micro, de manera de introducir los parámetros dimensionales y de escala. Previamente, y con base en los estudios sobre la doble dimensionalidad de los objetos biológicos, se estudiará el efecto de la topografía en el fenómeno de bioreconocimiento a través de un sistema muy bien caracterizado que permita obtener conclusiones inequívocas: la interacción entre una superficie recubierta con una monocapa de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y una proteína redox (citocromo c). Ambos objetos poseen similar dimensión efectiva de superficie, lo que podrá ayudar a demostrar si la complementariedad topográfica es o no un factor clave en el fenómeno de bioreconocimiento.

OBJETIVOS

En función de la hipótesis de trabajo propuesta, en este trabajo de Tesis perseguiremos el siguiente objetivo general:

Mejorar la comprensión de los fenómenos de interacción entre los biomateriales con el medio destacando la incidencia de las dimensiones topográficas en las escalas micro y nano.

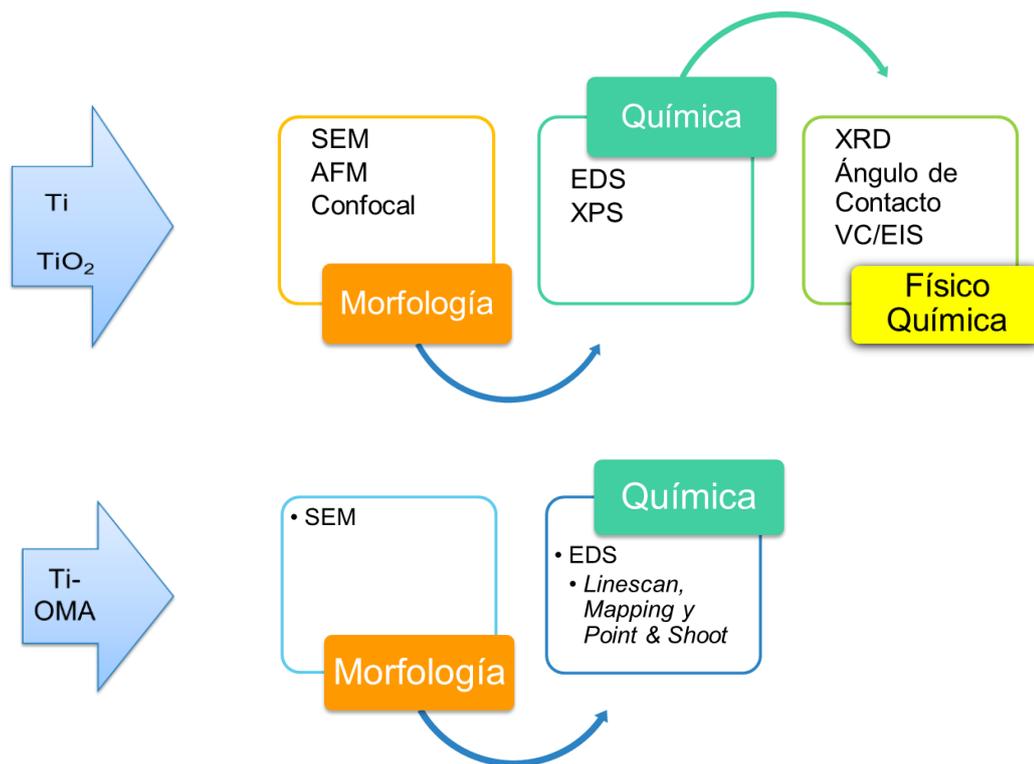
Para alcanzar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- i. Estudiar el fenómeno de interacción a nivel de interface empleando un sistema molecular conocido y bien estudiado (interface Au|TBA – citocromo c)
- ii. Estudiar el fenómeno de interacción a nivel de interface empleando un modelo de superficie nanoestructurado bien definido y caracterizado (nanotubos de TiO₂ – hidroxiapatita)
- iii. Estudiar el fenómeno de interacción a nivel de interface empleando un modelo de superficie microestructurado bien definido y caracterizado (superficie modificada por micro arco – hidroxiapatita)

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Varias de las técnicas instrumentales empleadas aportan información relevante para la caracterización de las superficies de titanio empleadas como sustrato y las hidroxiapatitas. En lo que sigue, se detallan los diseños experimentales empleados, mientras que en el Anexo 1 se incluye una descripción somera de las técnicas empleadas en este trabajo de Tesis.

El siguiente diagrama representa los pasos seguidos para el análisis de las diferentes muestras.



2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS METÁLICAS

2.1.1. SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITANIO

Se usaron chapas de Ti (99.96 %, Goodfellow, Inglaterra) de 0.8 cm x 2.5 cm, con un espesor de 0.1 mm para todos los experimentos. Pevio a la anodización las muestras fueron desgrasadas en ultrasonido con lavados sucesivos con acetona, iso-propanol y metanol por 15 min cada uno y enjuagadas con agua destilada. La anodización fue realizada utilizando un sistema de celda de 2 electrodos, una chapa de Ti de 2.5 x 2.5 como contraelectrodo y las muestras de 0.8 x 2.5 cm como electrodo de trabajo, conectadas a una fuente de voltaje constante y a una computadora para registrar los datos. Se utilizó como electrolito soporte una disolución 0.27 M de NH₄F en una mezcla de agua/glicerol 50:50 v/v. En todo momento se usó agua milliQ, y los reactivos fueron de la mayor pureza asequible (mínimo calidad puro para análisis, *ppa*). Las muestras fueron fijadas a un soporte dejando 0.8 cm² en contacto con la solución de electrolito.



FIGURA 4. FOTOGRAFÍA DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA EMPLEADA PARA LA SÍNTESIS DE LOS NANOTUBOS DE TITANIO

Para el estudio de la influencia del potencial en el anodizado se llevaron a cabo tres ensayos de anodización potencioestática a 10, 20 y 30 V a un tiempo de anodización fijo de 210 min. Para ello, se aplicó una rampa de potencial desde 0 V hasta el potencial deseado a una velocidad de 2.5 V s^{-1} , y luego se mantuvo el potencial constante durante el tiempo pre-establecido (Tabla 8). Durante el anodizado se registraron las curvas cronoamperométricas.

A partir de estos resultados se estudió el tiempo de anodización a un potencial fijo de 20 V, aplicando una rampa de potencial de 0 V a 20 V a una velocidad de 2.5 V s^{-1} durante tiempos comprendidos entre 210 min y 420 min (Tabla 8). Luego del anodizado las muestras fueron enjuagadas con agua destilada, sonicadas en HCl 0.1 M por 30 s y secadas en corriente de aire tibio. Finalmente, se les hizo un tratamiento térmico en mufla al aire a $550 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 210 min. Las muestras fueron caracterizadas por microscopia SEM.

TABLA 8. CONDICIONES DE TRABAJO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA SUPERFICIE DE NANOTUBOS DE TiO_2 MEDIANTE ANODIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

MUESTRA	VOLTAJE (V)	TIEMPO (MIN)
M1	20	210
M2	30	210
M3	10	210
M11	20	210
M12	20	300
M13	20	420

2.1.2. SÍNTESIS DE SUPERFICIES NANOPOROSAS

Se utilizaron muestras de Ti 99.6% de 12 mm x 12 mm con un espesor de 0.1 mm. Las mismas fueron tratadas por un proceso de Oxidación por Micro Arco (OMA) en medio alcalino (pH 7 a 9). Se utilizó un electrolito basado en $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ al cual se le adicionó TiO_2 (20 g L^{-1}) a una serie de muestras para la generación de los poros de TiO_2 y a otras se adicionó CaO (10 g L^{-1}) como precursor para la generación del material de los huesos. Se utilizaron distintos tiempos de tratamiento: 30, 60 y 90 min. El proceso se realizó mediante la aplicación de una corriente alterna (AC) bajo un voltaje de 2000 V y una densidad de corriente en el rango de $10 - 100 \text{ A dm}^{-2}$. Luego del tratamiento se pule la superficie en ultrasonido para quitar la capa superior de residuo.

2.2. SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS

2.2.1. MÉTODO DE PRECIPITACIÓN ACUOSA

Se preparó una solución 1 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.48 M de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ similar a la propuesta por Yubao *et al.* (J Mater Sci: Mater Med (1994), 5:326-331) Se mezclaron ambas soluciones y se ajustó el pH en 10. Se agitó durante 3 hs y se dejó la solución en reposo durante 5 días para producir el envejecimiento del producto. Luego se secó a 60°C durante 24 hs y posteriormente se calcinó a 980°C por 1 h, obteniéndose un polvo de color blanco.

2.2.2. MÉTODO BIOMIMÉTICO

Se preparó una disolución similar fluido fisiológico (SBF) según protocolo de Takadama *et al.* [64]. Esta disolución es supersaturada con respecto a la apatita, por lo que es necesario cumplir estrictamente con el protocolo de preparación para evitar la precipitación de la apatita en la solución, así como con las cantidades a emplear de cada reactivo. Por ello se debe corroborar que en todo momento la disolución se mantiene incolora y transparente, y que no se forman cristales en la superficie de la botella. Para la preparación de 1000 mL de SBF se colocaron 700 mL de agua milliQ con una barra magnética en un vaso de 1000 mL. Se colocó el recipiente en un baño termostático a $36.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$, y se agregan los reactivos en el orden especificado en la Tabla 9.

TABLA 9. CANTIDADES DE LOS DIFERENTES REACTIVOS A UTILIZAR PARA PREPARAR 1000 ML DE UNA SOLUCIÓN SÍMIL FLUIDO FISIOLÓGICO (SBF)

ORDEN DE AGREGADO	REACTIVOS	CANTIDAD
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	KCl	0.225 g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.231 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.311 g
6	1.0 M HCl	39 mL
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	Tris	6.118 g
10	1.0 M HCl	0 a 5 mL

Una vez preparada la disolución de SBF y ajustada a pH 7.42, se colocaron las muestras en la solución en tubos Falcon de 50 mL (Figura 5), y se dejaron incubando a 37 °C durante 4 semanas.

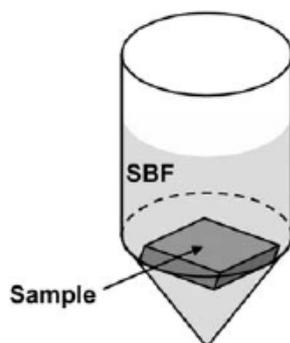


FIGURA 5. MODO DE INMERSIÓN DE LA MUESTRA EN UNA DISOLUCIÓN SBF DENTRO DE UN TUBO FALCON

2.2.3. MÉTODO ELECTROFORÉTICO

La HA sintetizada por método de precipitación acuosa, se depositó sobre las láminas de Ti lisa y con nanotubos por Método Electroforético. Las láminas de titanio fueron colocadas en una celda, utilizando como contraelectrodo una placa de Ti. Se introduce el dispositivo en la solución de HA sintetizada en acetona al 1% y se aplica una diferencia de potencial de 5, 10 y 20 V. El tiempo de deposición fue de 10 min para cada una de las distintas superficies de titanio (nanoestructurado y liso).

2.3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

Las superficies empleadas fueron caracterizadas por una batería de técnicas, incluyendo métodos fisicoquímicos, microscópicos, espectroscópicos y electroquímicos.

2.3.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

Los estudios de las estructuras cristalinas de todas las superficies se realizaron mediante difracción de rayos X (XRD) en un difractómetro PHILIPS PW3710 usando radiación $\text{CuK}\alpha$. Se usaron patrones para identificar los picos del XRD de las superficies de titanio: Ti puro (JCPDS 89-5009); TiO_2 rutilo (JCPDS 88-1172) y TiO_2 anatasa (JCPDS 89-4921) (Tabla 10). Para las hidroxiapatitas, se usó el patrón PDF 90-432 (

Tabla 11).

TABLA 10. PATRÓN XRD PARA EL TITANIO, Y LAS FORMAS RUTILO Y ANATASA DEL TiO_2

Titanio			TiO_2 rutilo			TiO_2 anatasa		
2 θ	Intensidad	hkl	2 θ	Intensidad	hkl	2 θ	Intensidad	hkl
35.065	30	100	27.435	999	110	25.306	999	101
38.404	26	002	36.079	438	101	36.950	59	103
40.151	100	101	39.189	65	200	37.791	185	004
53.011	19	102	41.238	171	111	38.569	70	112
62.963	17	110	44.042	60	210	48.042	243	200
70.661	16	103	54.319	482	211	51.964	1	202
74.266	2	200	56.624	138	220	53.884	149	105
			62.757	66	002	55.067	152	211
			64.045	64	310	62.112	26	213
			65.508	5	221	62.688	110	204
			69.002	153	301	68.754	46	116
			69.800	78	112	70.295	52	220

TABLA 11. PATRÓN XRD PARA HIDROXIAPATITA

2 θ	Intensidad	hkl	2 θ	Intensidad	hkl	2 θ	Intensidad	hkl
10.820	12	100	43.804	8	113	63.443	4	510
16.841	6	101	44.369	2	400	64.078	13	304
18.875	4	110	45.305	6	203	64.078	13	323
21.819	10	200	46.711	30	222	65.031	9	511
22.902	10	111	48.103	16	312	66.386	4	422
25.354	2	201	48.623	6	320	66.386	4	413
25.879	40	002	49.468	40	213	69.699	3	512
28.126	12	102	50.493	20	321	71.651	5	431
28.966	18	210	51.283	12	410	71.651	5	404
31.773	100	211	52.100	16	402	72.286	4	520
32.196	60	112	53.143	20	004	72.286	4	205
32.902	60	300	54.440	4	104	73.995	7	423
34.048	25	202	55.879	10	322	75.022	3	324
35.480	6	301	57.128	8	313	75.022	3	602
39.204	8	212	58.073	4	501	75.583	9	215
39.818	20	310	59.938	6	420	76.154	1	432
40.452	2	221	60.457	6	331	77.175	11	513
42.029	10	311	61.660	10	214	78.227	9	522
42.318	4	302	63.011	12	502			

2.3.2. MEDIDAS DE ÁNGULO DE CONTACTO

Las propiedades de mojabilidad de la superficie modificadas con nanotubos de TiO_2 se realizaron a través de medidas de ángulo de contacto en condiciones de equilibrio termodinámico. Se empleó un equipo fabricado en el Laboratorio de Biomateriales consistente en una cámara de acrílico de dimensiones 13 cm x 15 cm x 10 cm, con tapa, dentro de la cual se encuentran un portamuestra y un *led* blanco de alta intensidad alineados mediante tecnología láser (Figura 6). Frente al portamuestras se coloca una cámara *web* (*usb* 2.0, FUN!CAM) conectada a una computadora para el registro estático o dinámico de las imágenes. Entre la cámara *web* y el portamuestra se coloca una lupa 10x (Peak, Japón) para obtener imágenes de gota más definidas.

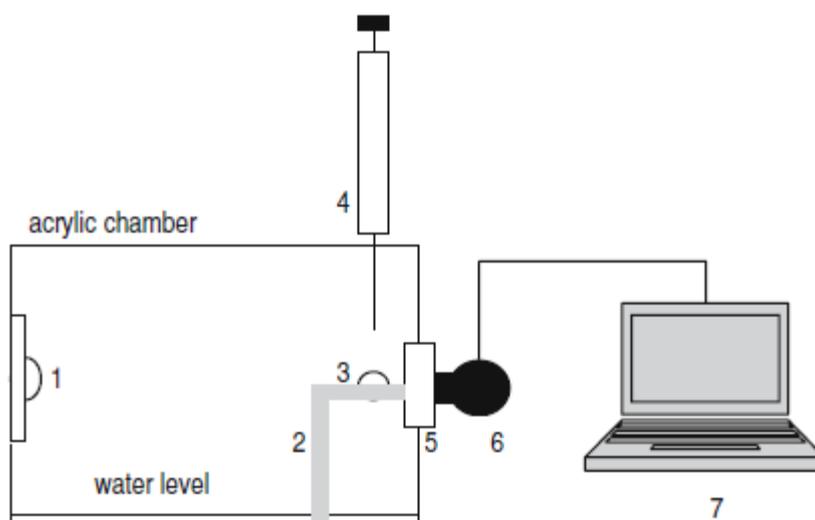


FIGURA 6. EQUIPO DE MEDIDA PARA ÁNGULO DE CONTACTO. 1: FUENTE LUMÍNICA, 2: PORTAMUESTRA, 3: GOTA DE LÍQUIDO, 4: JERINGA, 5: LUPA 10X, 6: CÁMARA WEB, 7: COMPUTADORA. ADAPTADO DE REF.[65]

El sistema opera en condiciones de humedad controlada (RH 100 %), que permite mantener las gotas de agua sin modificaciones de su forma por un lapso de al menos 8 min, suficiente para realizar las medidas [65]. Las imágenes fueron procesadas con el programa *ImageJ* v.1.33 (*National Institute of Health, NIH, EE.UU.*), que posee un módulo de medida de ángulos de contacto.

El procedimiento de adquisición de la medida consiste en colocar la superficie en estudio sobre el portamuestra, e inundar la plataforma de la caja de acrílico con agua para conseguir un ambiente saturado en humedad. Con una jeringa Hamilton, se atraviesa una septa colocada en la tapa sobre el portamuestra, y se coloca una gota de 1 μL sobre el centro de la superficie. A través de la cámara *web* se obtiene una fotografía que es luego procesada con el programa *ImageJ* para obtener el valor del ángulo de contacto.

El error absoluto en la medida de ángulo de contacto en el equipo empleado varía entre 0.7 y 1° [66].

2.3.3. MÉTODOS MICROSCÓPICOS

La morfología y la estructura de los nanotubos y de los poros de TiO_2 fueron estudiados por microscopía de barrido (SEM JEOL 5900). Para las observaciones del perfil de los nanotubos se cortaron las muestras mecánicamente.

Los estudios estructurales en 3D fueron realizados en un microscopio de fuerza atómica (AFM) de la Universidad de Valparaíso, Chile, gracias a la asistencia del Dr. Enrique Dalchiele.

Las medidas de microscopía confocal se realizaron durante una pasantía en la Universidad Industrial de Santander, con la supervisión del Dr. Arturo Plata.

2.3.4. ESPECTROSCOPIA FTIR

Las espectroscopías vibracionales, como FTIR o Raman, permiten obtener información sobre los entornos químicos de los grupos fosfato, carbonato, oxhidrilo y moléculas de agua de hidratación. En este sentido resulta una técnica ideal para caracterizar a las hidroxiapatitas.

El espectro del grupo fosfato se encuentra reportado en el trabajo clásico de Miller y Wilkins de 1952 [67]. Los espectros IR presentados en este trabajo permitieron reconocer la vibración asignada al grupo fosfato entre 900 y 1100 cm^{-1} , con características dependientes del catión: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} y Cr^{3+} . Varios estudios han distinguido e identificado la mayoría de las bandas de apatitas cristalinas. Sin embargo, para los sustituyentes de las apatitas no estequiométricas la asignación es menos precisa. La distorsión de los entornos iónicos induce una ampliación de la banda, limitando la resolución de la misma y en parte, altera la correlación de vibración en relación con la teoría de factor de grupos [68]. Las apatitas nanocristalinas dan lugar a espectros IR con características específicas (Figura 7) y la posición de las principales bandas vibracionales se encuentra tabulada (Tabla 12).

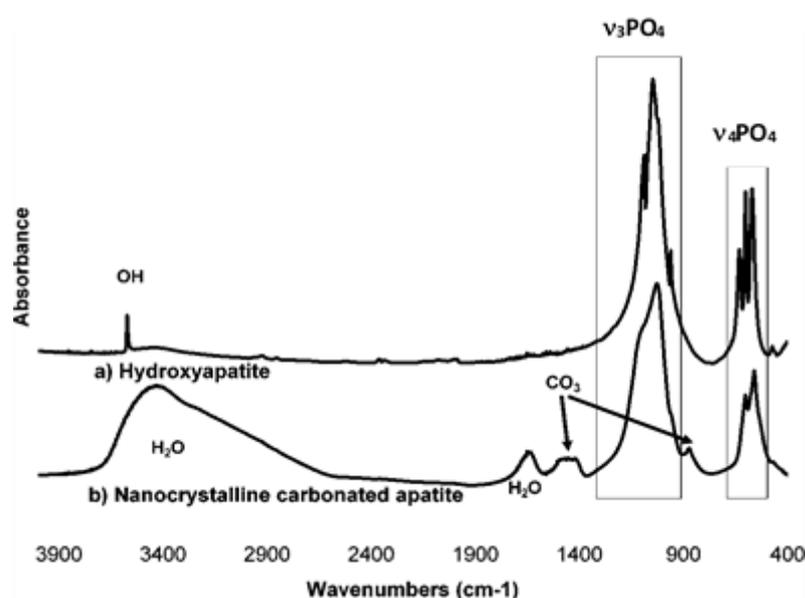


FIGURA 7. ESPECTROS FTIR DE (A) HIDROXIAPATITA CRISTALINA, Y (B) APATITA CARBONATADA POBREMENTE CRISTALINA. ADAPTADO DE REF.[68]

Cuando los iones de HPO_4^{2-} están presentes, se observan bandas específicas de estos iones. En particular se observan en la mayoría de las apatitas nanocristalinas y especialmente en apatitas biológicas, sin embargo, también se observan bandas adicionales que no aparecen en apatitas cristalinas. Estos entornos de fosfatos no apatíticos aparecen más claramente en el dominio $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (Figura 8) [68-71]. La formación de entornos no-apatíticos, se han relacionado con la síntesis de apatitas nanocristalinas a pH fisiológico y esto se corresponde con iones intercambiables de la superficie.

TABLA 12. POSICIÓN DE LAS BANDAS DE VIBRACIÓN INFRARROJA PARA HIDROXIAPATITAS ESTEQUIOMÉTRICAS Y NO-ESTEQUIOMÉTRICAS

Asignación, dominio	Hidroxiapatita estequiométrica	Hidroxiapatita no-estequiométrica
$\nu_2\text{PO}_4$	464	469
	474	
HPO_4 , no-apatítico		533
HPO_4 , apatítico		551
$\nu_4\text{PO}_4$	567	562
	572	575
	602	603
PO_4 , no-apatítico		617
$\nu_{\text{L}}\text{OH}$	633	
P-OH del grupo HPO_4		870
$\nu_2\text{CO}_3$, no-apatítico		866
		871
		880
$\nu_1\text{PO}_4$	964	962
$\nu_3\text{PO}_4$		1006
		1020
	1026	1031
	1034	
	1044	1044
		1059
	1063	
	1089	1072
		1091
		1104
HPO_4		1144
$\nu_1\text{CO}_3$ tipo B		871
$\nu_2\text{CO}_3$ tipo A		873
B + no-apatítico		1420
$\nu_3\text{CO}_3$ tipo A + tipo B		1460-1470
no-apatítico		1500
tipo A		1540

Una forma de obtener una descripción más detallada de las bandas presentes en las regiones de absorción de los grupos fosfato es emplear espectroscopia derivada (segunda o cuarta) [72, 73]. A partir de la identificación de las bandas presentes, se puede deconvolucionar el espectro para dar cuenta de las señales que lo componen. De esta manera es posible distinguir las señales correspondientes a los grupos PO_4^{3-} en regiones apatíticas y los grupos HPO_4^{2-} en regiones no-apatíticas [74].

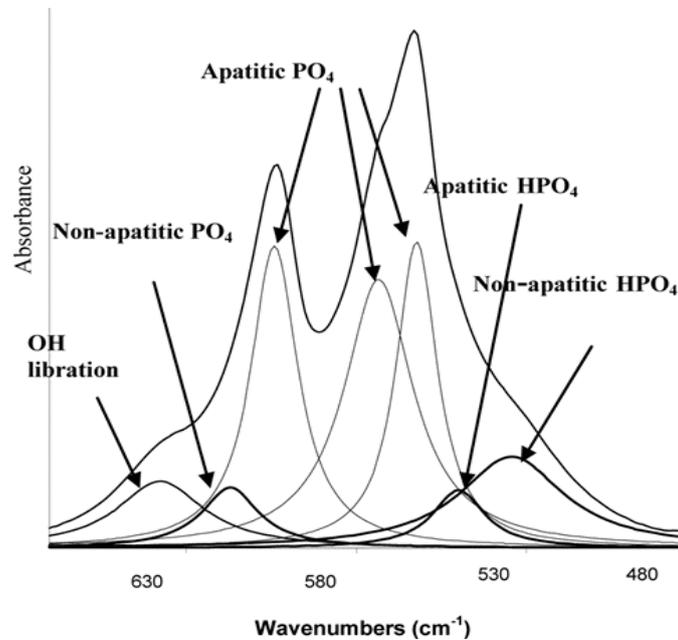


FIGURA 8. DECONVOLUCIÓN DE LAS BANDAS $\nu_4\text{PO}_4$ DE FTIR IDENTIFICANDO APORTES DE REGIONES APATÍTICAS Y NO-APATÍTICAS.[71]

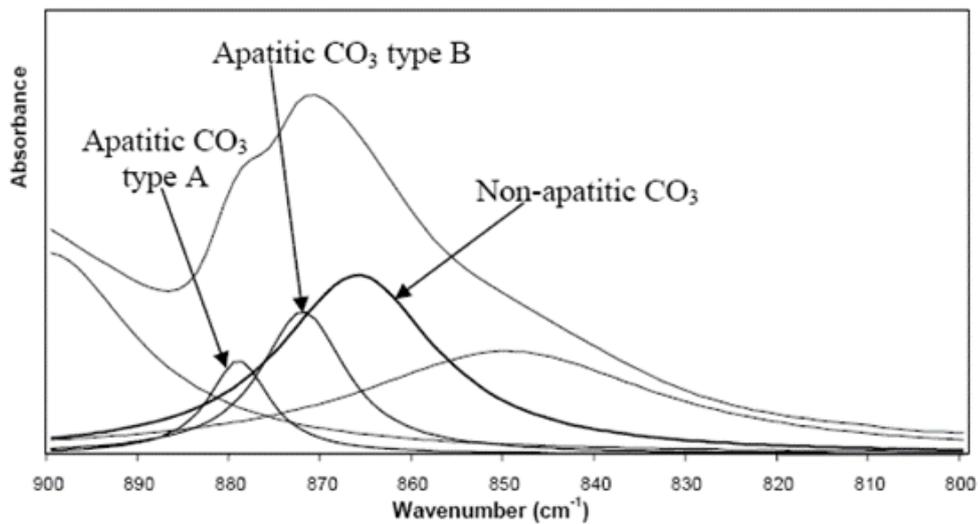


FIGURA 9. DECONVOLUCIÓN DE LAS CONTRIBUCIONES DE BANDAS FTIR EN LA REGIÓN DE LOS CARBONATOS. ADAPTADO DE REF.[75]

Los iones carbonatos en ambientes puros tipo A y tipo B presentan bandas de FTIR específicas (Tabla 12). Sin embargo, como en el caso de los grupos fosfatos, se encuentran bandas de vibraciones adicionales en apatitas biológicas y apatitas nanocristalinas sintetizadas a pH fisiológico, correspondientes a entornos no apatíticos de iones carbonatos (Figura 9) [75-78]. Una banda característica se observa en el dominio $\nu_2\text{CO}_3$ de IR y puede ser utilizado para la determinación de entornos de carbonatos no apatíticos.

Debido a que la mayoría de los estudios de caracterización de los materiales son en muestras secas, se han realizado estudios para muestras húmedas para determinar posibles alteraciones de los espectros (Figura 10).

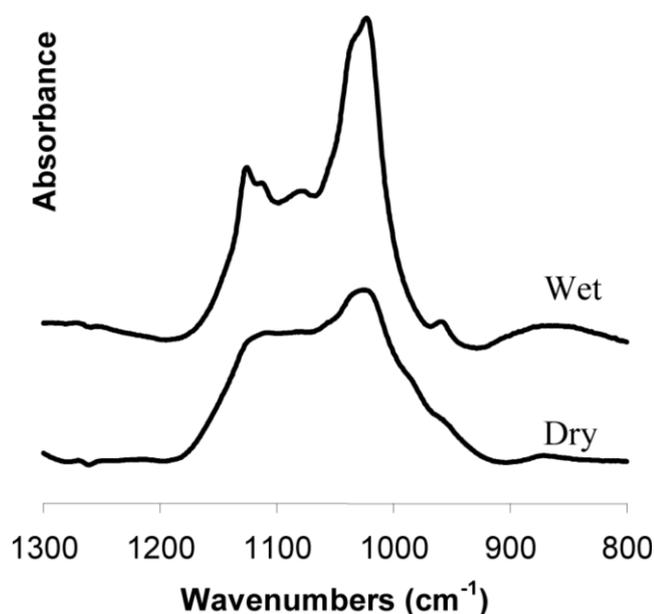


FIGURA 10. EFECTOS DE LA HUMEDAD EN LOS ENTORNOS IÓNICOS DEL GRUPO FOSFATO. ADAPTADO DE REF.[79]

Las apatitas nanocristalinas precipitadas en ambiente húmedo presentan cambios considerables en su espectro FTIR (Figura 10), con la presencia de bandas angostas que demuestran la existencia de una estructura de capa hidratada cuyas características son cercanas a los espectros observados para OCP. Después del secado, la estructura fina se pierde y se produce una considerable ampliación de la banda lo cual conduce a las características ya descritas como “entornos no apatíticos”.

La estructura de la capa hidratada parece ser muy sensible al contenido iónico de la superficie nanocristalina y se ha observado que es reversiblemente modificada durante la reacción de intercambio iónico. Algunas de las características de los cristales húmedos se resumen en la Tabla 13. Estas bandas características decrecen progresivamente durante la maduración de los cristales húmedos, confirmando el lento crecimiento de los dominios de apatitas a expensas de las capas hidratadas de las superficies [80].

TABLA 13. POSICIÓN DE LAS BANDAS DE FTIR PARA APATITAS PRECIPITADAS EN MEDIO HÚMEDO

Asignación	Posición de las Bandas (cm ⁻¹)
HPO ₄ (OH banda del plano)	1196
v ₃ HPO ₄	1137, 1127, 1110
v ₃ HPO ₄ , v ₃ PO ₄	1075
v ₃ PO ₄	1055
v ₃ PO ₄	1035
v ₃ PO ₄	1022
v ₁ HPO ₄	1000
v ₁ PO ₄	961
HPO ₄ (P-OH)	860

2.3.5. ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)

Las muestras de nanotubos de titanio se analizaron en su composición química por medidas de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Las medidas fueron realizadas en la Universidad de Málaga, España. Los resultados se compararon con los datos reportados en Tablas Internacionales (Tabla 14). Todas las posiciones espectrales fueron corregidas en referencia a la señal para el C 1s, que se consideró centrada en 284.8 eV.

TABLA 14. POSICIÓN DE LOS PICOS (ENERGÍA DE UNIÓN) CORRESPONDIENTE A LOS ELECTRONES ESCINDIDOS DE LOS ORBITALES INDICADOS.

Pico espectral	Especie superficial	Energía de unión (eV)
Ti 2p 3/2	Ti	453.71
	Ti ²⁺	455.97
	Ti ³⁺	456.41
	Ti ⁴⁺	458.42
Ti 2p 1/2	Ti	459.86
	Ti ²⁺	460.38
	Ti ³⁺	461.44
	Ti ⁴⁺	464.08
O 1s	O ²⁻	529.93
	OH ⁻	531.59
	H ₂ O	532.83

2.3.6. ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ELECTRONES (EDS)

Se realizaron medidas de espectroscopia de dispersión de electrones (EDS) de la superficie y de la profundidad de los nanotubos durante la observación en SEM. Para las muestras de las superficies nanoporosas de titanio, se realizaron medidas de EDS en las modalidades *Linescan*, *Mapping* y *Point & Shoot* con un voltaje de aceleración de 20 kV.

2.3.7. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Las medidas voltamperométricas se llevaron a cabo en un potenciostato Voltalab modelo PGZ301, Radiometer (Suiza) Voltalab modelo PGZ301, Radiometer (Suiza). Se empleó una celda de vidrio, empleando la superficie de nanotubos de titanio como electrodo de trabajo, una chapa de platino como contraelectrodo y un electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia. Todos los potenciales mencionados en este trabajo están referidos a este potencial de referencia. Como electrolito soporte se empleó NH_4SO_4 1 M y a la disolución se le eliminó el oxígeno disuelto por pasaje de una corriente de N_2 ultra puro durante 20 min, manteniéndose una atmósfera inerte durante las medidas. Los registros voltamperométricos se tomaron a velocidades de barrido entre $0.010 - 0.500 \text{ V s}^{-1}$ entre 0 V y -1.8 V.

Para las muestras de titanio modificados por OMA se emplearon las mismas condiciones con algunas diferencias: se usó como contraelectrodo una chapa de titanio 99.9 % (Goodfellow, UK) entre 0 V y -1.3 V a una velocidad de barrido de 0.100 V s^{-1} .

2.3.8. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

Las medidas de impedancia para las muestras con nanotubos de TiO_2 se tomaron en un potenciostato Voltalab modelo PGZ301, Radiometer (Suiza) en una disolución acuosa de Na_2SO_4 1 M, empleando una chapa de platino como contraelectrodo y un electrodo de calomel saturado como referencia. Se realizó un barrido de potencial desde 0 V a -1.3 V y un barrido de frecuencias entre 10 mHz y 10 kHz, con una amplitud de la señal de perturbación de 10 mV. Las medidas se llevaron a cabo a cada potencial luego de una potenciostatización de 2 min para llegar al equilibrio (medido por una velocidad nula de cambio de la corriente).

Las medidas para el caso de la superficie de titanio modificada por OMA se realizaron con el mismo equipamiento y en las mismas condiciones, pero usando una chapa de titanio como contraelectrodo.

Los registros de impedancia se hicieron bajo la forma de diagramas de Nyquist y de Bode. Los circuitos equivalentes fueron propuestos en base a la descripción física de la interface, y los ajustes de los datos experimentales a los mismos fueron realizados con el programa *Z-View*. El estadístico χ^2 fue tomado como criterio de aceptabilidad de los ajustes, de acuerdo con $\chi^2 < 10^{-5}$ excelente ajuste, $10^{-4} < \chi^2 < 10^{-5}$ muy buen ajuste y $10^{-4} < \chi^2 < 10^{-3}$ buen ajuste.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

Los resultados de la Tesis serán presentados de la siguiente manera. En primer lugar, los resultados relacionados con la evaluación de la interacción entre dos superficies con nanotopografías equivalentes (Sección 3.1) en el marco de la geometría fractal son presentados como prueba inicial de la influencia de la topografía a nivel nano como factor fundamental en los eventos de bioreconocimiento. Posteriormente se presentan los resultados de la preparación de los diferentes sustratos metálicos empleados (Sección 3.2), que incluye superficies metálicas que incluyen nanotopografías del tipo nanotubo (Sección 3.2.1) y superficies obtenidas por oxidación por micro arco (3.2.2), que ofrece porosidades homogéneamente dispersas en una superficie sin topografía nano. Finalmente se presentan los resultados de la síntesis y caracterización de las hidroxiapatitas (Sección 3.3), tanto con procedimientos *ex situ* (Sección 3.3.1.1) como *in situ* (Sección 3.3.1.2), para terminar con un estudio detallado de la incidencia de los ambientes apatíticos y no-apatíticos en la información que se puede sacar de los espectros FTIR y los estudios de XRD (Sección 3.3.2), que constituye uno de los aspectos fundamentales para contar con técnicas confiables de detección de nanoestructuras en este tipo de biomateriales.

3.1. INTERACCIÓN ENTRE SUPERFICIES CON NANOTOPOGRAFÍAS EQUIVALENTES

Para poder dar un primer indicio a favor de la Hipótesis de Trabajo propuesta, se puso en contacto una superficie de Au recubierta con una monocapa compacta de TBA (Au|TBA) con una solución acuosa conteniendo citocromo c. Ambas interfaces poseen una dimensión efectiva de superficie de 2.15 – 2.20 (proteína) y 2.17 – 2.18 (Au|TBA).

El proceso completo, que incluyó la fabricación *in situ* de la interfase Au|TBA, su estabilización, y la interacción con el citocromo c, se siguió a través del registro obtenido en la balanza de cuarzo (Figura 11). Luego de estabilizar la señal piezoeléctrica para el electrodo de oro en la celda conteniendo 300 μL de agua, se agregaron 50 μL de una solución acuosa de 0.15 M TBA, produciendo un cambio en la frecuencia de resonancia que corresponde a un aumento neto en la densidad de masa de 236 ng cm^{-2} luego de 50 min. La solución de TBA remanente se cambió *in situ* con una pipeta Pasteur, y el electrodo (Au|TBA) se lavó 10 veces con porciones de 300 μL de agua. No se detectaron cambios apreciables en el perfil de frecuencias. A la nueva interface formada, en una celda conteniendo 300 μL de agua, se agregó 50 μL de una solución acuosa de citocromo c de concentración 1 mM, para dar una concentración final de 140 μM . Luego de la estabilización de la señal, con un aumento neto de densidad superficial de masa de 852 ng cm^{-2} , se lavó el sistema 10 veces con porciones de 300 μL de agua, y se obtuvo una densidad superficial de masa de 557 ng cm^{-2} . Esta diferencia es debida a la eliminación de la superficie de moléculas de proteína débilmente adsorbidas.

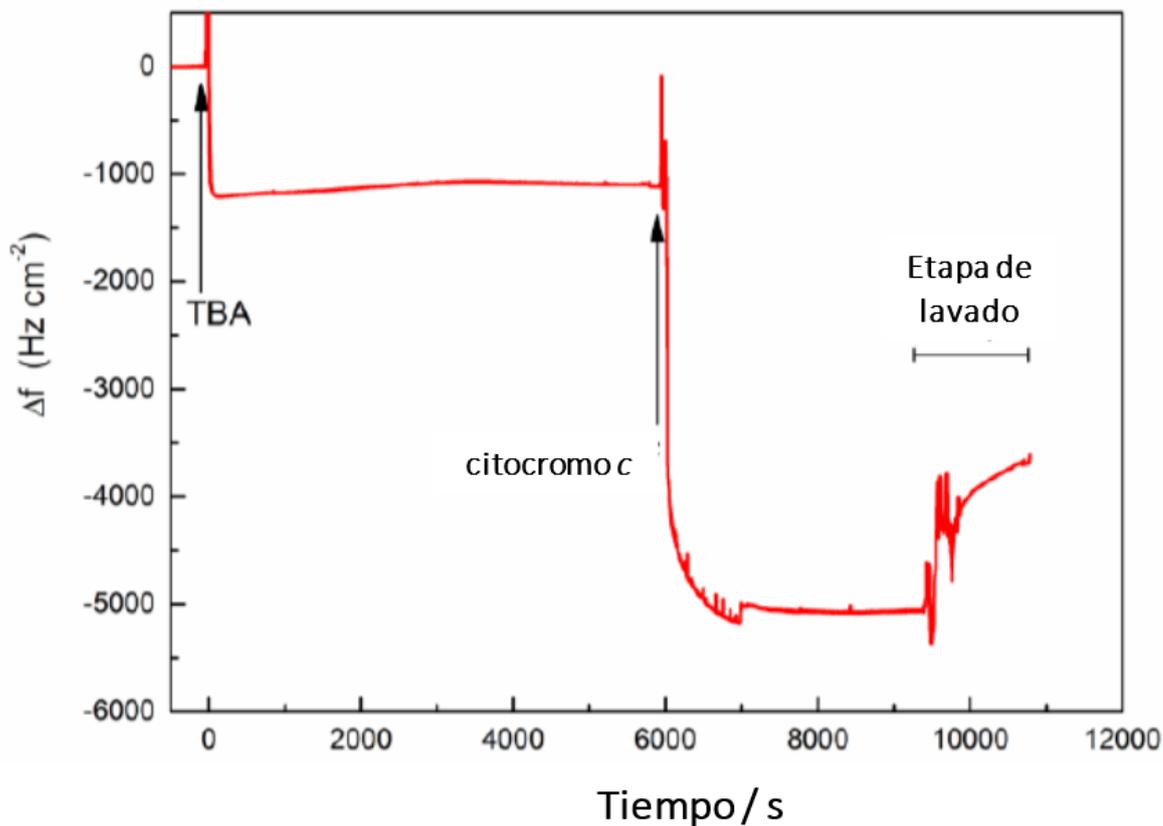


FIGURA 11. PERFIL OBTENIDO EN LA BALANZA DE CUARZO ELECTROQUÍMICA QUE DESCRIBE EL PROCESO DE FORMACIÓN ESPONTÁNEA Y SUCESIVA DE UNA MONOCAPA DE TBA SOBRE UN ELECTRODO DE ORO, SEGUIDO POR LA ADSORCIÓN DEL CITOCROMO C, Y FINALIZADO CON EL LAVADO DE LOS RESIDUOS FISISORBIDOS. LA FRECUENCIA DE VIBRACIÓN DEL PIEZOELÉCTRICO SE LE ASIGNÓ ARBITRARIAMENTE EL VALOR 0 (ANEXO A1.5)

El valor de densidad de masa obtenido corresponde a una concentración superficial de 30 pmol cm^{-2} . Para conocer el grado de recubrimiento superficial obtenido, se calculó la máxima concentración superficial teórica que se puede obtener a partir del citocromo c: dado los valores de dimensión euclidiana para el citocromo c, $25 \times 25 \times 37 \text{ \AA}$, la máxima concentración superficial para la formación de una monocapa de citocromo c sería 27 pmol cm^{-2} . De esta manera, el valor experimental obtenido para la interface Au|TBA|citocromo c de concentración superficial del citocromo c luego de los lavados indica la formación de una capa altamente compacta.

Dado que el citocromo c es una proteína electroactiva, es posible estudiar su comportamiento electroquímico en el estado adsorbido, y obtener datos relevantes para conocer el estado de actividad de la misma, o más precisamente, de preservación de su actividad. Es sabido que la adsorción de proteínas electroactivas sobre electrodos metálicos da lugar a su desnaturalización, y la preservación de sus propiedades una vez adsorbido es uno de los objetivos más buscados en el campo de la fabricación de biosensores. El estudio de las propiedades electroquímicas de la monocapa de citocromo c adsorbida se estudió por voltamperometría cíclica variando la velocidad de barrido entre 0.07 y 0.11 V s^{-1} en *buffer* acetato (pH 4.6). Los resultados se muestran como pseudocapacitancias (corriente / velocidad de barrido), ya que se espera que las curvas de pseudocapacitancia no varíen cuando el proceso de

transferencia de carga para un sistema electroquímico adsorbido es de tipo reversible. Los resultados (Figura 12) demuestran que, dentro de los errores experimentales, esto fue así.

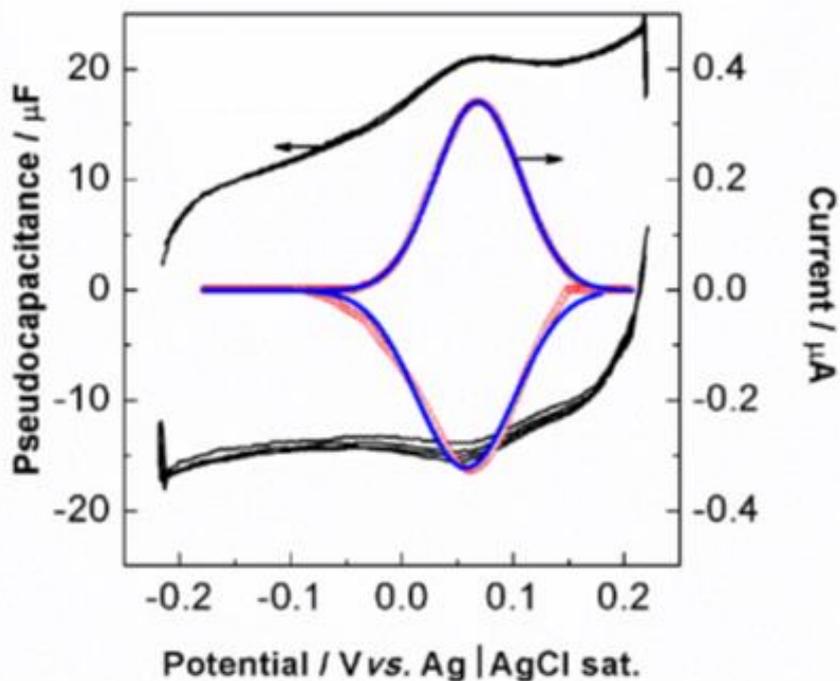


FIGURA 12. CURVA DE PSEUDOCAPACITANCIA PARA EL CITOCROMO C ADSORBIDO SOBRE UN ELECTRODO DE AU|TBA EN BUFFER ACETATO 10 MM EN EL RANGO DE VELOCIDADES DE BARRIDO ENTRE $0.07 - 0.11 \text{ V s}^{-1}$ (TRAZOS NEGROS). EN ROJO SE MUESTRA LA CURVA EXPERIMENTAL OBTENIDA A 0.11 V s^{-1} LUEGO DE LA CORRECCIÓN DE LA LÍNEA DE BASE, Y EN AZUL EL AJUSTE GAUSSIANO PARA EL PROCESO ANÓDICO Y CATÓDICO.

A partir de estos registros es posible obtener varios datos de interés para caracterizar el sistema, que se resumen en la Tabla 15.

TABLA 15. PARÁMETROS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS PROCESOS FARADAICOS DEL CITOCROMO C ADSORBIDO SOBRE UNA SUPERFICIE DE AU|TBA.

Parámetro*	Proceso anódico	Proceso catódico
Potencial de pico ($V_{\text{Ag AgCl}}$)	0.068	0.063
Densidad de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	3.23	3.32
WHM (V)	90	103
Densidad de carga ($\mu\text{C cm}^{-2}$)	2.9	3.0
Concentración superficial (pmol cm^{-2})	30	31

* Para los cálculos se emplearon los datos correspondientes al registro a 0.11 V s^{-1} , para disminuir los errores.

En primer lugar, cabe destacar que las concentraciones superficiales medidas tanto a través del proceso anódico como catódico son similares entre sí y con la obtenida por un método completamente independiente, como las medidas con balanza de cuarzo. Esto refuerza la idea que se ha formado una monocapa muy compacta sobre la superficie. Pero más importante aún es que la monocapa formada es electroactiva en su totalidad, indicando que la interacción no sólo favorece la adsorción de la máxima cantidad posible de proteína, sino que además preserva su estructura tridimensional activa.

Otro aspecto a destacar es que el proceso anódico muestra un valor de WHM esperable para un proceso de intercambio de 1 e, sin la existencia de interacciones laterales entre las proteínas adsorbidas. Este valor teórico se corresponde a un proceso de adsorción langmuiriano. Por su parte, el proceso catódico muestra una ligera desviación al comportamiento langmuiriano teórico, lo que sugiere que la forma oxidada de la proteína puede dar algún tipo de interacción lateral entre ellas. No se ahondó más en este aspecto.

Finalmente, el potencial redox estándar para el citocromo c, obtenido a partir del promedio de los potenciales de pico, da un valor de $E^{\circ} = 0.066 \text{ V}_{\text{Ag}|\text{AgCl}}$ (pH 4.6, $T = 293 \text{ K}$), que se compara con el valor reportado para la proteína en solución de $0.068 \text{ V}_{\text{Ag}|\text{AgCl}}$ (pH 7, $T = 293 \text{ K}$) [81]. Este resultado es también indicativo de la formación de una especie adsorbida que preserva todas las características del citocromo c original.

En suma, los experimentos realizados demuestran que cuando se deja interaccionar dos interfaces que poseen dimensiones superficiales similares dadas por rugosidades en el nivel nano, se maximiza el proceso de interacción, verificado a través no solo de la cantidad de proteína adsorbida, sino además en la preservación de las propiedades de las entidades interaccionantes.

3.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO

En la literatura se encuentran diferentes modificaciones de la superficie de titanio para su uso como sustituto del tejido óseo. En particular en el presente trabajo se estudiaron tres materiales de titanio puro como base del implante, a los que se les modificó sus superficies por dos métodos: anodización electroquímica y oxidación por micro arco. Los resultados fueron comparados con una chapa de titanio puro, sin modificaciones más allá de la oxidación natural de su superficie.

3.2.1. NANOTUBOS DE TiO_2

Las chapas de titanio puro fueron sometidas a diferentes condiciones de voltaje y tiempo de anodizado, dejando todas las otras variables constantes (composición del electrolito, temperatura, etc.). En una primera instancia, se varió el potencial de anodizado manteniendo el tiempo constante en 210 min. Durante el procedimiento se registraron las curvas cronoamperométricas (Figura 13), en las que se observan transitorios de corriente positivos, por lo que se relacionan con el proceso de oxidación de la superficie.

Los transitorios de corriente pueden dividirse en cuatro regiones [82]: i) inicialmente se observa un aumento brusco en la conductividad de la superficie para todos los voltajes con un descenso a los pocos segundos de la densidad de corriente; ii) posteriormente una zona en la que se observa un aumento gradual de la conductividad producto de cambios en las propiedades conductoras de la superficie; iii) ese aumento se mantiene con ciertas variaciones en esta etapa de la síntesis de nanotubos y finalmente en

la etapa iv) se observa una estabilización de la superficie representada por la estabilización de la densidad de corriente con el tiempo.

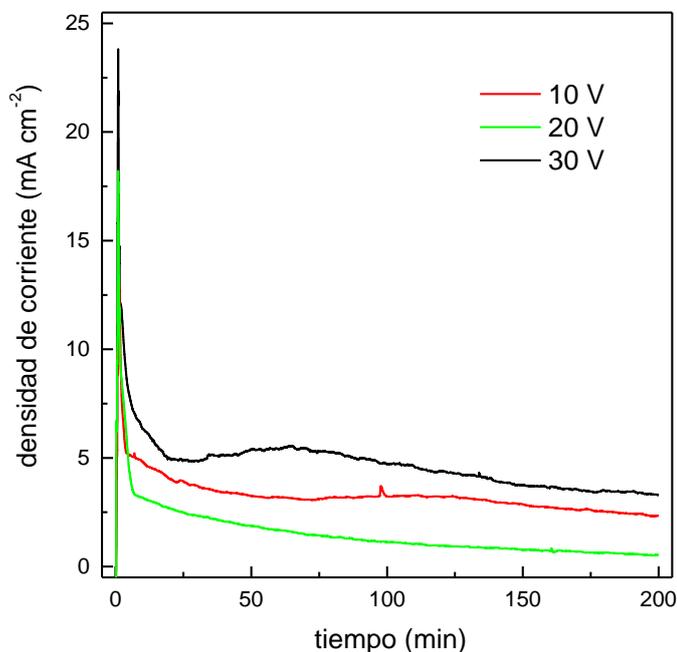


FIGURA 13. CURVAS CRONOAMPEROMÉTRICAS REGISTRADA DURANTE LA SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE TITANIO A DIFERENTES VOLTAJES. ELECTROLITO SOPORTE: 0.27 M NH₄F EN GLICEROL/AGUA 50:50. AREA DEL ELECTRODO 0.8 CM².

Cabe notar que sólo para el voltaje de 20 V no se observa el aumento y posterior disminución de corriente observado para 10 V y 30 V, con máximos a ca. 120 y 70 min, respectivamente. Esto sugiere la existencia de un proceso adicional que se verifica a 10 y 30 V, pero que no ocurre a 20 V.

3.2.1.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La morfología y la estructura de los nanotubos de titanio generados por anodización de las superficies lisas fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido, SEM. Se tomaron imágenes de la superficie y de la sección transversal para los diferentes voltajes y tiempos de anodizado ensayados. Las observaciones de la sección transversal se realizaron en muestras cortadas mecánicamente.

A 10 V se observa una estructura generada por un tratamiento abrasivo (Figura 14). En la superficie se distinguen perforaciones nanométricas irregulares, similares a la observada en metales luego de un proceso corrosivo. El examen de esta micrografía no permite observar la existencia de ninguna estructura nanotubular, en ninguna de las direcciones (perpendicular o paralelo a la superficie).

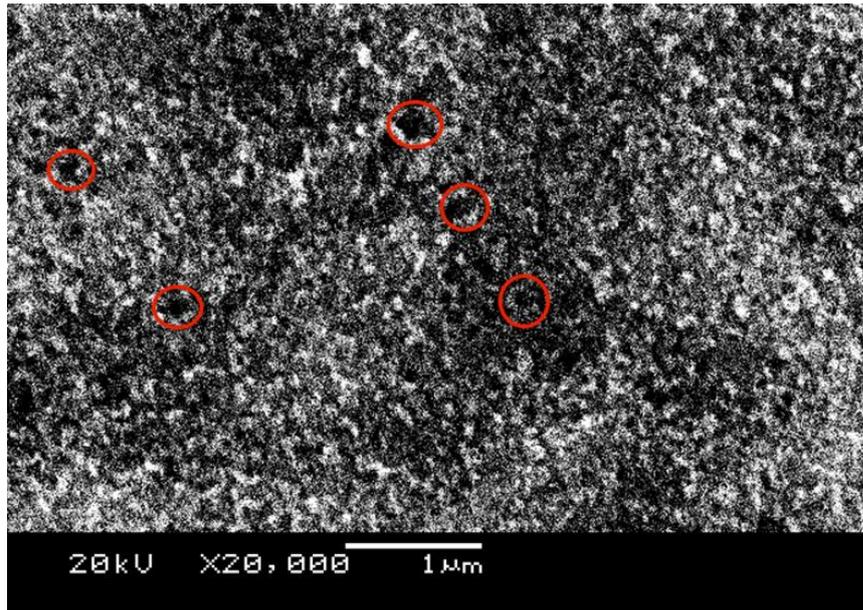


FIGURA 14. SUPERFICIE GENERADA A 10 V DONDE SE IDENTIFICAN (CÍRCULOS ROJOS) PERFORACIONES EN FORMA DE POROS EN LA SUPERFICIE. TIEMPO DE ANODIZADO: 3.5 HS.

A 30 V se generó un recubrimiento esponjoso homogéneo que presenta algunos agujeros de diámetro ca. 1 μm donde se distingue otra estructura debajo en forma de anillos, posiblemente nanotubos dispuestos en forma perpendicular a la superficie (

FIGURA 15).

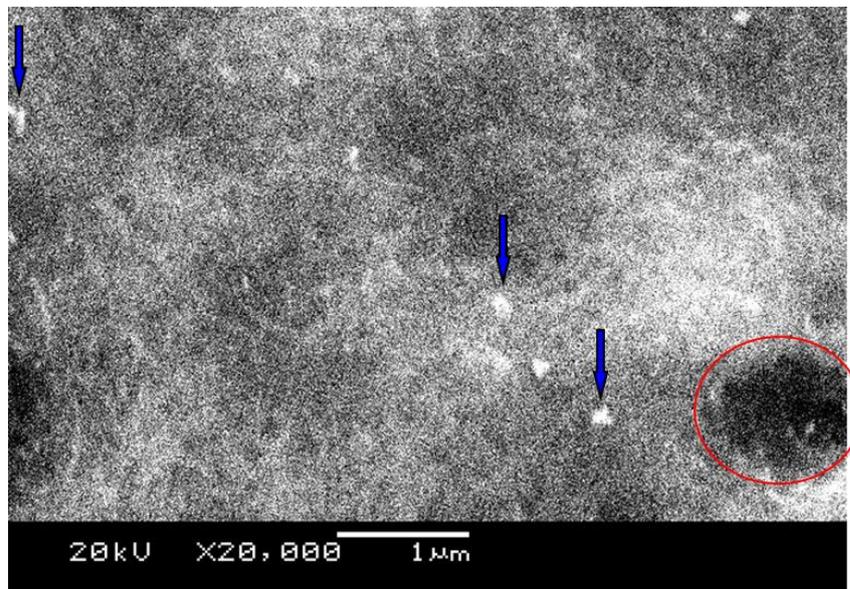


FIGURA 15. SUPERFICIE GENERADA A 30V DONDE SE IDENTIFICAN AGUJEROS CON APARENTE ESTRUCTURA EN ANILLOS DEBAJO (CÍRCULOS ROJOS). LAS FLECHAS AZULES INDICAN PEQUEÑOS TROZOS DE MATERIAL DEPOSITADO EN LA SUPERFICIE ESPONJOSA. TIEMPO DE ANODIZADO: 3.5 HS.

Asimismo, se observan trozos nanométricos de material depositado sobre la superficie esponjosa (flechas azules). La magnificación y resolución del equipamiento utilizado, no permite distinguir entre ambas estructuras, pero sí es notoria la diferente conductividad de ambos materiales, ya que las partículas depositadas sobre la superficie muestran una tonalidad blanquecina que denota su baja conductividad eléctrica. Cabe resaltar también que, asumiendo que la estructura nanotubular subyacente a la capa esponjosa se encuentra cubriendo toda la superficie, la capa esponjosa no permite distinguir esas estructuras, es decir, no sigue algún patrón definido por la capa subyacente, sino que parece formarse en forma homogénea sobre la superficie.

En las imágenes correspondientes al anodizado a 20 V se observan una capa de aparentes nanotubos de diámetro irregular distribuidos homogéneamente en la superficie de la lámina de titanio (FIGURA 16).

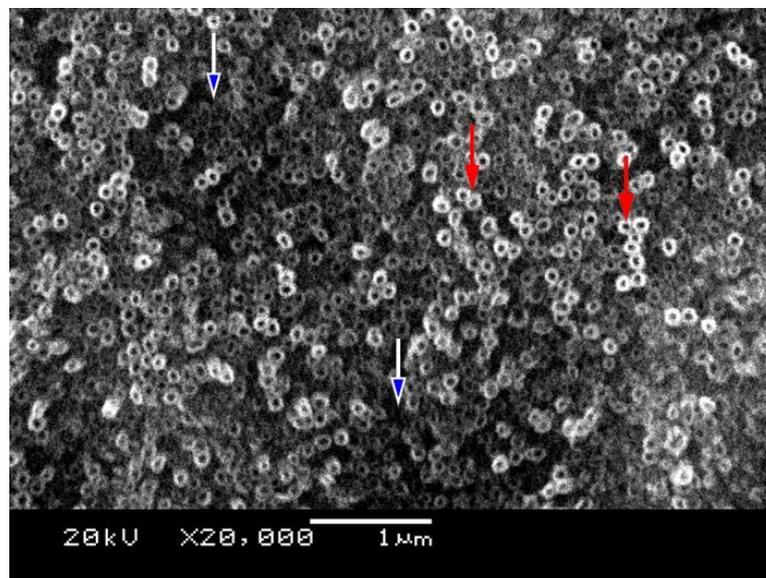


FIGURA 16. SUPERFICIE GENERADA A 20V POR ANODIZACIÓN ELECTROQUÍMICA. SE OBSERVAN ESTRUCTURAS DE DIFERENTES ALTURAS (MENOR ALTURA-FLECHAS AZULES; MAYOR ALTURA FLECHAS ROJAS). TIEMPO DE ANODIZADO: 3.5 HS.

La micrografía muestra una estructura en forma de anillos ovalados que se corresponden con la vista superior de los nanotubos que se encuentran dispuestos en una orientación perpendicular a la superficie. Los nanotubos presentan una pared de menor tamaño que la luz, y se distinguen diferentes alturas, de acuerdo con las tonalidades de gris obtenidas: las más brillantes corresponden a estructuras más altas (flechas rojas) y las figuras más opacas a estructuras a una altura menor (flechas azules).

A efectos de determinar si efectivamente las estructuras observadas se correspondían a nanotubos, se obtuvieron micrografías de la sección transversal de las muestras (Figura 17). Se puede observar que efectivamente se trata de nanotubos. A la vez se observa una panorámica de la superficie donde queda claro que no es perfectamente plana, sino que muestra suaves valles y crestas, lo que da cuenta de la diversidad de alturas descritas previamente. La altura aproximada de los nanotubos es 1 μm .

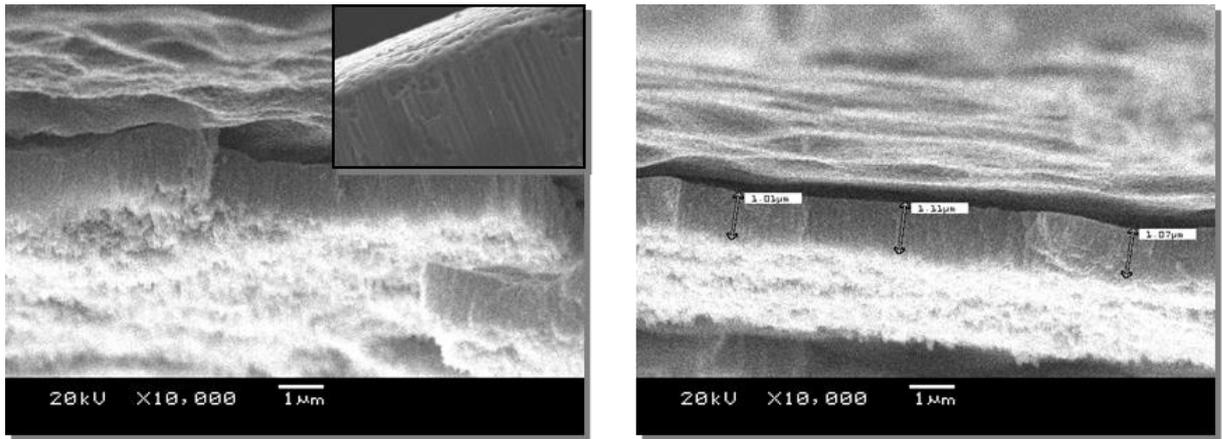


FIGURA 17. IMÁGENES SEM DE SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA CAPA DE NANOTUBOS GENERADA A 20 V DURANTE 3.5 HS.

Para determinar la dependencia del tiempo de anodizado con el diámetro y grosor de la pared interna de los nanotubos, se tomaron imágenes SEM de muestras anodizadas durante 3.5, 5 y 7 hs (Figura 18). Los resultados muestran que no se observan diferencias en la morfología de los nanotubos para los diferentes tiempos de anodización ensayados.

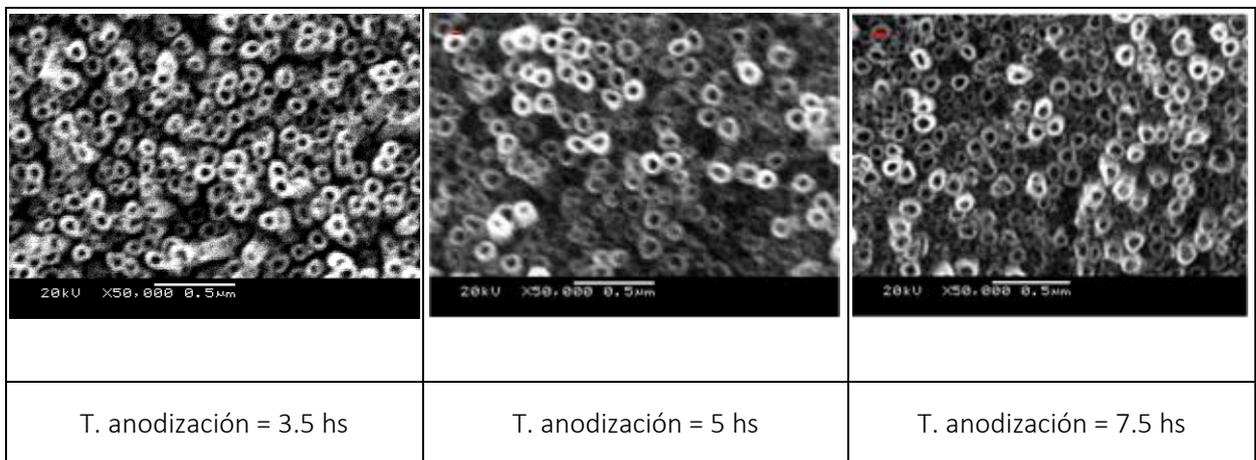


FIGURA 18. EFECTO DEL TIEMPO DE ANODIZACIÓN A 20 V EN LA MORFOLOGÍA DE LOS NANOTUBOS DE TITANIO

Las medidas de los diámetros internos y externos variaron entre 50 – 60 nm y 100 – 115 nm, respectivamente, lo que da un valor medio para el grosor de las paredes de ca. 25 nm. Estas medidas se hicieron a diferentes resoluciones del equipo SEM, y resultaron concordantes entre sí (Figura 19).

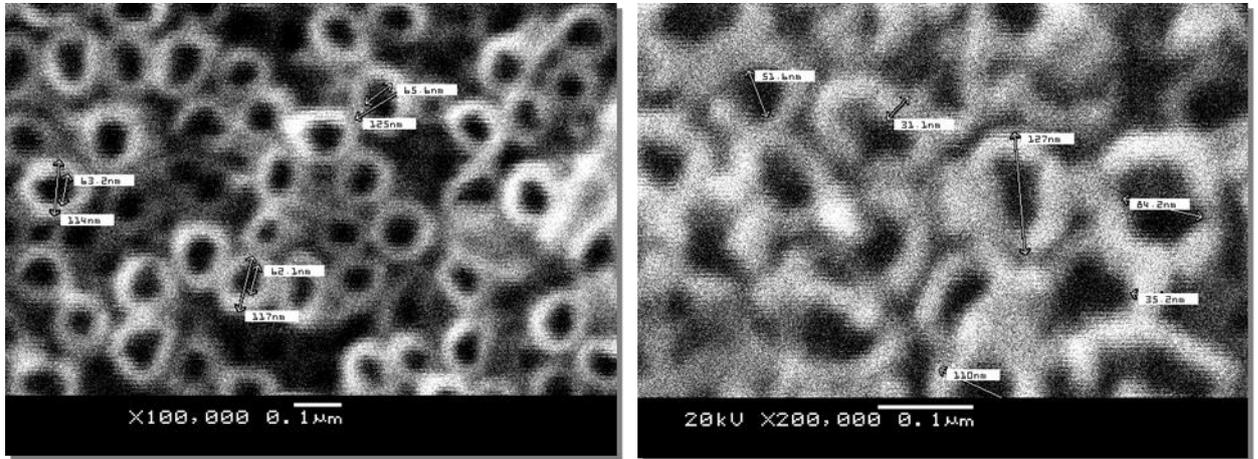


FIGURA 19. DIÁMETRO INTERNO Y EXTERNO DE LOS NANOTUBOS MEDIDOS A TRAVÉS DE LAS MICROGRAFÍAS SEM

La microscopía AFM aporta una resolución tridimensional de la superficie de los nanotubos (Figura 20), además de permitir confirmar las medidas morfológicas hechas con el SEM. El estudio fue realizado en la Universidad de Málaga (España).

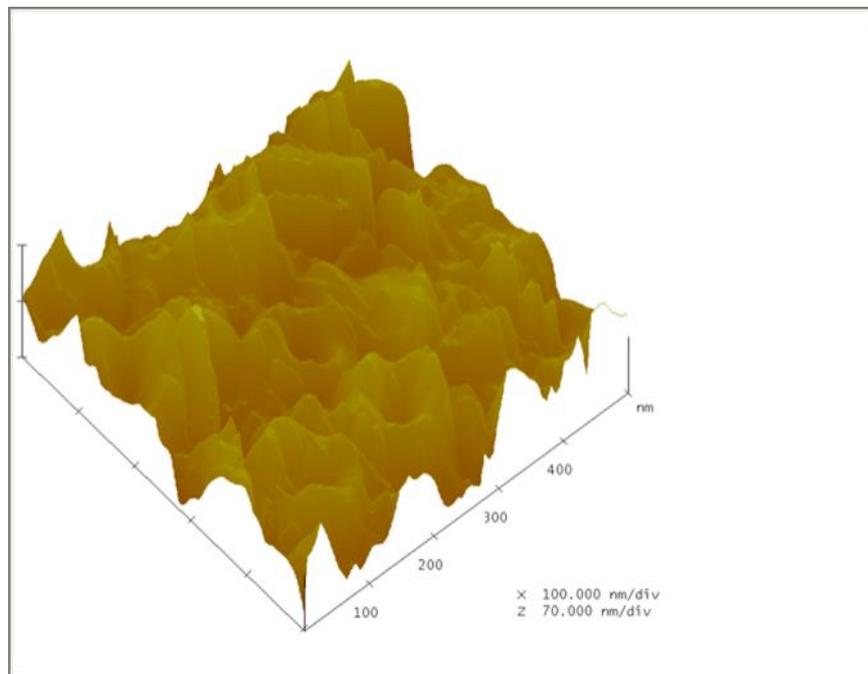


FIGURA 20. IMAGEN OBTENIDA POR AFM DE LA SUPERFICIE DE NANOTUBOS DE TITANIO.

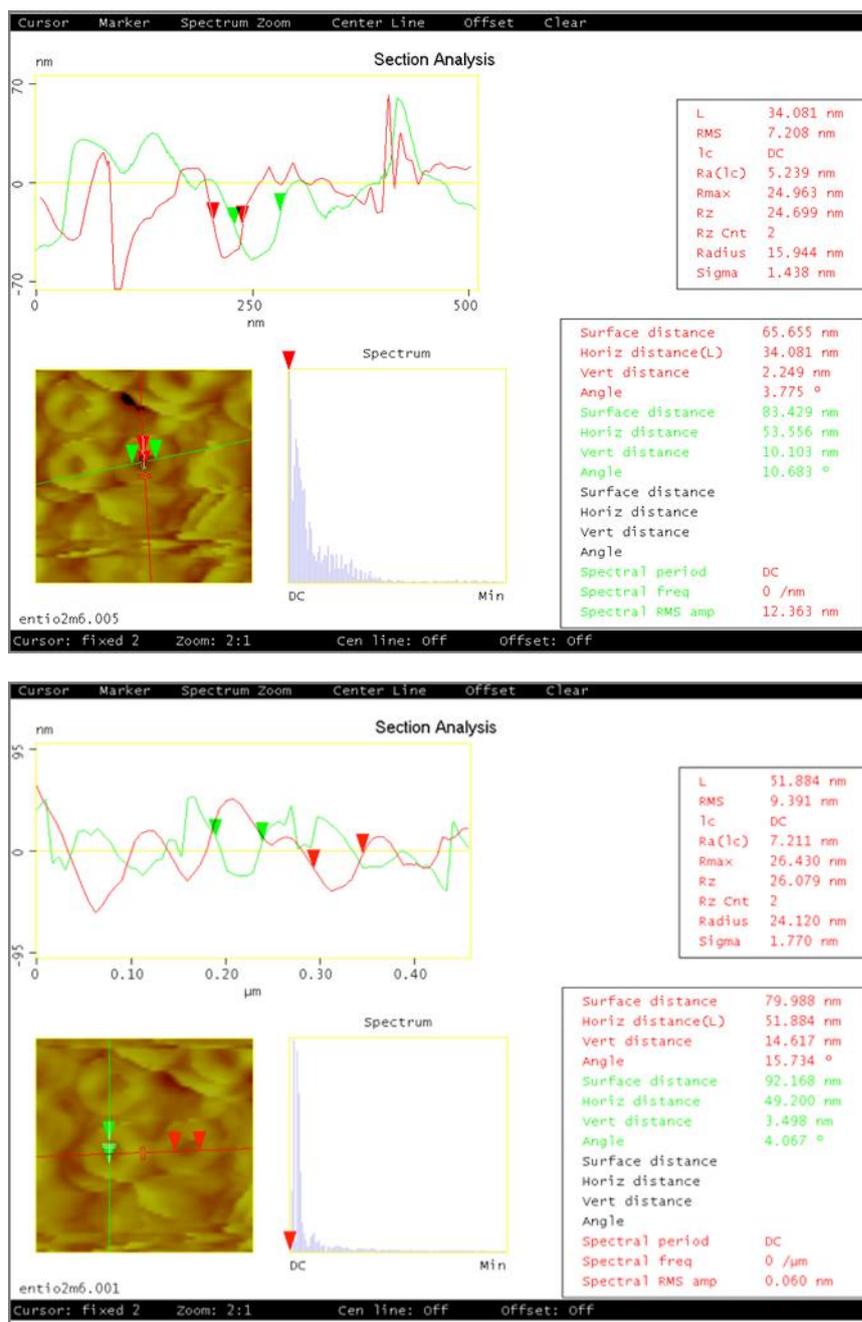


FIGURA 21. ANALISIS TOPOGRÁFICOS DE SECCIONES DE SUPERFICIE DE NANOTUBOS DE TITANIO.

Los perfiles topográficos confirman el alto grado de compactación de los nanotubos obtenidos. Por otra parte, confirman que, entre los nanotubos, no quedó material remanente de la superficie original, sino que la misma fue socavada hasta llegar a la base del nanotubo. Las dimensiones para los diámetros interno y externo se encuentran dentro del rango de valores obtenidos por SEM: 49 nm para el eje x y 54 nm para el eje y, lo que permite describir a los nanotubos como cilindros ligeramente deformados.

3.2.1.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Con el objetivo de determinar si efectivamente las modificaciones de la superficie de las láminas de titanio correspondían a nanotubos de dióxido de titanio bajo la composición química TiO_2 es que se procedió a analizar la misma mediante las técnicas XPS y EDS.

ESPECTROSCOPÍA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS).

Este análisis permite estudiar la composición química de la superficie, de manera de establecer inequívocamente la presencia de óxido de titanio, así como la posibilidad de distinguir la naturaleza del óxido formado.

Se analizaron muestras de superficies modificadas con nanotubos de titanio a la que se le aplicó una sucesión de tratamientos para su limpieza: calentamiento a vacío a 400 °C durante 1 h y bombardeo durante 1 min con iones Ar^+ con una energía de 4 keV.

Las principales señales obtenidas en cada una de las etapas del análisis corresponden al Ti 2p y al O 1s (Tabla 16). La posición de las señales se mueve marginalmente, lo que permite concluir que el producto final analizado (superficie limpia de nanotubos) no fue modificado durante el proceso de limpieza. En particular, las señales deconvolucionadas para el Ti 2p arrojaron las contribuciones Ti 2p 3/2 a 459.15 eV y Ti 2p 1/2 centrada a 464.6 eV. Ambas señales coinciden con las energías de unión de electrones escindidos del ion Ti^{4+} . Adicionalmente, la señal para el O 1s en 530.7 eV coincide razonablemente bien con la señal para el O^{2-} , lo que en conjunto permite concluir que los nanotubos de titanio están formados por TiO_2 .

TABLA 16. LOCALIZACIÓN DE LAS SEÑALES DE XPS PARA LAS SUPERFICIES ANALIZADAS

Muestra	C1s	N1s	O1s	F1s	Si2p	Ti2p
original	284.8	399.8	530.1	684.5	101.8	458.6
tratada a 400 °C	284.8	399.8	530.3	684.6	101.95	458.65
4 keV Ar^+	284.8	397.0	530.7	685.2	102.5	459.15

La técnica de XPS es muy sensible a la presencia de impurezas en la muestra, como lo indica la presencia de un 35.5 % de átomos de C (Tabla 17), probablemente correspondiente a impurezas orgánicas. Las mismas no son eliminadas por el tratamiento térmico a 400 °C a vacío. Sin embargo, el bombardeo de la superficie con plasma ionizado de argón de 4 keV de energía produce una drástica disminución de la presencia de carbono.

TABLA 17. CONCENTRACIÓN (ÁTOMOS %) DE LAS MUESTRAS DE NANOTUBOS DE TITANO LUEGO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS PARA LA LIMPIEZA DE LA SUPERFICIE.

Muestra	C1s	N1s	O1s	F1s	Si2p	Ti2p
original	35.53	0.71	43.10	2.55	0.56	17.55
tratada a 400 °C	33.46	0.50	44.81	2.09	0.58	18.56
4 keV Ar ⁺	5.73	1.05	58.51	5.56	0.22	28.93

Cabe notar que como se trata de resultados porcentuales, la mera eliminación del carbono de la superficie es responsable del cambio de los porcentajes relativos de los restantes componentes. Entre éstos, además del titanio y el oxígeno, también están presentes el flúor y el nitrógeno, provenientes del NH₄F empleado durante la síntesis.

Los valores relativos de átomos de Ti y O luego de la limpieza completa, 28.93 : 58.51 corresponde a la relación simplificada 1:2.02 que es próxima a la relación teórica 1:2 para el TiO₂, lo que confirma al TiO₂ como producto de la síntesis de los nanotubos de titanio.

ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ELECTRONES (EDS)

Esta técnica permite obtener información de la composición química de regiones seleccionadas de la superficie a través de la microscopía SEM. Para continuar aportando evidencia acerca de la composición química de las nanoestructuras, fue posible obtener información en forma separada de la composición química de las paredes (Figura 22) y de la base de los nanotubos (Figura 23).

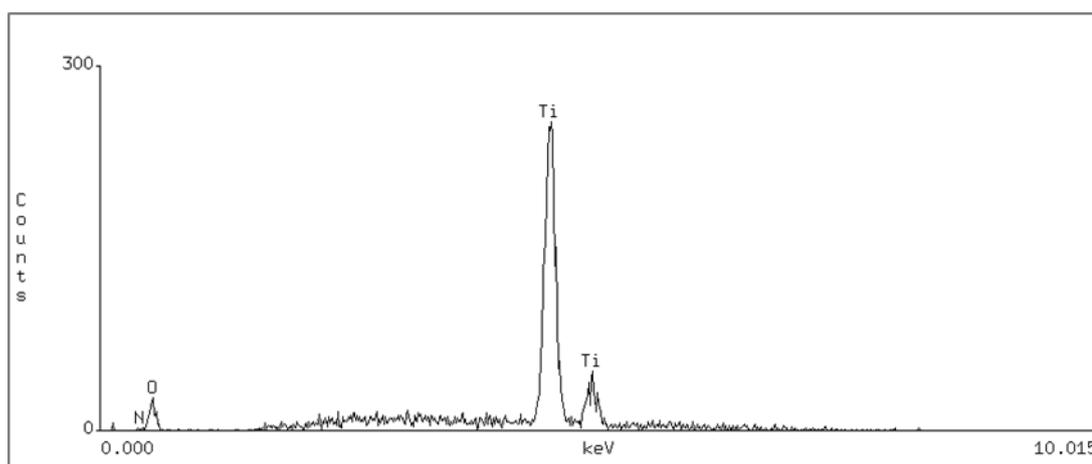


FIGURA 22. ESPECTRO DE DISPERSIÓN DE RAYOS X PARA LOS ELECTRONES DEL NIVEL K DE UNA SECCIÓN DE LAS PAREDES DE LOS NANOTUBOS.

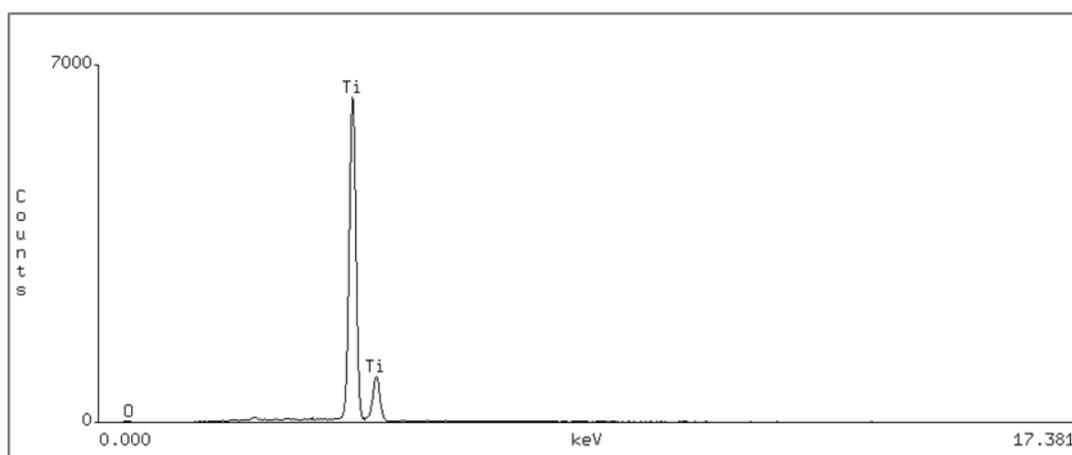


FIGURA 23. ESPECTRO DE DISPERSIÓN DE RAYOS X PARA LOS ELECTRONES DEL NIVEL K DE UNA SECCIÓN DE LA BASE DE LOS NANOTUBOS.

Como se esperaba, y en acuerdo con los resultados de XPS, las paredes de los nanotubos presentaron señales correspondientes a la presencia principal de Ti y O, junto con otros elementos minoritarios, en proporciones atómicas Ti : O de 56:41 át. %. Nótese que en este caso la valoración de los porcentajes atómicos es diferente a la obtenida por XPS, una técnica más precisa. Además, debe tenerse en cuenta que el equipo de EDS no es bueno en la evaluación cuantitativa de los elementos más livianos. Por lo tanto, los resultados obtenidos deben ser evaluados sólo cualitativamente.

La evaluación de la base de los nanotubos de titanio dio como resultado un perfil de EDS diferente al obtenido para las paredes. En este caso se observa la presencia casi exclusiva de titanio. De esta manera, quedó evidenciado, a nivel cualitativo, que la composición química de las paredes y de la base es diferente, y que el proceso de formación de los nanotubos implica una oxidación a medida que se va socavando la superficie de titanio.

3.2.1.3. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

A los efectos de estudiar las propiedades fisicoquímicas de las muestras se realizaron estudios de caracterización de la superficie anodizada mediante las técnicas de difracción de rayos X (XRD), ángulo de contacto (CA) y voltamperometría cíclica (CV).

ESTRUCTURA CRISTALINA POR XRD

Las medidas de XRD permiten determinar la estructura cristalina de acuerdo a la orientación preferencial de los planos cristalinos de la estructura generada. Este análisis demostró que las muestras obtenidas antes del tratamiento térmico contenían TiO_2 amorfo, el cual se tornó cristalino luego de ese tratamiento (Figura 24). Luego del tratamiento térmico, aparecen los picos típicos de la anatasa: 25.3° (101), 48.1° (200). Con intensidades más bajas se observan los picos del rutilo: 27.4° (110), 36.1° (101) y 54.3° (201). Debido a que se utilizó la técnica convencional y no la modalidad rasante, en los difractogramas también

se observan los picos del Ti por ser el componente principal de la base del material. En suma, este análisis revela la formación de anatasa como principal forma cristalina de los nanotubos de TiO_2 .

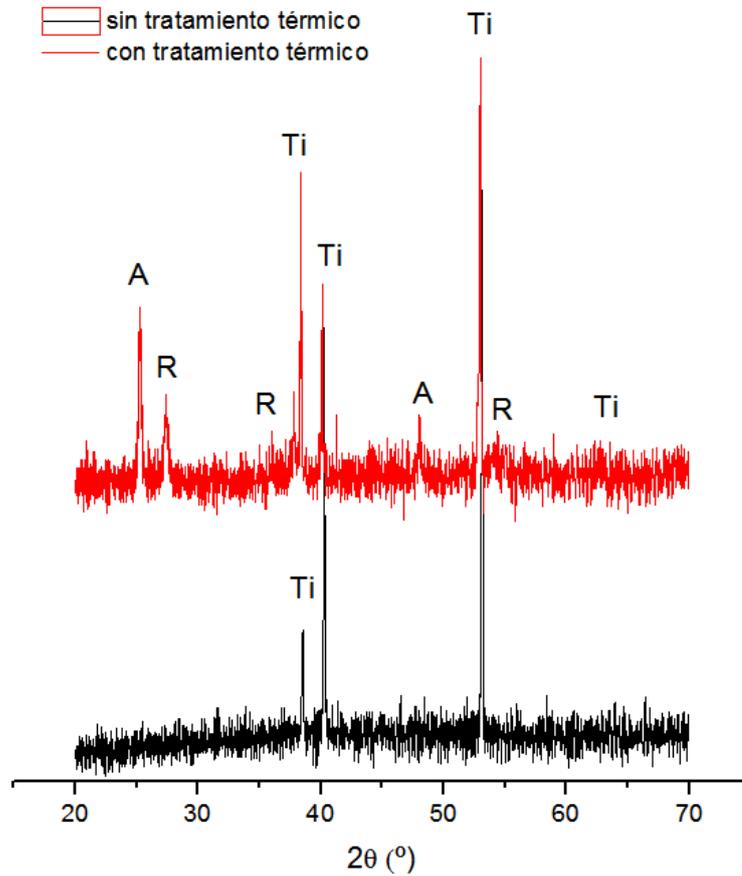


FIGURA 24. DIFRACTOGRAMAS XRD PARA LAS SUPERFICIES DE NANOTUBOS DE TITANIO OBTENIDAS POR ANODIZADO A 20 V, ANTES (NEGRO) Y DESPUÉS (ROJO) DEL TRATAMIENTO TÉRMICO A 550 °C – 600 °C DURANTE 3 HS. A = ANATASA, R = RUTILO.

PROPIEDADES DE MOJABILIDAD DE LA SUPERFICIE

La caracterización del comportamiento de mojabilidad de las superficies de titanio modificadas con nanotubos fue llevada a cabo a través de medidas de ángulo de contacto en condiciones de equilibrio termodinámico a humedad ambiente 100 %, de las muestras anodizadas a los tres voltajes estudiados (10, 20 y 30 V). Los resultados demuestran que las propiedades de mojabilidad de la superficie modificada, cambian con el voltaje aplicado, variando desde 72° para 30 V a un ángulo de 128° para el anodizado a 20 V (Tabla 18).



FIGURA 25. IMÁGENES DE LA GOTA DE AGUA SOBRE LAS SUPERFICIES ANODIZADAS A LOS DIFERENTES VOLTAJES

TABLA 18. MEDIDAS DE ÁNGULO DE CONTACTO DIFERENTES VOLTAJES DE ANODIZADO

VOLTAJE (V)	ÁNGULO DE CONTACTO (°)
10	117 ± 1
20	128 ± 1
30	72 ± 1

La influencia del voltaje de anodizado es importante, ya que se puede obtener una superficie hidrofílica anodizando a 30 V, o hidrofóbica a 10 V, y en el límite de superhidrofobicidad para un anodizado a 20 V. Comparando estos resultados con las imágenes obtenidas por SEM, se puede determinar que una superficie nanoestructurada bien definida, como la obtenida para un anodizado de 20 V, genera una superficie en el límite de la superhidrofobicidad, por lo que se deduce que la superficie generada por anodizado a 30 V no presentaría esta característica de nanoestructuración. De hecho, esta última superficie es la que presenta un recubrimiento sobre los nanotubos, ocultando de esta manera los detalles de nanoestructuración. Vale la pena destacar que estas medidas fueron repetidas 2 meses después, manteniéndose los valores originales de ángulo de contacto.

VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA (CV)

Las voltamperometrías cíclicas se llevaron a cabo sobre electrodos de titanio puro modificados con nanotubos a diferentes velocidades de barrido para determinar la naturaleza (difusional o de adsorción) de las corrientes observadas. A medida que aumenta la velocidad de barrido, se distinguen dos procesos anódicos centrados en *ca.* -1.2 V_{calomel} y -0.7 V_{calomel} , y un proceso catódico centrado en *ca.* -1.3 V_{calomel} (Figura 26).

La segunda contribución anódica sólo es notoria a muy altas velocidades de barrido de potencial, lo que indica que se trata de un proceso de oxidación rápido. Cabe notar también que para potenciales positivos se observa una doble capa de muy baja capacidad, lo que indica que la nueva fase superficial que se forma posee una conductividad muy diferente de la que corresponde al titanio no oxidado.

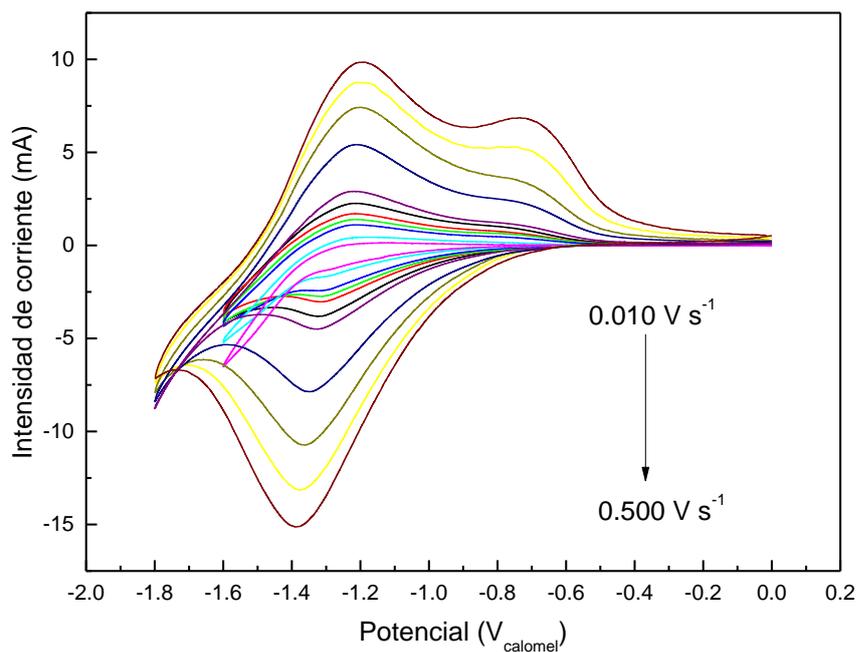


FIGURA 26. VOLTAMPEROMETRÍAS CÍCLICAS PARA LA SUPERFICIE DE NANOTUBOS DE TITANIO LLEVADAS A CABO A DIFERENTES VELOCIDADES DE BARRIDO EN NH_4SO_4 1 M COMO ELECTROLITO SOPORTE.

La variación de la intensidad de los picos anódicos para ambos procesos (Figura 27) muestran una dependencia lineal con la velocidad de barrido para bajas velocidades de barrido, lo que está de acuerdo con la existencia de un proceso de oxidación superficial.

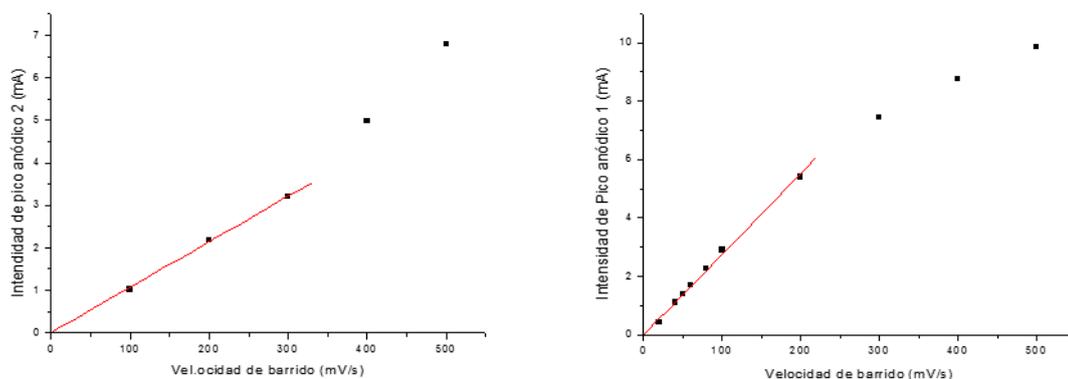


FIGURA 27. CURVAS CORRIENTE DE PICO ANÓDICO VS. VELOCIDAD DE BARRIDO PARA EL PROCESO ANÓDICO CENTRADO A $-1.2 \text{ V}_{\text{CALOMEL}}$ (PANEL IZQUIERDO) Y $-0.7 \text{ V}_{\text{CALOMEL}}$ (PANEL DERECHO)

La contribución catódica también muestra un comportamiento lineal entre la intensidad de la corriente de pico y la velocidad de barrido del potencial (Figura 28), en este caso en un amplio rango de velocidades de barrido, lo que sugiere que el no cumplimiento de este criterio de diagnóstico para las contribuciones anódicas se debe a la superposición parcial de los picos, que se hace más notoria a velocidades de barrido altas.

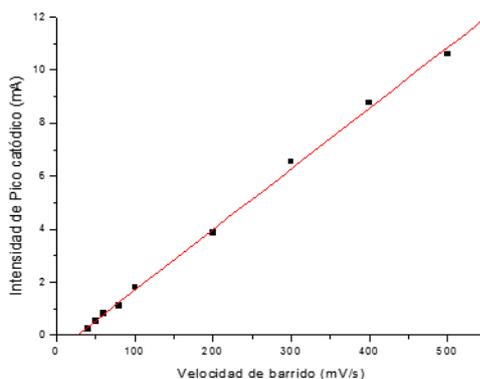


FIGURA 28. CURVA CORRIENTE DE PICO CATÓDICO VS. VELOCIDAD DE BARRIDO.

Cuando se compara el comportamiento electroquímico del titanio liso con la superficie de titanio modificada con nanotubos de TiO_2 (Figura 29) empleando Na_2SO_4 como electrolito soporte, se observan dos diferencias fundamentales: i) una mayor corriente en el caso de los nanotubos de titanio, debido a la mayor área real de la superficie (mayor rugosidad), y ii) la desaparición de la segunda corriente de oxidación.

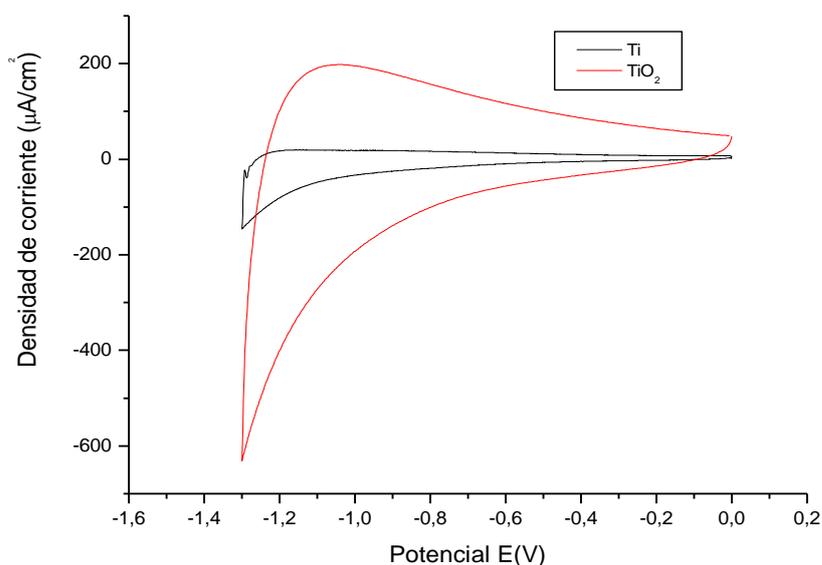


FIGURA 29. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA PARA LAS SUPERFICIES DE TITANIO LISA Y MODIFICADA CON NANOTUBOS DE TiO_2 EN Na_2SO_4 1 M.

ESPECTROSCOPÍA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

Se realizaron estudios de espectroscopia de impedancia electroquímica para una mejor descripción de la interface. Los espectros de impedancia obtenidos se ajustaron a diferentes circuitos conteniendo combinaciones de resistencias (R), capacitores (C), elementos de fase constante (CPE) y elementos de Warburg (W). La elección del mejor circuito se basó en el parámetro de ajuste X^2 .

Las medidas de impedancia electroquímica se realizaron tanto para la lámina de Ti con el recubrimiento pasivante de óxido, como para las muestras modificadas por anodización electroquímica (nanotubos). Previo a la EIS se realizó una voltametría cíclica en las mismas condiciones en que se llevaría a cabo el experimento para conocer las características de las superficies de partida.

COMPORTAMIENTO DE LA LÁMINA DE TI

Para la descripción de la interface en estudio, se analizó el diagrama de pourbaix para el titanio, donde se señalan las regiones de estabilidad termodinámicas para las diferentes fases del titanio en función del pH (

Figura 30). Del diagrama se deduce que al pH de trabajo (neutro) no existen especies solubles de Titanio, por lo que no se debería observar la difusión de iones en la interface, que daría lugar a una impedancia tipo Warburg; sólo deberían distinguirse fases oxidadas formadas sobre el metal.

De acuerdo con esto, y en función de los resultados experimentales, es conveniente distinguir dos regiones de potencial: entre 0 y -0.7 V (Figura 32), y entre -0.8 V y -1.3 v (

Figura 33). La principal diferencia entre ambos consiste en la existencia de una desviación mayor de la idealidad para describir el comportamiento capacitivo de los elementos. Los circuitos equivalentes considerados para describir la interface en estudio (Figura 31) consideran dos combinaciones RC que dan cuenta de las capacitancias del metal y del óxido del metal, junto con sus respectivas resistencias a la polarización. Los ajustes de este circuito a los datos experimentales demostraron que para potenciales por debajo de -0.8 V, el metal era adecuadamente modelado por un capacitor puro, mientras que por encima de ese potencial fue necesario considerar un elemento de fase constante. Esta diferencia sugiere la existencia de una rugosidad del metal de base durante el proceso de oxidación.

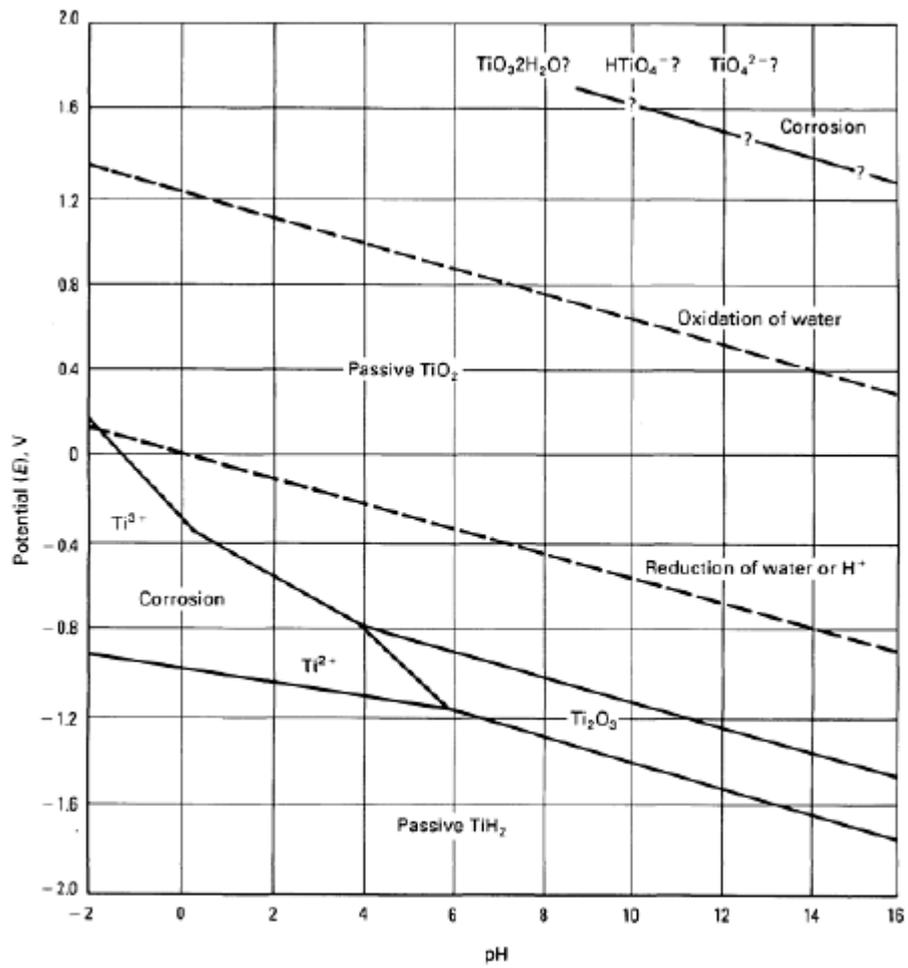


FIGURA 30. DIAGRAMA DE POURBAIX PARA EL SISTEMA TITANIO – AGUA A 25 °C. LOS POTENCIALES INDICADOS SE ENCUENTRAN REFERIDOS AL ELECTRODO DE HIDRÓGENO.



FIGURA 31. CIRCUITOS EQUIVALENTES EMPLEADOS PARA DESCRIBIR LA INTERFACE FORMADA POR UNA CHAPA DE TITANIO LISA EN SOLUCIÓN. (A) RANGO DE POTENCIAL ENTRE 0 Y -0.7 V, (B) RANGO DE POTENCIAL ENTRE -0.8 Y -1.3 V.

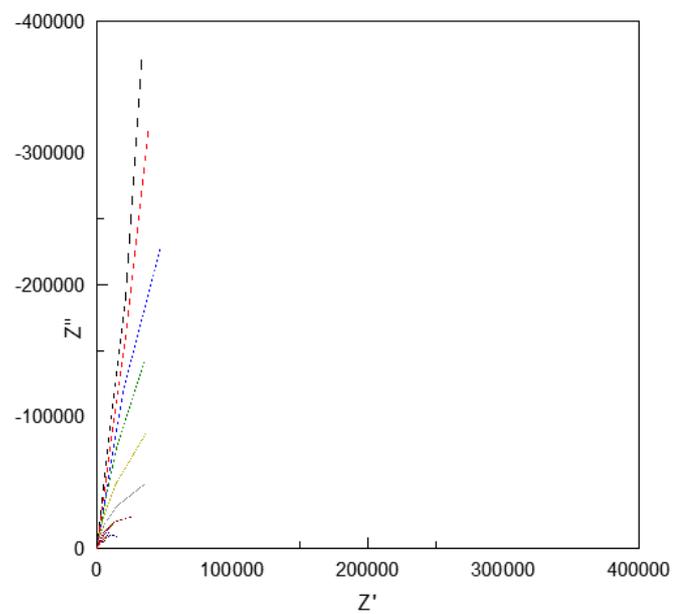


FIGURA 32. DIAGRAMA DE NYQUIST DE SUPERFICIE DE TI ENTRE 0 V Y -0.7 V

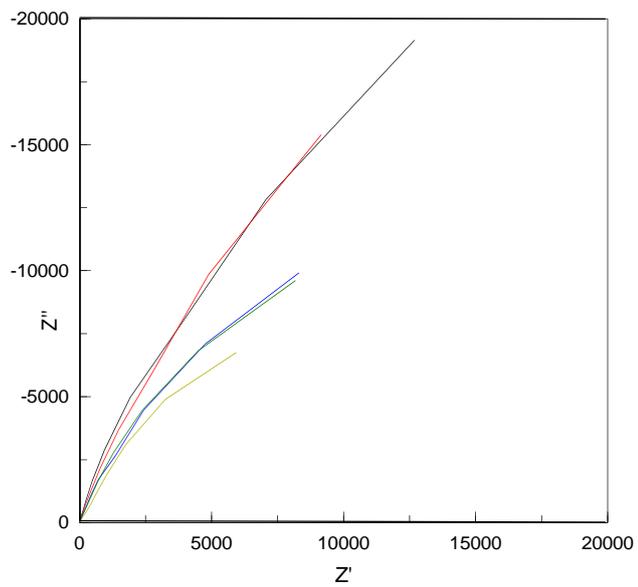


FIGURA 33. DIAGRAMA DE NYQUIST DE SUPERFICIE DE TI ENTRE -0.8 V Y -1.3 V

Cuando se consideran los valores de capacitancia para el metal de base en base a los dos circuitos, se observa una transición gradual, en la que los valores resultan inadecuados a los potenciales de transición entre ambos circuitos (Figura 34. Variación de la capacitancia de una lámina de titanio entre 0 y -1.3 V, separando el comportamiento como CPE (entre -0.8 y -1.3 V) y como capacitor puro (entre 0 y -0.7 V).). El aumento de la capacidad observado se relaciona con la reducción de la capa de óxido formada a los potenciales más altos. Para los potenciales más bajos (por debajo de -1.2 V) se observa una disminución de la capacitancia relacionada con procesos de formación de hidruros de titanio.

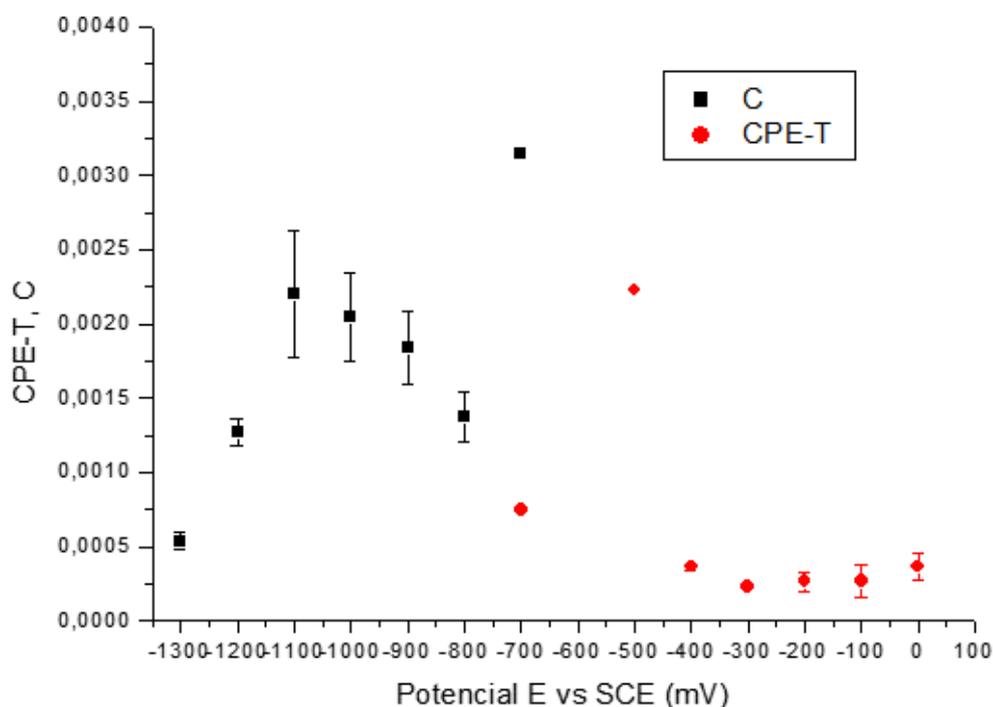


FIGURA 34. VARIACIÓN DE LA CAPACITANCIA DE UNA LÁMINA DE TITANIO ENTRE 0 Y -1.3 V, SEPARANDO EL COMPORTAMIENTO COMO CPE (ENTRE -0.8 Y -1.3 V) Y COMO CAPACITOR PURO (ENTRE 0 Y -0.7 V).

COMPORTAMIENTO DEL TITANIO CON NANOTUBOS DE TiO_2

Contrariamente a lo que sucede con la superficie de Titanio lisa, cuando la misma se encuentra recubierta por nanotubos de óxido de titanio, el diagrama de Nyquist muestra una contribución a bajas frecuencias correspondiente a una impedancia de Warburg (Figura 35). Por tal motivo, para describir el comportamiento de la interface, se consideró un CPE en paralelo con una combinación de un elemento resistivo en serie con un elemento de Warburg (Figura 36).

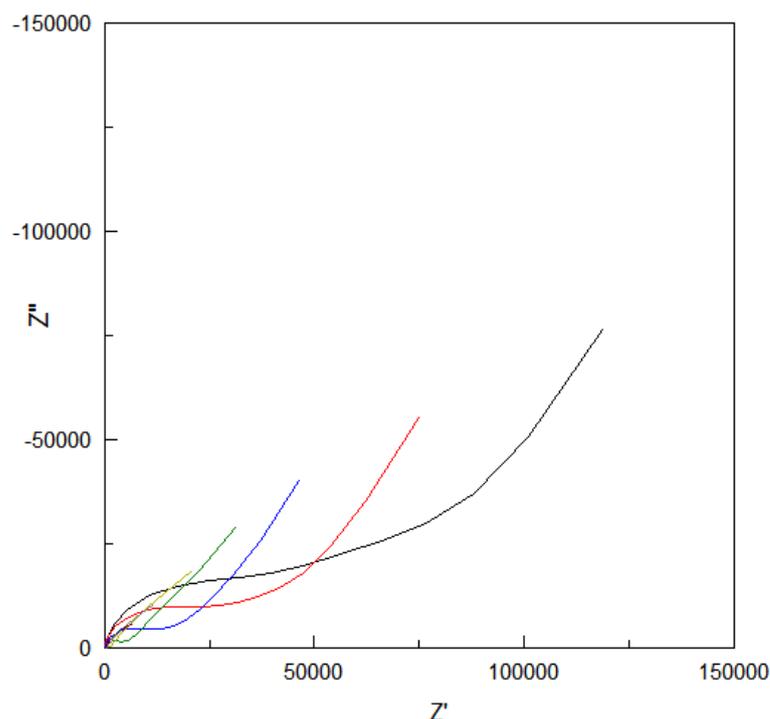


FIGURA 35. DIAGRAMA DE NYQUIST PARA LA SUPERFICIE DE TITANIO MODIFICADA CON NANOTUBOS DE TiO_2 .

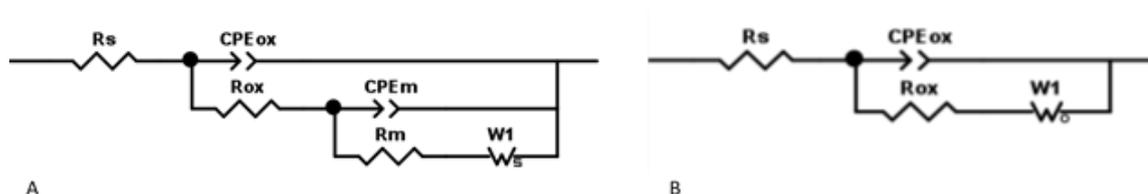


FIGURA 36. CIRCUITOS EQUIVALENTES PARA MODELAR LA INTERFACE DE LA SUPERFICIE DE TITANIO RECUBIERTA POR NANOTUBOS DE TiO_2 , PARA EL RANGO DE POTENCIAL ENTRE (A) 0 Y -0.7 V, (B) -0.8 Y -1.3 V

La diferencia con los circuitos empleados con la superficie de titanio lisa, además de la presencia de un elemento de Warburg, es la consideración de que parte de la superficie de Titanio por debajo de los nanotubos está expuesta al electrolito, ya sea por la existencia de regiones donde la densidad de nanotubos sea menor, o porque la base de los nanotubos es de Titanio, como se demostró por medidas de EDS. Para el caso estudiado, la capacitancia de la fase oxidada corresponde a los nanotubos.

El ajuste de este circuito a los datos experimentales confirma la existencia de una base de titanio metálico por debajo de los nanotubos. Por otra parte, la no coincidencia con lo predicho por los diagramas de Pourbaix sugieren la necesidad de contar con nuevos diagramas que tomen en cuenta esta nueva fase nanoestructurada. Desde el punto de vista académico, estos resultados abren las puertas para estudios más profundos de la interface que están más allá de los objetivos de este trabajo de Tesis. Pero desde el punto de vista de los objetivos buscados en este trabajo, la existencia de una capa de nanotubos de titanio

sobre el metal de base se puede tomar como la existencia de una topografía nanoestructurada que es activa, es decir, que puede ser detectada por diferentes métodos analíticos y no sólo por microscopía de alta resolución.

3.2.2. SUPERFICIES POROSAS POR OXIDACIÓN DE MICRO ARCO (OMA)

Las condiciones experimentales empleadas para la fabricación de las superficies porosas por oxidación de micro arco (OMA) se resumen en la

Tabla 19.

TABLA 19. TRATAMIENTO DE OXIDACIÓN DE MICRO ARCO A LÁMINAS DE TITANIO 99.6% DE PUREZA A DIFERENTES TIEMPOS DE OXIDACIÓN.

MUESTRA	DESCRIPCIÓN	ELECTROLITO	TIEMPO DE TRATAMIENTO
17	12 mm Ti 99.6	Na ₃ PO ₄ + TiO ₂ (20g/l)	30 min
18	12 mm Ti 99.6	Na ₃ PO ₄ + TiO ₂ (20g/l)	60 min
19	12 mm Ti 99.6	Na ₃ PO ₄ + TiO ₂ (20g/l)	90 min
30	12 mm Ti 99.6	Na ₃ PO ₄ + CaO (10g/l)	90 min

Las muestras 17, 18 y 19 fueron tratadas en el mismo electrolito cambiando el tiempo de tratamiento, de manera de conocer la incidencia del tiempo de tratamiento en la composición química y morfología de la superficie. La muestra 30 incorpora CaO en el electrolito en sustitución del TiO₂, para conocer la incidencia de la composición del electrolito y en particular, la presencia de calcio en la morfología y composición química final de la superficie.

3.2.2.1. MORFOLOGÍA DE LA SUPERFICIE

La morfología de las superficies modificadas por OMA se determinó por SEM, empleando magnificaciones crecientes. Para las muestras en las que se empleó TiO₂ en el electrolito (muestras 17, 18 y 19), a la menor magnificación ensayada, se observa un recubrimiento uniforme de depósito de óxido. A mayor magnificación se observa una superficie porosa de tamaño irregular con un arreglo tridimensional similar al de estructuras caliciformes de coral y micrografías de la estructura del hueso (Figura 37). Para el menor tiempo de tratamiento, los tamaños de poros son superiores a 1 µm, mientras que, para tiempos de tratamiento por encima de la hora, los tamaños de poro se mantienen en tamaños similares, con diámetros por debajo de 1 µm. Para la mayor magnificación ensayada, la superficie entre los poros se muestra como suavemente ondulada, sin señales de depósitos nanométricas de TiO₂ nanoestructurado.

Para el caso del tratamiento en presencia de CaO en el electrolito (muestra 30), los resultados son similares a los obtenidos con TiO₂, en el sentido que se forman poros de tamaños por debajo de la micra sobre la superficie (Figura 38). El tamaño de poro medio es menor que el obtenido para el mismo tiempo de tratamiento con TiO₂. Para la magnificación empleada, no se observan nanoestructuras sobre la superficie que contiene los nanoporos. Para las muestras 18 y 19, el espesor de la capa de óxido en ambos casos fue de 10 µm, el doble que el obtenido para la muestra 17. Para la muestra 30, el espesor de la capa de óxido fue de 30 µm.

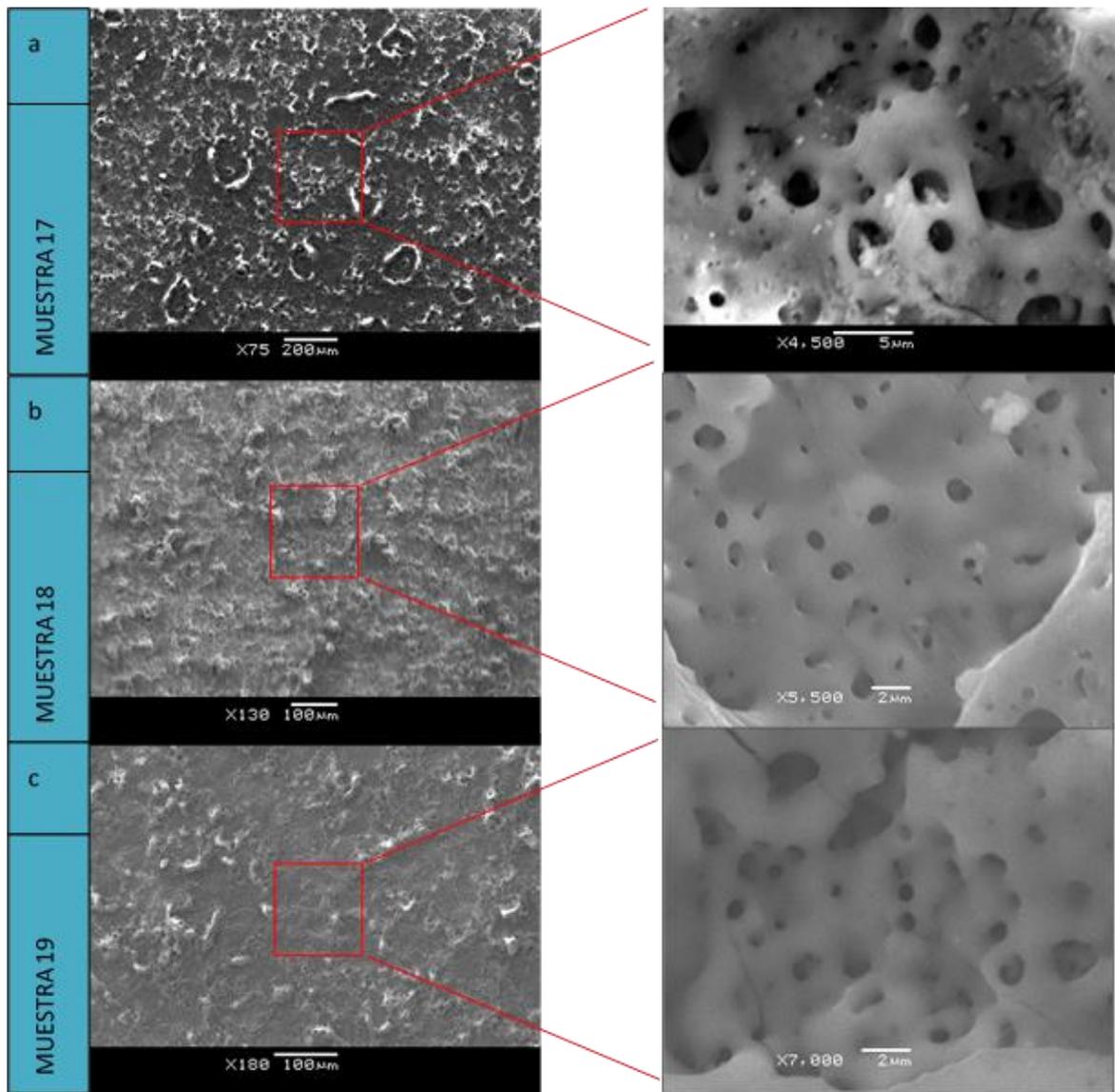


Figura 37. Micrografías SEM para las superficies obtenidas por OMA en presencia de TiO_2 en el electrolito.

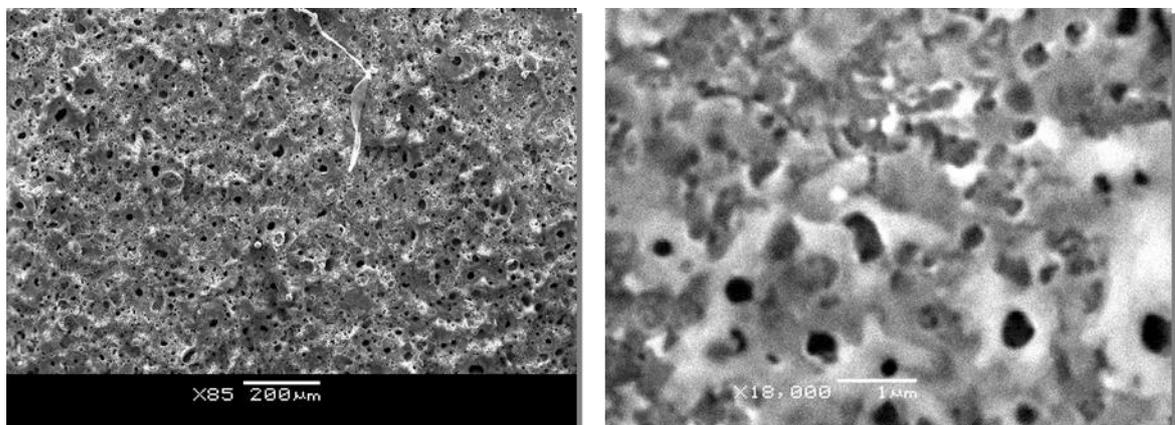


FIGURA 38. MICROGRAFÍAS SEM PARA LAS SUPERFICIES OBTENIDAS POR OMA EN PRESENCIA DE CAO EN EL ELECTROLITO.

3.2.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MUESTRAS MODIFICADAS POR OMA

Para determinar la composición de la superficie de las láminas de titanio modificadas por técnica de OMA, se realizaron estudios de mapeo del contenido (cualitativo) atómico de cortes transversales de la superficie, junto con una descripción cuantitativa del porcentaje atómico en las secciones analizadas.

Para la muestra 17, obtenida por OMA en electrolito conteniendo TiO_2 tratada durante 30 min, se observa en la sección transversal una capa densa interna, recubierta por una capa porosa (Figura 39). El espectro EDS muestra la preponderancia de los elementos Ti, P y O. El mapeo atómico muestra que el Titanio se concentra en la capa interna, y aparece más esparcido en la capa externa. Esta observación, junto con la distribución de los átomos de oxígeno, que se concentra en la capa externa y prácticamente no aparece en la capa interna, indica que la capa porosa externa está formada por un óxido de titanio, mientras que la capa densa interna corresponde al titanio puro original. Finalmente el fósforo se concentra en la cara externa que estuvo en contacto con el electrolito de trabajo, el cual contenía Na_3PO_4 , lo que sugiere que proviene de grupos fosfatos adheridos a la superficie. El análisis de la distribución atómica confirma la naturaleza del óxido de titanio formado (Tabla 20).

TABLA 20. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE ÁTOMOS EN LA MUESTRA 17

Elemento / Línea	Átomo %
O / K	55.38 ± 0.44
P / K	2.43 ± 0.09
Ti / K	22.55 ± 0.04
Otros (N, F, Al, Si, K, Fe, Zn, Pt)	19.64
Total	100.00

Si se considera que todo el P presente se encuentra en el grupo PO_4 , y que el resto del O se encuentra formando parte del óxido de titanio, la naturaleza de este último se puede deducir de los valores tabulados, de la siguiente forma:

$$\text{Átomos de O totales} = (4 \times \text{Átomos de P}) + (n \times \text{Átomos de Ti})$$

Sobre una base de 100, estos valores son:

$$55.38 = (4 \times 2.43) + (n \times 22.55)$$

donde n representa el número de átomos de Oxígeno unidos al Titanio. Del cálculo anterior se obtiene un valor para $n = 2.0$, lo que indica que el compuesto oxidado de titanio que se forma es el TiO_2 .

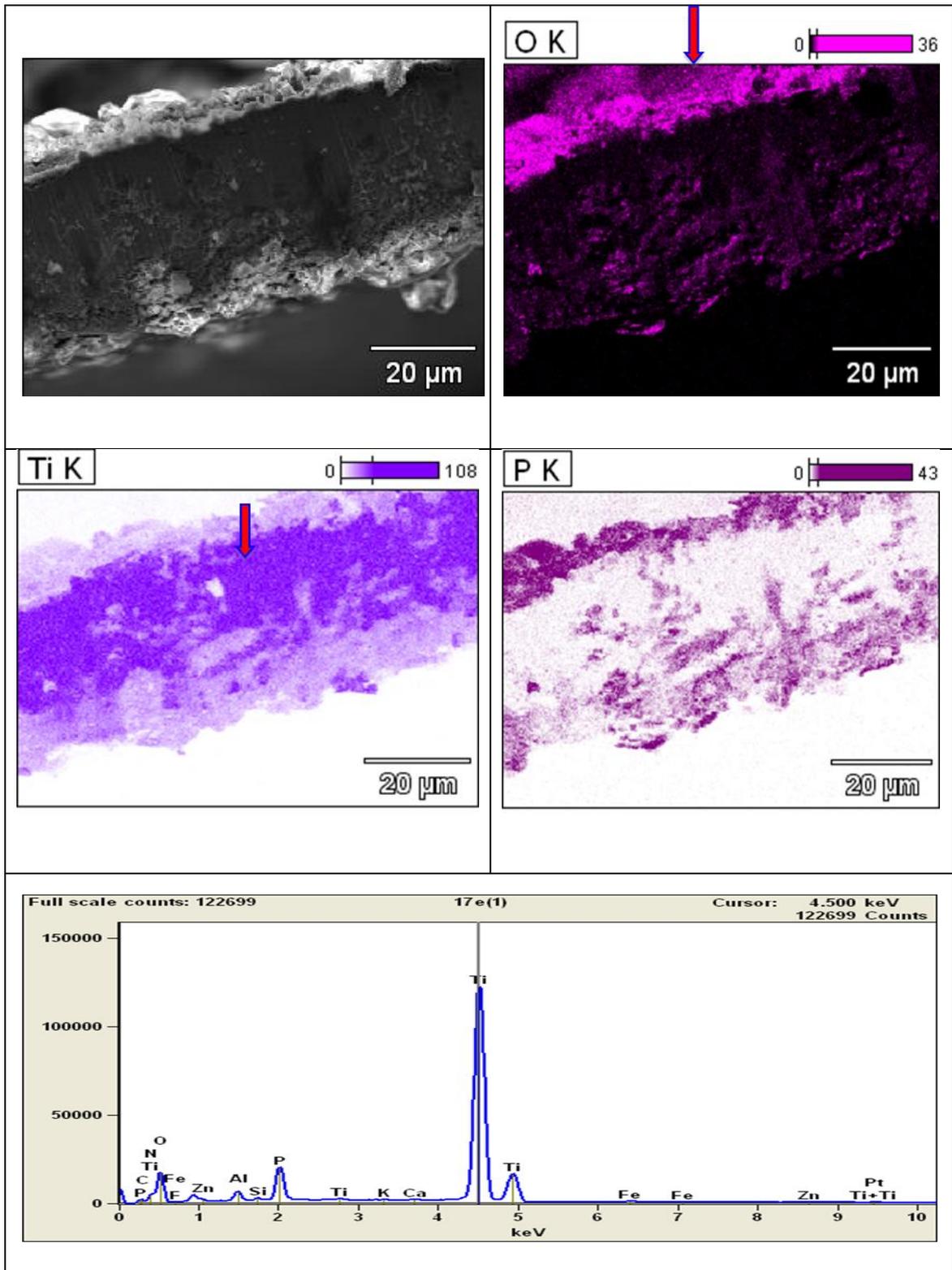
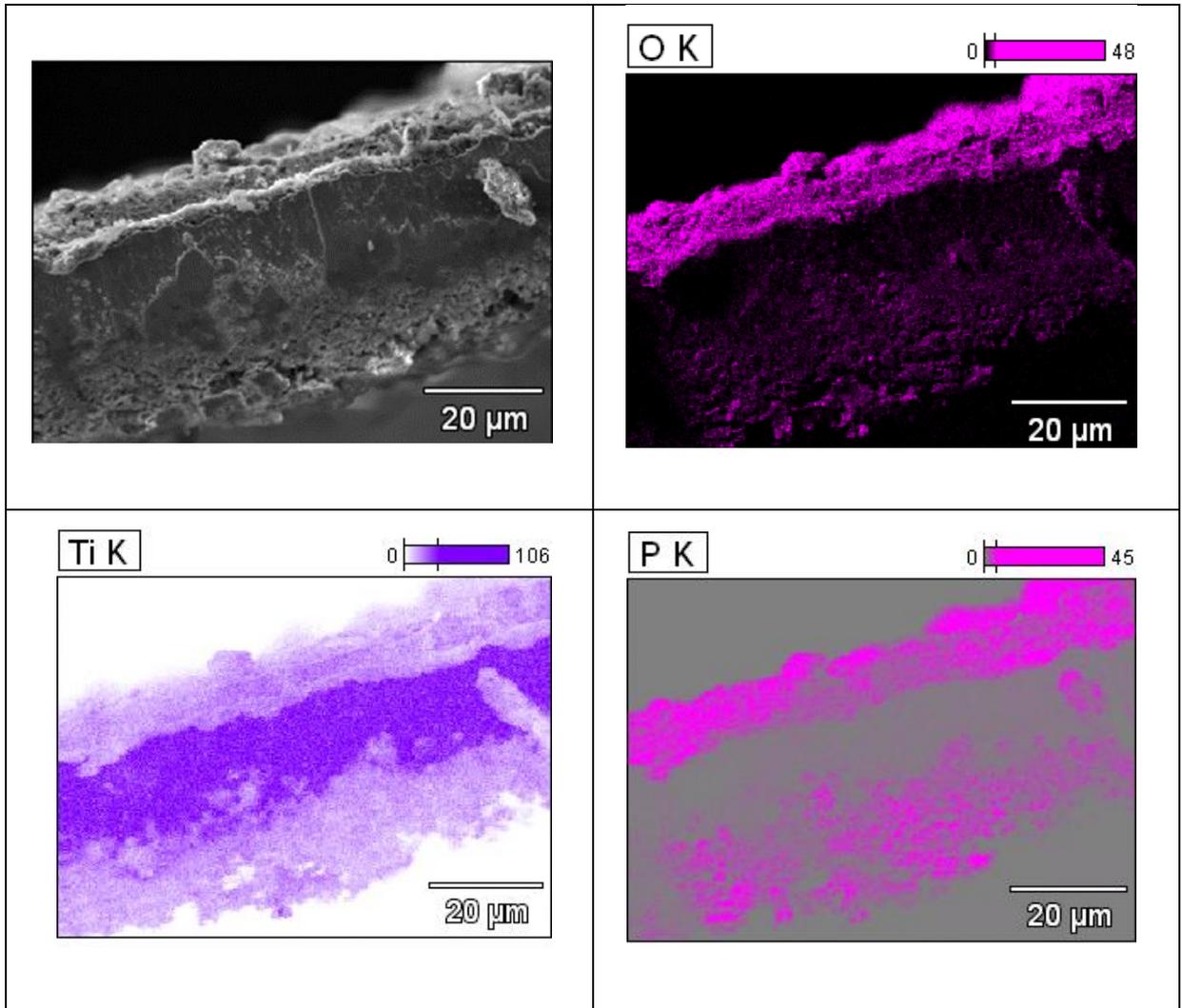


FIGURA 39. MICROGRAFÍA SEM DE UN CORTE TRANSVERSAL DE UNA MUESTRA DE TITANIO MODIFICADA POR OMA (MUESTRA 17), JUNTO CON LA DISTRIBUCIÓN ATÓMICA PARA EL TI, O Y P, Y EL ANÁLISIS POR EDS.

Para las muestras 18 (

Figura 40) y 19 (

Figura 41), en las que el proceso de oxidación se llevó a cabo por 60 y 90 min, respectivamente, se obtiene una distribución espacial de átomos similar a la muestra 17.



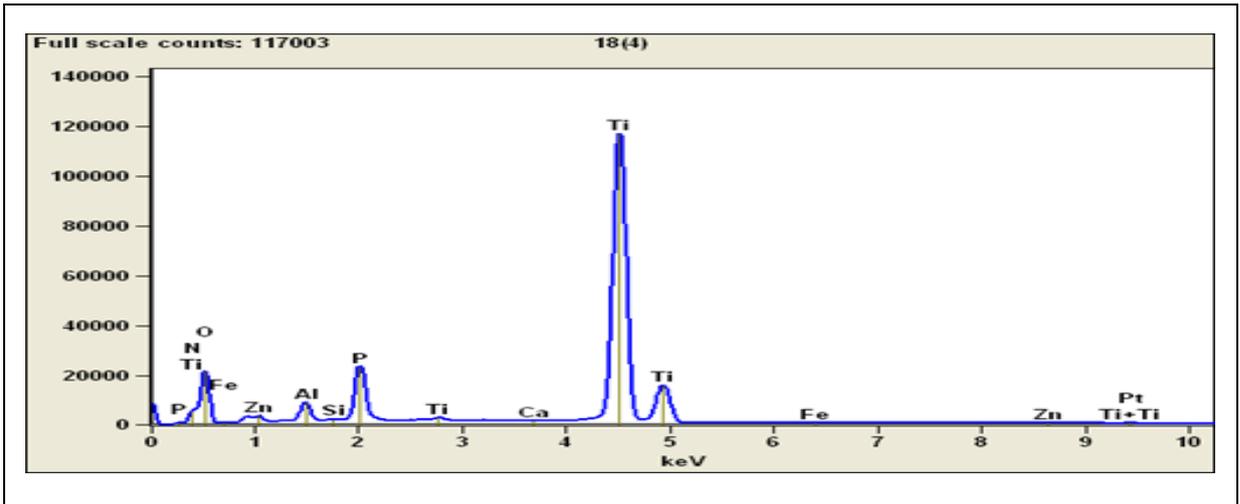
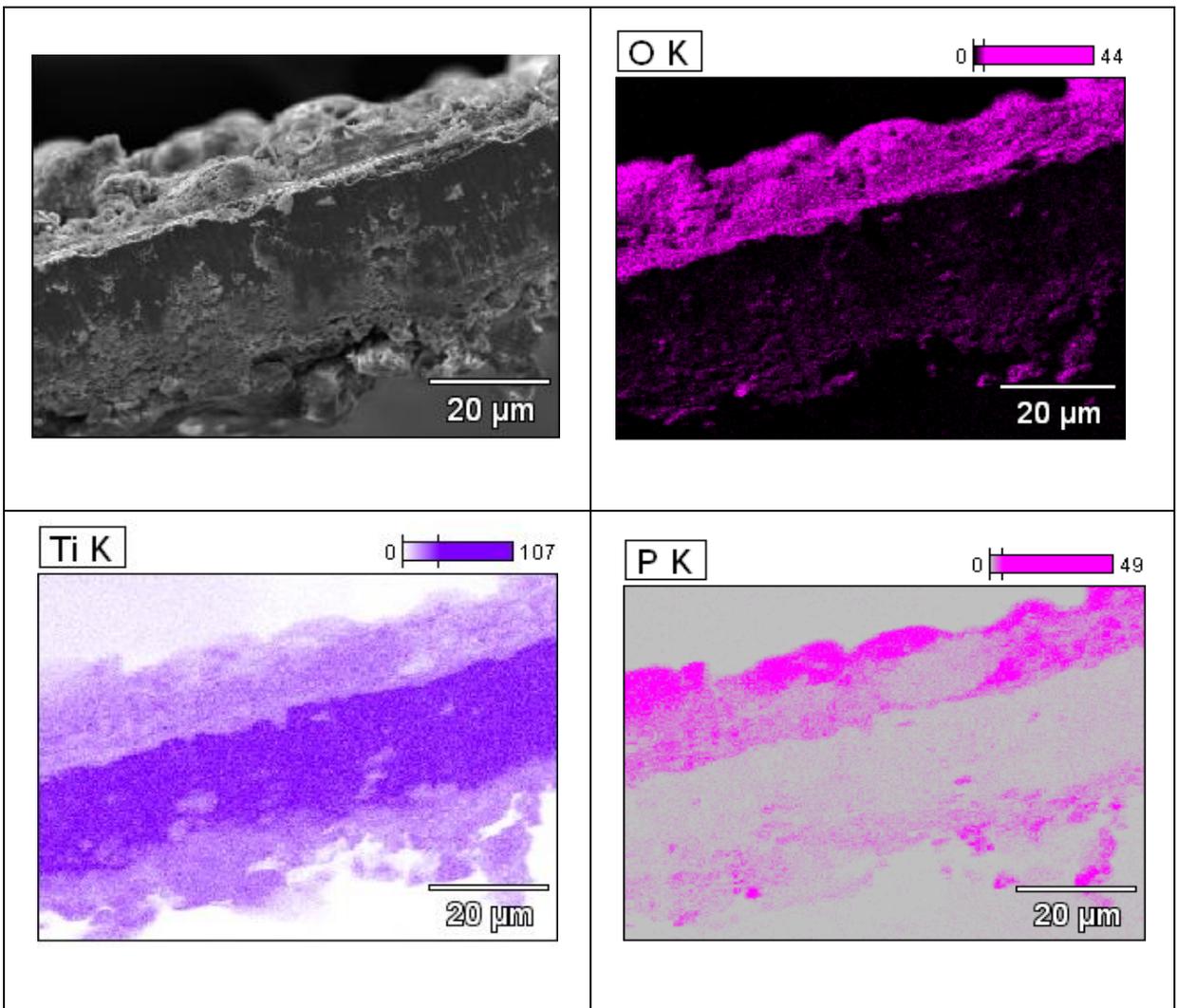


FIGURA 40. MICROGRAFÍA SEM DE UN CORTE TRANSVERSAL DE UNA MUESTRA DE TITANIO MODIFICADA POR OMA (MUESTRA 18), JUNTO CON LA DISTRIBUCIÓN ATÓMICA PARA EL TI, O Y P, Y EL ANÁLISIS POR EDS.



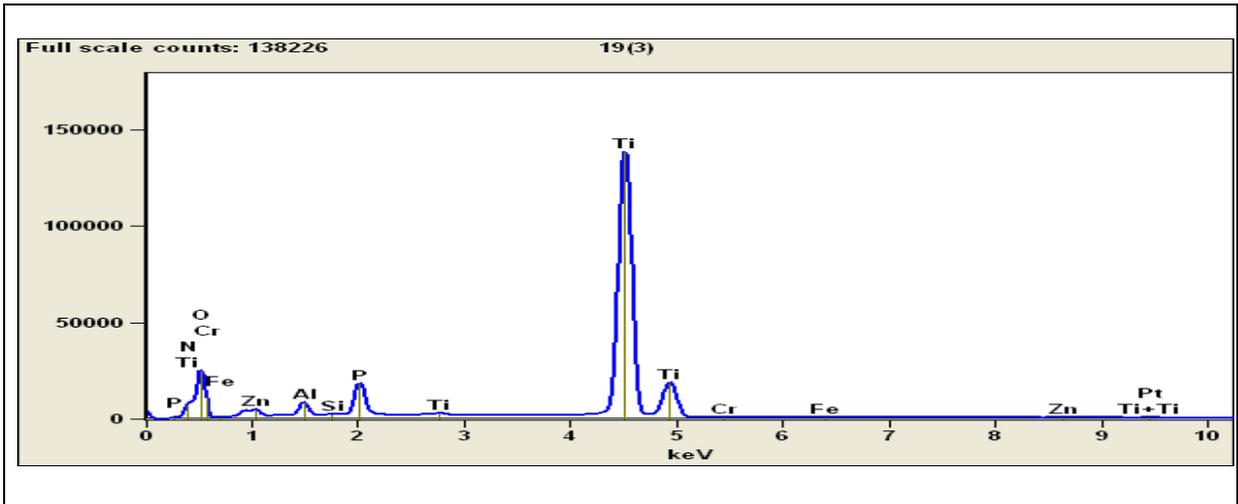


FIGURA 41. MICROGRAFÍA SEM DE UN CORTE TRANSVERSAL DE UNA MUESTRA DE TITANIO MODIFICADA POR OMA (MUESTRA 19), JUNTO CON LA DISTRIBUCIÓN ATÓMICA PARA EL TI, O Y P, Y EL ANÁLISIS POR EDS.

Sin embargo, las composiciones atómicas cuantitativas muestran algunas diferencias (Tabla 21) con la muestra 17. En particular, el cálculo del número estequiométrico para el óxido formado vale $n = 2.4$ para la muestra 18 y $n = 2.7$ para la muestra 19. Este resultado sugiere la formación de un óxido diferente al TiO_2 , o la presencia del Ti en otros compuestos, como fosfato.

TABLA 21. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE ÁTOMOS EN LAS MUESTRAS 18 Y 19

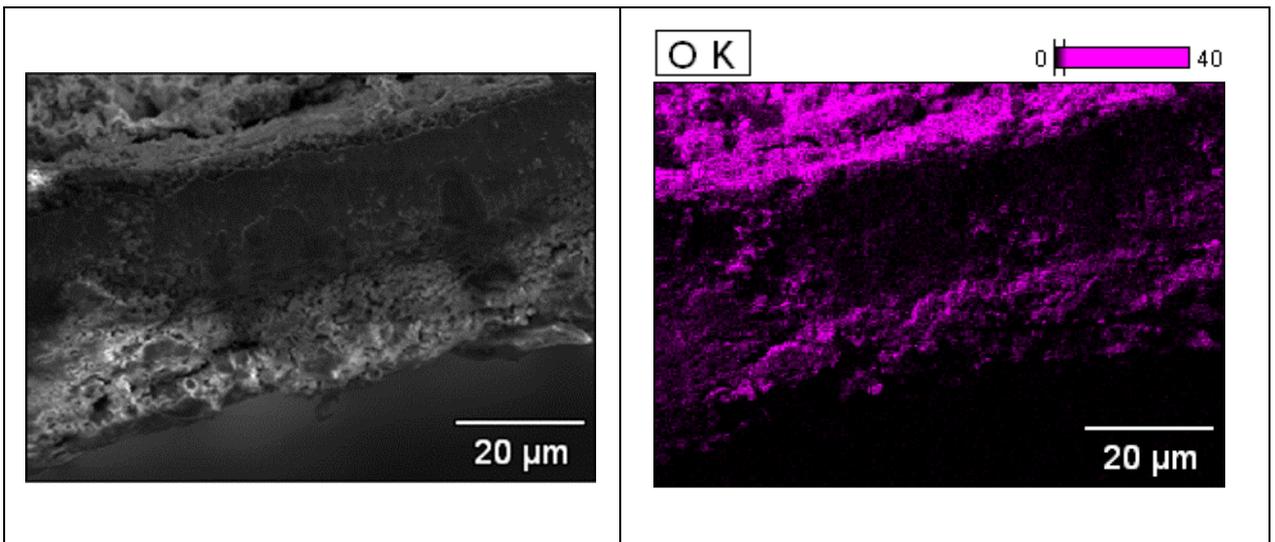
ELEMENTO / LÍNEA	ÁTOMO %	
	Muestra 18	Muestra 19
O / K	63.04 ± 0.35	63.73 ± 1.14
P / K	3.28 ± 0.04	1.97 ± 0.08
Ti / K	20.88 ± 0.04	20.81 ± 0.04
Otros (N, F, Al, Si, K, Fe, Zn, Pt)	12.80	13.49
Total	100.00	100

El análisis de la muestra que contenía Calcio en el electrolito (muestra 30) no muestra diferencias significativas, atribuibles a su presencia, tanto en los aspectos cualitativos (Figura 42) como cuantitativos

(Tabla 22). En estas condiciones se obtiene un depósito de 30 μm de espesor, en el que se concentran los elementos O, P y Ti principalmente.

TABLA 22. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE ÁTOMOS EN LA MUESTRA 30

ELEMENTO / LÍNEA	ÁTOMO %
O / K	59.05 ± 0.38
P / K	5.07 ± 0.02
Ti / K	20.21 ± 0.04
Ca / K	0.92 ± 0.01
Otros (N, F, Al, Si, K, Fe, Zn, Pt)	14.75
Total	100.00



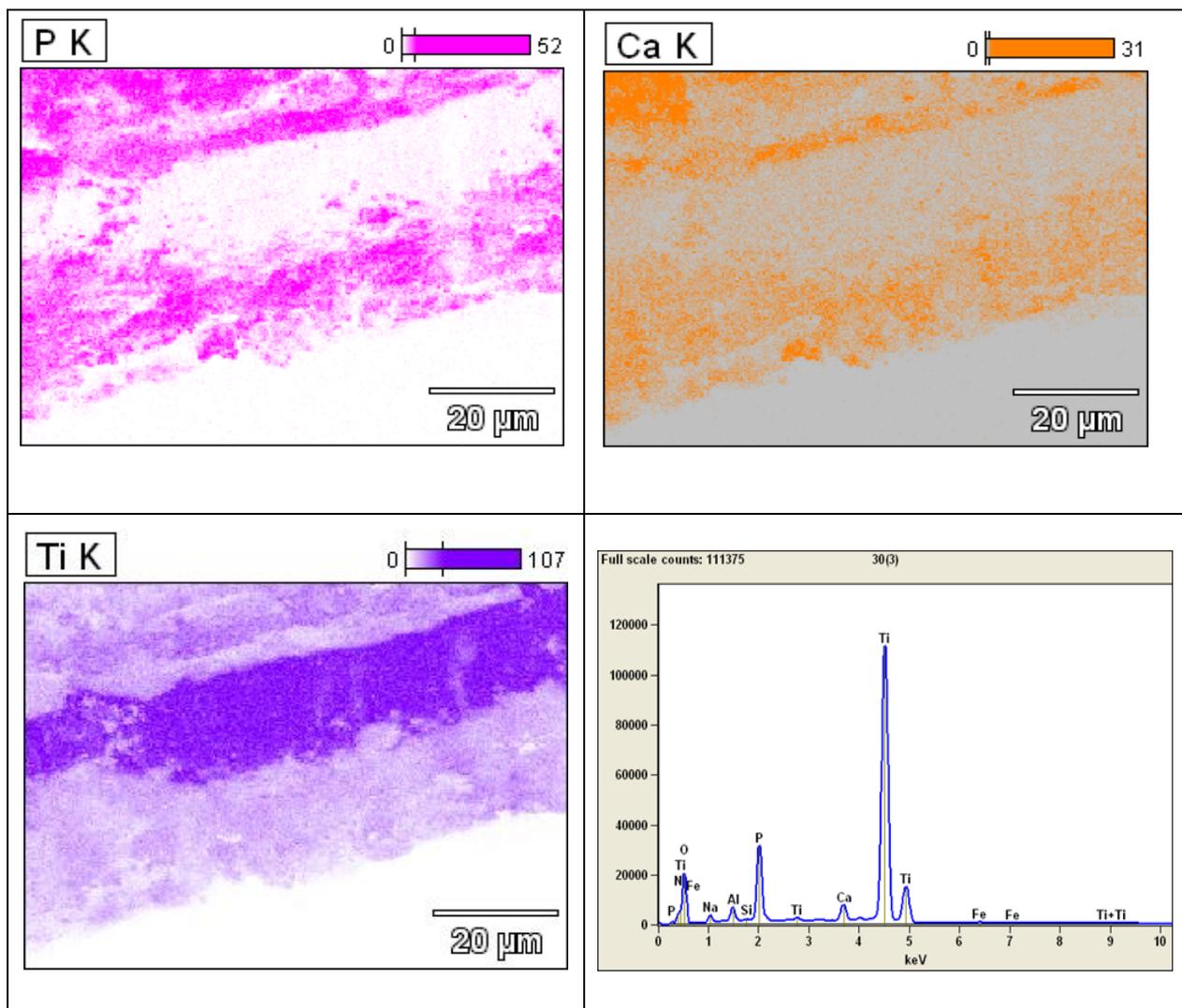


FIGURA 42. MICROGRAFÍA SEM DE UN CORTE TRANSVERSAL DE UNA MUESTRA DE TITANIO MODIFICADA POR OMA (MUESTRA 30), JUNTO CON LA DISTRIBUCIÓN ATÓMICA PARA EL TI, O, CA Y P, Y EL ANÁLISIS POR EDS.

De acuerdo con estos resultados, el cálculo del número estequiométrico de átomos de O en el óxido de titanio arroja un valor de $n \approx 2$:

$$\text{Átomos de O totales} = (1 \times \text{Átomos de Ca}) + (4 \times \text{Átomos de P}) + (n \times \text{Átomos de Ti})$$

El cálculo de los átomos de O con y sin considerar el Ca, no presenta diferencias. Por lo tanto se deduce que se forma TiO_2 sobre la superficie y se descarta la presencia significativa de CaO. Debe señalarse que para esta muestra, la única fuente de titanio para la formación del TiO_2 proviene de la chapa de Ti empleado, ya que en el electrolito el TiO_2 fue sustituido por el CaO.

3.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS

3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS SINTETIZADAS EX-SITU

Uno de los aspectos clave de este trabajo de Tesis es la distinción de los ambientes apatíticos de los no-apatíticos como evidencia de la formación de hidroxiapatitas nanoestructuradas. La espectroscopía

infrarroja resulta una herramienta ideal para ello, pero dada la variedad de entornos químicos posibles, fue necesario contar con una tabla de asignación de espectros más completa, así como de las herramientas de análisis adecuadas para llevar a cabo tal distinción.

Un primer indicio de las dificultades a resolver proviene del análisis de compuestos de referencia, conteniendo los grupos funcionales de interés. En este caso, el análisis del grupo fosfato en sus diferentes grados de protonación dan la primera pista (

Figura 43).

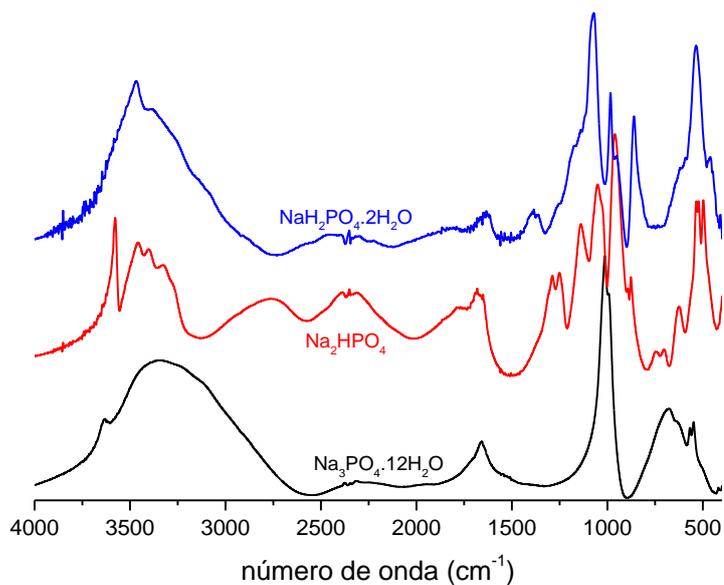


FIGURA 43. ESPECTROS FTIR PARA LAS SALES PURAS DE FOSFATO DE SODIO EN LAS QUE EL GRUPO FOSFATO PRESENTA DIFERENTES GRADOS DE PROTONACIÓN. LAS SALES EMPLEADAS FUERON DE LA FIRMA ALDRICH, CON PUREZAS SUPERIORES AL 99 %.

Puede observarse la variedad de bandas de absorción que aparecen en función de la protonación del grupo fosfato, que en principio permitiría la distinción entre la presencia de grupos fosfato en ambientes apatíticos (sin protonar) y no apatíticos (protonados). En el espectro FTIR, el grupo fosfato da lugar a una señal principal centrada en ca. 1050 cm⁻¹. Para el caso de grupo fosfato protonado, HPO₄²⁻, las señales se extienden entre 850 y 1300 cm⁻¹. El rango de energías se extiende aún más para el caso del grupo fosfato diprotonado, H₂PO₄⁻, entre 850 y 1450 cm⁻¹.

Una mejor distinción de las diferentes bandas puede hacerse derivando los espectros FTIR. Las derivadas segunda de los registros permiten la localización de las bandas como mínimos (FIGURA 44). De esta manera, no sólo es posible localizar las principales bandas, sino además resolver bandas parcialmente superpuestas, que en los espectros FTIR aparecen como hombros. Los espectros derivados muestran claramente la complejidad analítica de los ambientes no-apatíticos.

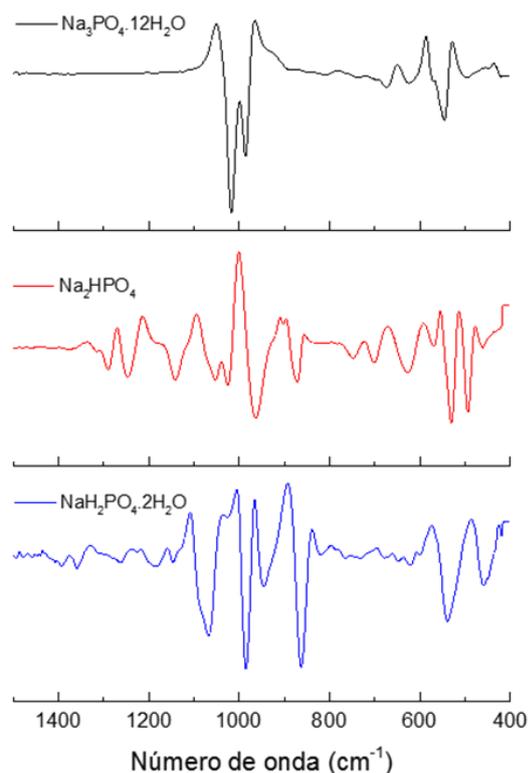


FIGURA 44. DERIVADAS SEGUNDA DE LOS ESPECTROS FTIR MOSTRADOS EN LA Figura 43

LA SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS, Y SU POSTERIOR CARACTERIZACIÓN POR XRD Y FTIR PERMITE CAMBIOS QUE SE PRODUCEN CUANDO ESTAS HIDROXIAPATITAS SON DEPOSITADAS SOBRE EL TITANIO, PRODUCE LA DEPOSICIÓN *IN-SITU* EN MEDIO FISIOLÓGICO. SE SINTETIZARON UNA VARIEDAD DE MANERA DE CONSIDERAR DIFERENTES ENTORNOS QUÍMICOS. POR OTRA PARTE, SE HICIERON LAS CUARTA DE CADA ESPECTRO FTIR PARA PODER IDENTIFICAR CORRECTAMENTE LOS AMBIENTES APATÍTICOS. LOS REGISTROS FTIR Y XRD FUERON REALIZADOS EN EL MARCO DE LA TESIS DE NAVATTA, Y ANALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOMATERIALES (FTIR) Y EN EL LABORATORIO DE SÓLIDO (XRD); LOS REGISTROS SE MUESTRAN EN EL ANEXO 2. LAS SEÑALES OBTENIDAS POR FTIR SE RESUMIDAS EN LA

Tabla 23. Asignación de bandas vibracionales para apatitas en diferentes entornos químicos. Ver anexo 2 por más detalles., de manera de tomar en cuenta las variaciones inducidas por los diferentes entornos químicos considerados.

TABLA 23. ASIGNACIÓN DE BANDAS VIBRACIONALES PARA APATITAS EN DIFERENTES ENTORNOS QUÍMICOS. VER ANEXO 2 POR MÁS DETALLES.

Asignación	HA _{esteq}	HA _{no esteq}	HA	FA	SrA
$v_2 PO_4$	464				
$v_2 PO_4$		469			470
$v_2 PO_4$	474			472	
HPO ₄ no ap		533	534		
HPO ₄ ap		551	547	542	
$v_4 PO_4$		562	564	564	564
$v_4 PO_4$	567				
$v_4 PO_4$	572				
$v_4 PO_4$		575	575	576	574
$v_4 PO_4$	603	603	604	602	603
PO ₄ no ap		617	612	609	
$v_L OH$	633	633	633	642	633
PO ₄ no ap		866			
HPO ₄		870			
$v_2 CO_3 B$		871	873		
$v_2 CO_3 A$		880			
$v_1 PO_4$	964	962	961	962	961
$v_3 PO_4$		1006	1010	1005	1006
$v_3 PO_4$		1020	1022	1023	1022
$v_3 PO_4$	1026				
$v_3 PO_4$		1031	1029	1032	1032
$v_3 PO_4$	1034				
$v_3 PO_4$	1044	1044	1037	1043	1043
$v_3 PO_4$		1059	1052	1059	1056
$v_3 PO_4$	1063				
$v_3 PO_4$		1072	1068	1074	1070
$v_3 PO_4$	1089				
$v_3 PO_4$		1091	1092	1094	1092
$v_3 PO_4$		1104	1106		1107
?				1112	
HPO ₄		1144	1143	1149	

3.3.2. DEPOSICIÓN DE HIDROXIAPATITA SOBRE TI: MÉTODO ELECTROFORÉTICO

El método de precipitación acuosa permite obtener un polvo de HA el cual es posteriormente depositado sobre las superficies de titanio por el método electroforético (Figura 47). La síntesis se realizó a

temperatura ambiente con un posterior envejecimiento de la muestra por 5 días, y calcinado a 980 °C para la obtención de un polvo blanco. El análisis por XRD (Figura 45) confirma la síntesis de hidroxiapatita (con una contribución minoritaria de OCP), a la vez que demuestra la naturaleza cristalina de la misma.

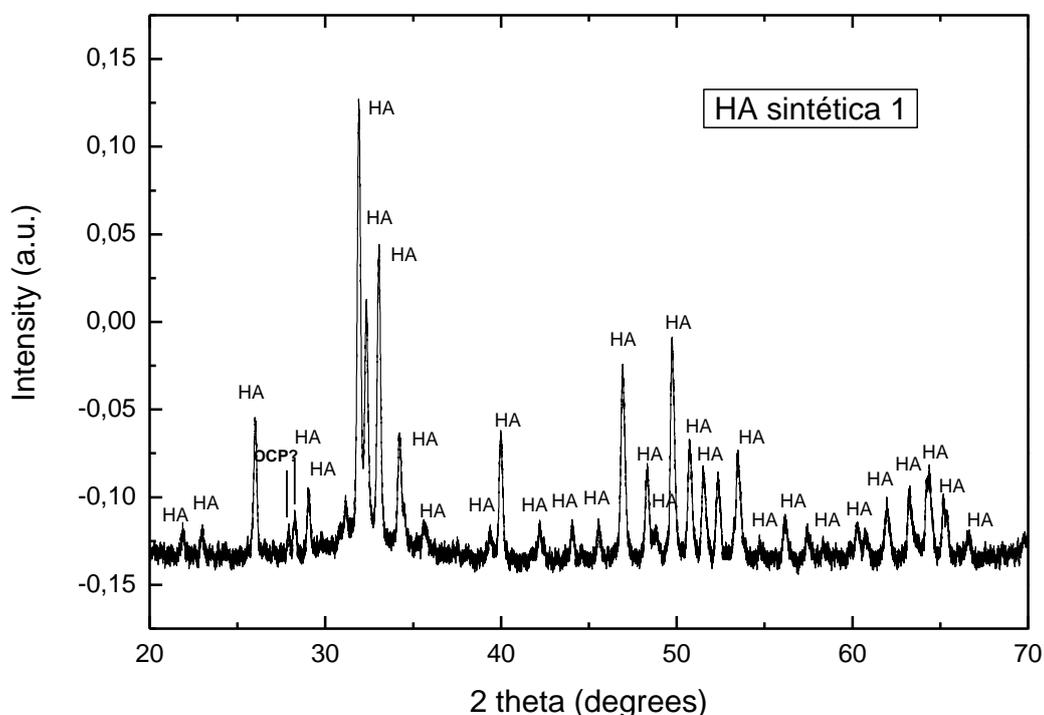


FIGURA 45. XRD DE LA HIDROXIAPATITA SINTETIZADA EN SOLUCIÓN ACUOSA PARA SU POSTERIOR ADSORCIÓN SOBRE TITANIO POR EL MÉTODO ELECTROFORÉTICO.

A partir de las señales a 2θ para los planos 211 y 300 se determinó el tamaño de cristalita (D) con la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{0.94\lambda}{\beta \cos\theta}$$

en la que λ es la longitud de onda empleada en el estudio de XRD, β es el ancho de pico de la banda considerada, y θ se relaciona con la localización del pico en el difractograma. Los valores obtenidos para los tamaños de cristalita para el plano preferencial 211 y 300, fue de 32 nm y 29 nm, respectivamente.

Desde el punto de vista estructural, se observa una única señal correspondiente a OCP, precursor de las hidroxiapatitas, caracterizado por una deficiencia en Calcio ($\text{Ca/P} = 1.33$). Esta señal es minoritaria, por lo que se puede concluir que la muestra sintetizada corresponde a una hidroxiapatita nanoestructurada, formada químicamente a través del precursor OCP.

Finalmente, la hidroxiapatita sintetizada por el método acuoso fue caracterizada por espectroscopía infrarroja (FTIR) para su clasificación (Figura 46).

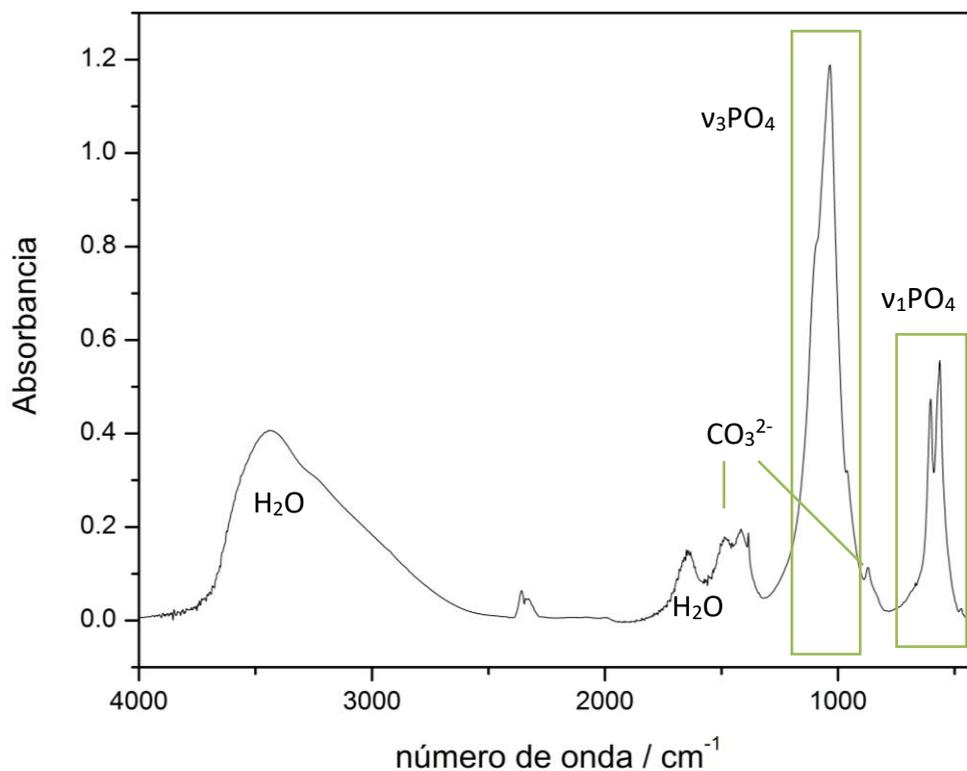


FIGURA 46. ESPECTRO FTIR DE LA HIDROXIAPATITA SINTETIZADA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN ACUOSA

El espectro presenta las frecuencias vibracionales centradas en 861 y 876 cm⁻¹ que se corresponden con la presencia de CO₃²⁻ en un entorno no apatítico. Si bien la mezcla de electrolitos empleada no contenía CO₃²⁻, éste proviene de la disolución del CO₂ del ambiente. También se determinó la presencia de las bandas correspondientes al grupo HPO₄, además de las del grupo PO₄. Estos resultados concuerdan con las características de una carboxiapatita nanoestructurada cuyos datos fueron mostrados en las Tablas 12 y 23.

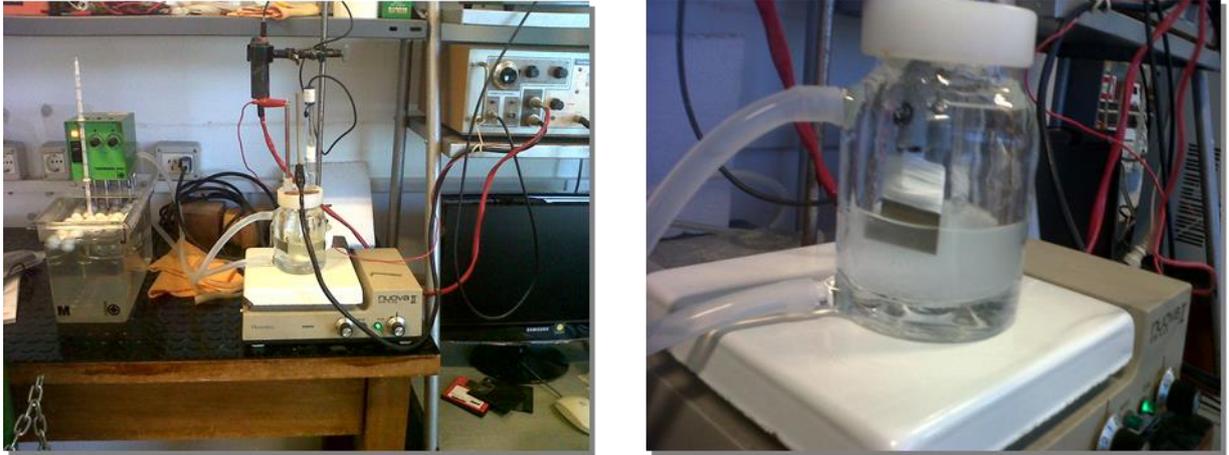


FIGURA 47. SISTEMA EXPERIMENTAL EMPLEADO EN LA DEPOSICIÓN DE HA POR EL MÉTODO ELECTROFORÉTICO.

De los 3 voltajes ensayados, sólo el correspondiente a 5 V no dio lugar a un recubrimiento de la superficie del material. Por el contrario, para las diferencias de potencial de 10 y 20 V se observó un recubrimiento parejo sobre la superficie del material. Luego de determinar el voltaje de la síntesis, se procedió a variar el tiempo de tratamiento para ver si existía algún efecto en el recubrimiento. En este caso el tiempo de síntesis pasó de 10 min a 1 min, observándose que el recubrimiento obtenido tiene las mismas características y extensión (a nivel macroscópico) que el obtenido a un tiempo mayor (Figura 48).



FIGURA 48. HA DEPOSITADA POR ELECTROFORESIS A 20 V Y TIEMPO DE DEPOSICIÓN DE 10 MINUTOS Y 1 MINUTO SOBRE LÁMINA DE TI LISA.

El análisis de las muestras de hidroxiapatitas depositadas por el método electroforético sobre las dos superficies de titanio consideradas, muestran algunas diferencias a destacar. En primer lugar, el perfil de XRD para la hidroxiapatita depositada sobre los nanotubos de TiO_2 a 10 V durante 10 min (Figura 49)

confirma la composición química correspondiente a una hidroxiapatita, con las mismas características a las observadas al producto sintetizado ex-situ.

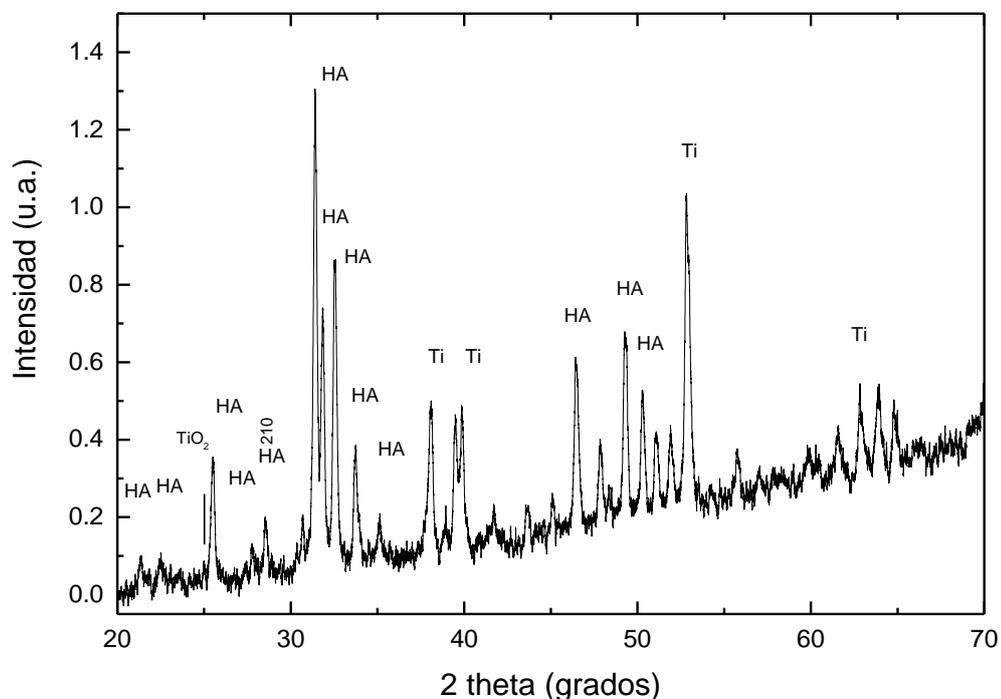


FIGURA 49. PERFIL XRD PARA LA HIDROXIAPATITA DEPOSITADA SOBRE UNA SUPERFICIE DE NANOTUBOS DE TiO_2 . VOLTAJE APLICADO: 10 V DURANTE 10 MIN,

Cabe destacar sin embargo la desaparición de la señal correspondiente a la fase OCP, lo que sugiere que la misma debía ser de naturaleza lábil, y que se desprendió durante la deposición (una situación equivalente se observó en la aplicación del método electroforético en un producto comercial (ver Anexo 3).

Finalmente, el tamaño de cristallita obtenido, a partir de los picos correspondientes a los planos 211 y 300 fue de 31 y 28 nm, respectivamente. Estos tamaños son similares a los obtenidos para la hidroxiapatita sintetizada ex-situ.

Cuando se emplea como sustrato la chapa de titanio lisa, el depósito de hidroxiapatita presenta una disminución de la intensidad de los picos en el perfil XRD (Figura 50), y un aumento de su ancho de medio pico, lo que indica que se forman cristallitas más pequeñas que las formadas sobre los nanotubos de TiO_2 . Al igual que sobre la superficie de nanotubos de TiO_2 no se observa el pico de OCP.

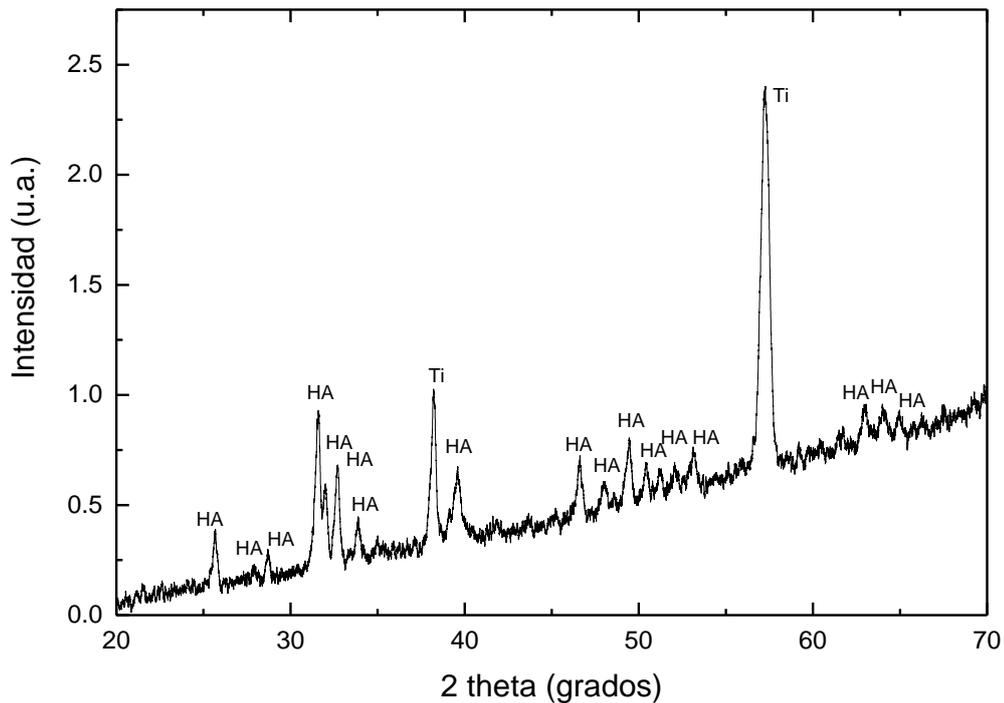


FIGURA 50. PERFIL XRD PARA LA HIDROXIAPATITA DEPOSITADA SOBRE UNA SUPERFICIE DE TITANIO LISO. VOLTAJE APLICADO 20 V, DURANTE 1 MIN.

3.3.3. DEPOSICIÓN DE HIDROXIAPATITA SOBRE TI: MÉTODO BIOMIMÉTICO

La síntesis de la HA a partir de una solución supersaturada de composición similar al medio fisiológico se llevó a cabo a lo largo de 4 semanas. La solución empleada, más que simular las condiciones fisiológicas, representa específicamente la composición inorgánica del fluido fisiológico.[83] Durante las 4 semanas de síntesis espontánea, la solución no fue movida, ya que es necesario que el proceso de difusión de las especies involucradas hacia los núcleos nacientes sea lo más lenta posible, para aproximarse en la mejor medida al proceso de cristalización *in vivo*, que es lento.[83]

El proceso de síntesis biomimético se aplicó a placas de titanio lisas y recubiertas con nanotubos de dióxido de titanio. La observación macroscópica de los resultados (Figura 51) muestra la ausencia de depósito sobre la placa lisa, y la formación de un depósito homogéneo sobre la superficie nanoestructurada. Vale la pena notar también que la superficie de titanio lisa presenta signos evidentes de corrosión, dado por el cambio de coloración de la superficie.

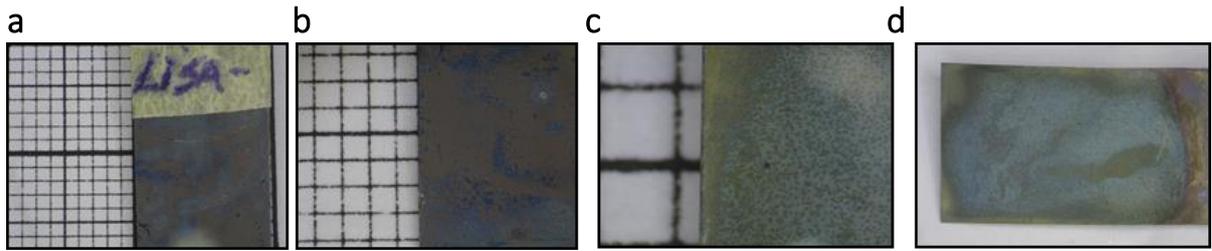


FIGURA 51. RESULTADOS MACROSCÓPICOS DE LOS DEPÓSITOS OBTENIDOS SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS DE TITANIO. (A) Y (B) PLACA LISA, (C) Y (D) PLACA DE TITANIO CUBIERTA CON NANOTUBOS DE TiO_2 .

Una mejor aproximación para caracterizar la morfología superficial se obtuvo por microscopía confocal (Figura 52). Para la placa lisa se muestran el estriado característico de las superficies lijadas y pulidas, sin evidencias de depósito alguno. Por su parte, la superficie nanoestructurada muestra un patrón de depósito de esferas/discos de menos de $10\ \mu\text{m}$ de diámetro. Cabe destacar la homogeneidad del depósito observado, así como el grado de recubrimiento alcanzado por el mismo.

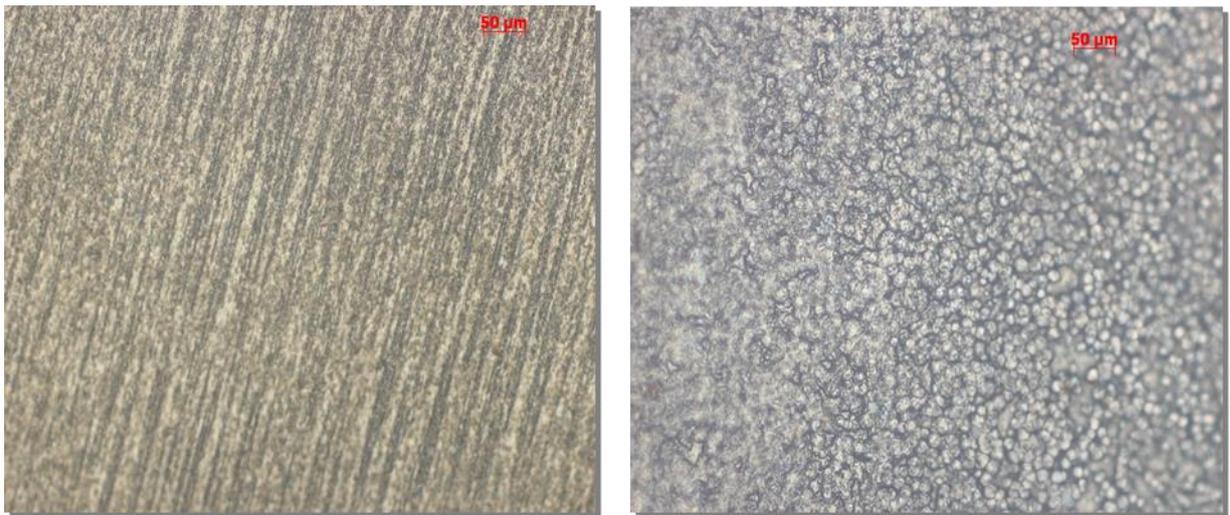


FIGURA 52. IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LA SUPERFICIE DE TITANIO LISO (IZQUIERDA) Y NANOESTRUCTURADO CON NANOTUBOS (DERECHA) LUEGO DE SER SOMETIDAS AL MÉTODO BIOMIMÉTICO DE SÍNTESIS SUPERFICIAL DE HIDROXIAPATITA. IMÁGENES OBTENIDAS EN LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, CON LA COLABORACIÓN DEL DR. ARTURO PLATA.

Las imágenes tridimensionales confirman la formación del depósito sobre la superficie nanoestructurada (Figura 53).

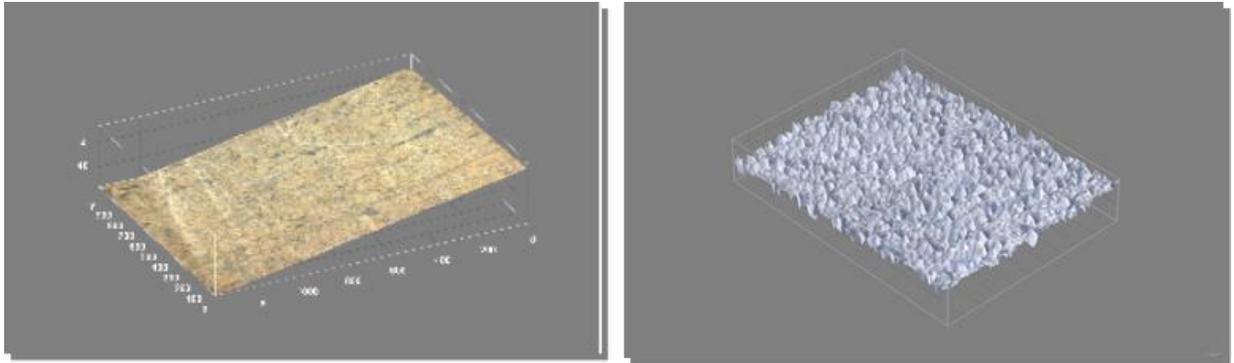


FIGURA 53. IDEM 52, EN IMAGEN TRIDIMENSIONAL.

La observación definitiva a nivel micro y nanoscópico se llevó a cabo por SEM sobre las mismas muestras. Para la superficie de titanio lisa (Figura 54) se observan formaciones tipo placas irregulares superpuestas, que parecen describir más desprendimientos de placas metálicas que depósitos.

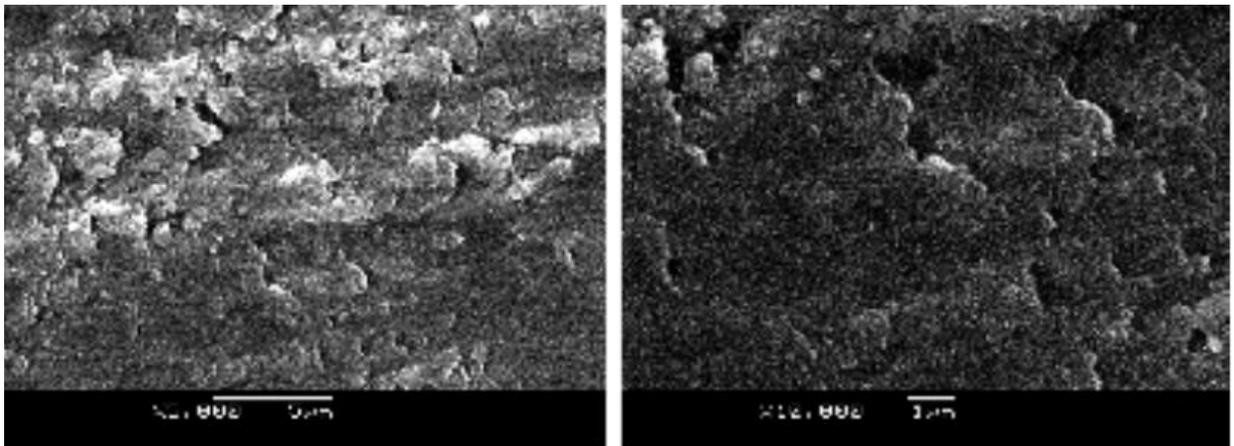


FIGURA 54. MICROGRAFÍAS SEM DE LA SUPERFICIE DE TITANIO LISA LUEGO DE SER SOMETIDA AL PROCESO BIOMIMÉTICO DE SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS.

Para la superficie nanoestructurada de titanio, sí se observan depósitos de estructuras regulares, con un buen grado de recubrimiento superficial (Figura 55). Bajo la menor magnificación (x250), el depósito se revela como agrupaciones redondeadas de ca. 10 μm de diámetro que cubren casi por completo la

porción de superficie analizada. Una magnificación mayor (x2.500) muestra que estas estructuras se encuentran próximas unas con otras, y que tienen su superficie cubierta por estructuras menores que se observan como “hojuelas” de apariencia desordenadas que forman depósitos de arreglo semiesférico similares a colonias bacterianas. A una magnificación de x7.500 se observa que estas “hojuelas” son en realidad placas dispuestas perpendicularmente a la superficie sin un aparente orden. A la mayor magnificación ensayada (x15.000) no se identifica el arreglo observado a mayor magnificación y por el contrario se presenta la ausencia de un patrón de ordenamiento definido para estas placas, así como su disposición perpendicular a la superficie. Las láminas son irregulares, de 1 μm de ancho, y con un espesor de tamaño nanométrico.

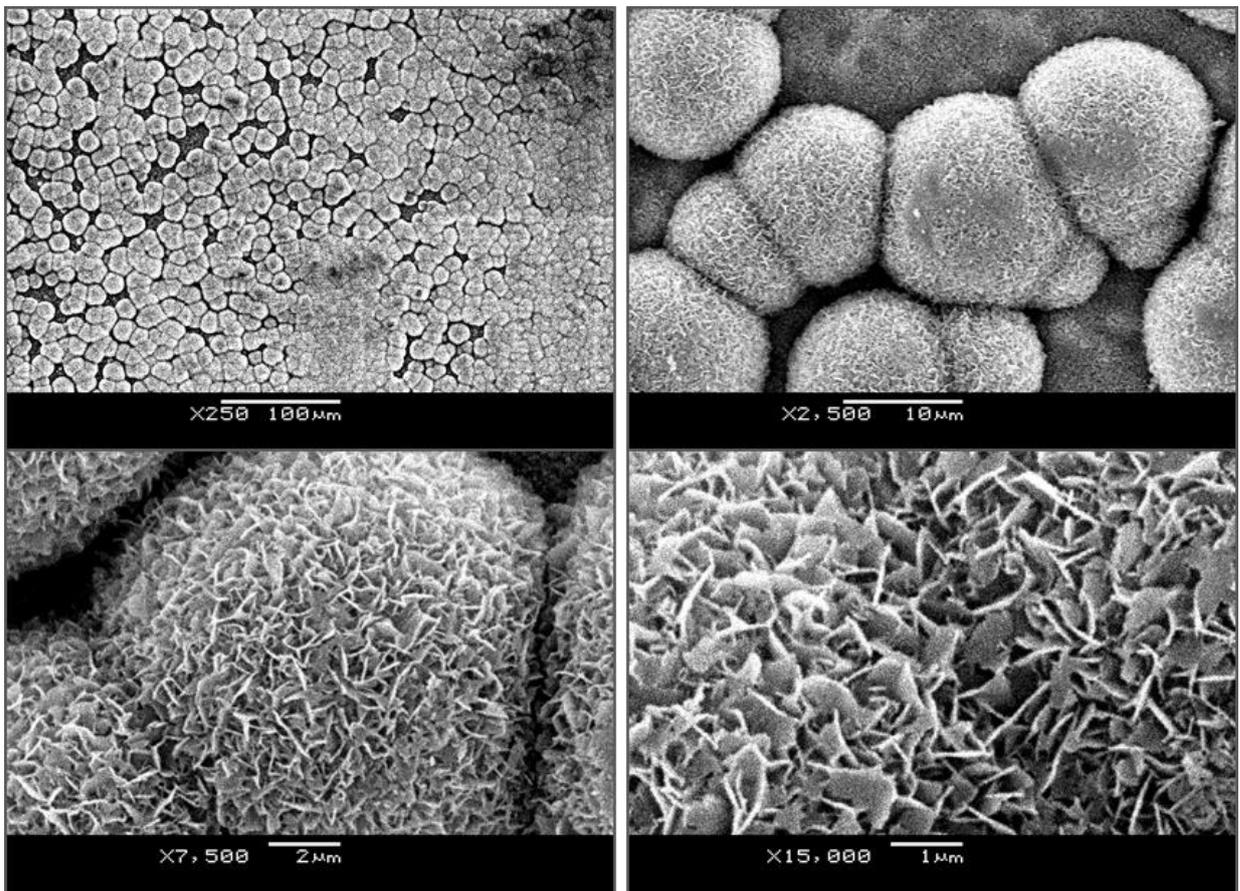


FIGURA 55. MICROGRAFÍAS SEM DE LA SUPERFICIE DE TITANIO NANOESTRUCTURADO LUEGO DE SER SOMETIDA AL PROCESO BIOMIMÉTICO DE SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS. LAS IMÁGENES CORRESPONDEN A ACERCAMIENTOS PROGRESIVOS DENTRO DE LA MISMA REGIÓN ANALIZADA (DE ARRIBA ABAJO Y DE IZQUIERDA A DERECHA)

La confirmación final de la formación de hidroxiapatita se obtiene del análisis por XRD. Los espectros de difracción de rayos X para ambas superficies luego del proceso de deposición biomimético muestran algunas diferencias muy interesantes. Por un lado, en el caso de la superficie de titanio lisa (Figura 56) se

obtienen los picos característicos para el Titanio, la ausencia de picos para el TiO_2 , y la presencia de picos de intensidad muy débil para la hidroxiapatita, junto con la presencia importante de un componente que puede corresponder al octacalciofosfato (OCP). Por otra parte, cabe notar que las señales atribuibles a la hidroxiapatita están prácticamente ausentes, por lo que se puede concluir que el depósito formado sobre la chapa de Titanio lisa corresponde a OCP.

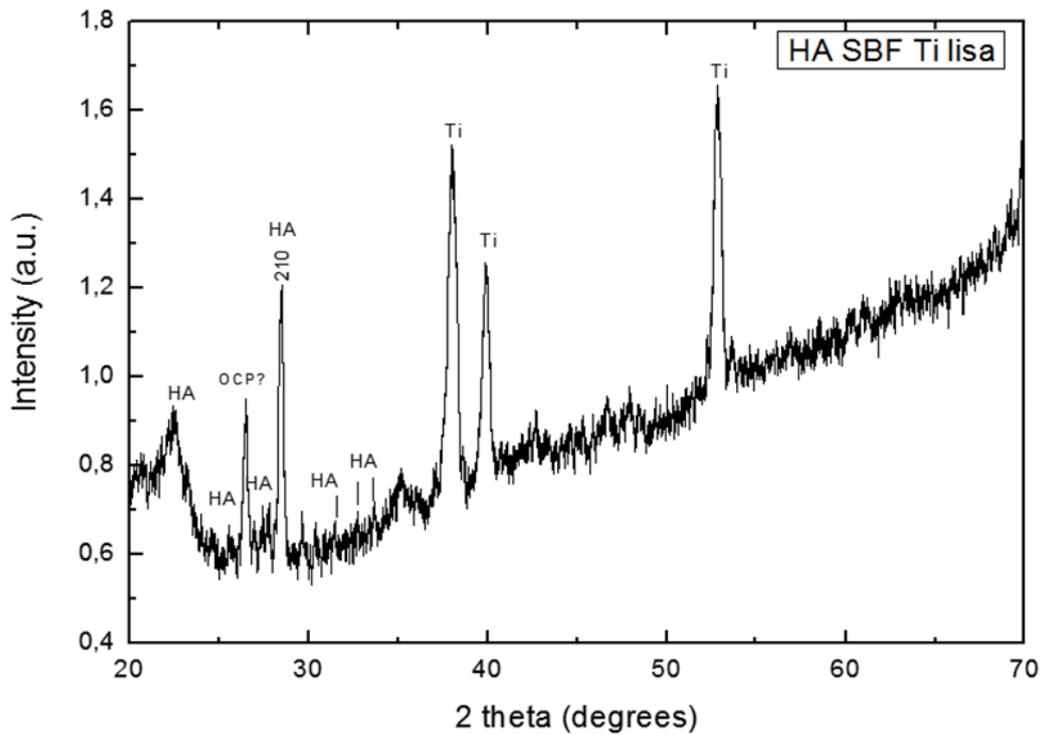


FIGURA 56. PATRÓN DE XRD PARA LA SUPERFICIE DE TITANIO LISA LUEGO DE SER SOMETIDA AL PROCESO BIOMIMÉTICO DE SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS.

En el caso de la deposición biomimética sobre la superficie de nanotubos de TiO_2 produce un depósito de hidroxiapatita nanocristalina (Figura 57), con un tamaño de cristalina de 25 nm (medido a partir del plano 210). En este caso, la presencia de OCP es menor, lo que indica que en el proceso de formación de la hidroxiapatita sobre titanio, el mecanismo involucra la formación del intermediario OCP, pero en el caso de las superficies recubiertas con TiO_2 (nanoestructuradas), la reacción llega a su fin, mientras que en las superficies lisas, la reacción se detiene en el OCP.

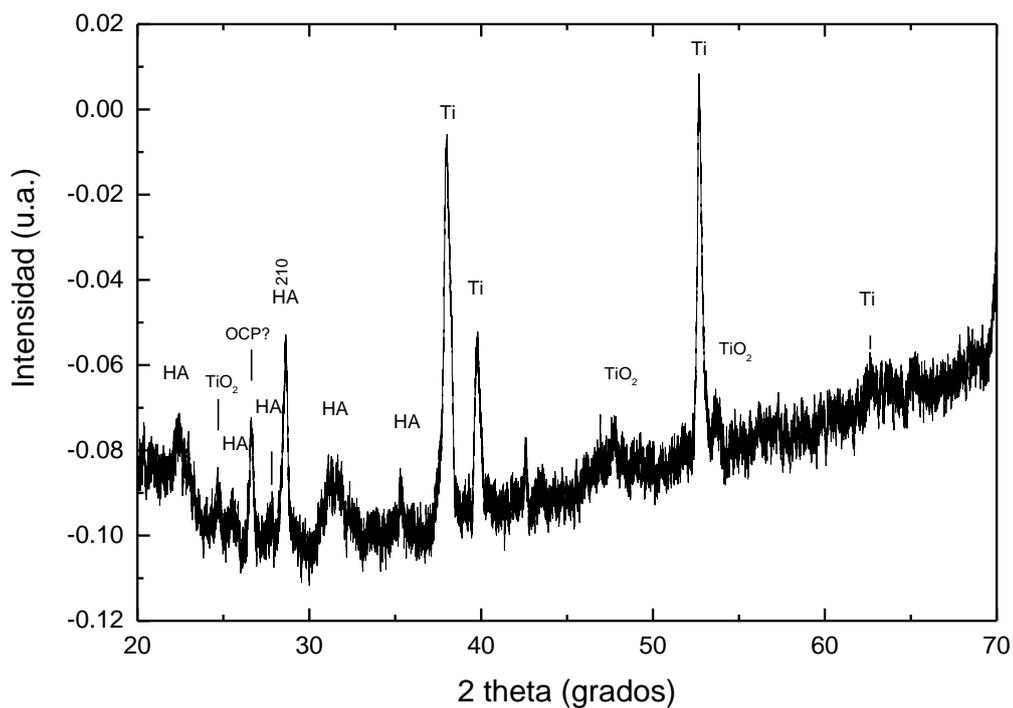


FIGURA 57. PATRÓN DE XRD PARA LA SUPERFICIE DE TITANIO NANOESTRUCTURADO LUEGO DE SER SOMETIDA AL PROCESO BIOMIMÉTICO DE SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITAS.

Uno de los estudios clave que se realizaron corresponde al de adhesión de la hidroxiapatita depositada sobre la superficie metálica. Una de las características que debe cumplir un biomaterial es la osteointegración que permite que el material se integre en el hueso disminuyendo los riesgos al rechazo del implante. Esto puede minimizarse mejorando la adhesión entre el recubrimiento del implante (hidroxiapatita), y el metal de base (titanio). Para determinar cuál de las metodologías de recubrimiento empleadas era la más apropiada para este fin, se realizaron los estudios de adhesión. Éste consiste en someter a las muestras a la acción del ultrasonido durante 3 min y observar el grado de firmeza y adhesión del depósito formado.

Los resultados demostraron que se logra una mejor adhesión cuando el recubrimiento es parejo y de bajo espesor. Para el caso del recubrimiento obtenido por el método electroforético, sobre titanio liso (Figura 58) se observa en la placa de la izquierda el recubrimiento de hidroxiapatita realizado por método electroforético. Luego de la prueba de adhesión se obtiene la muestra de la derecha en la cual el recubrimiento se ha desprendido por completo. La línea azul identifica la zona hasta donde se depositó el recubrimiento.

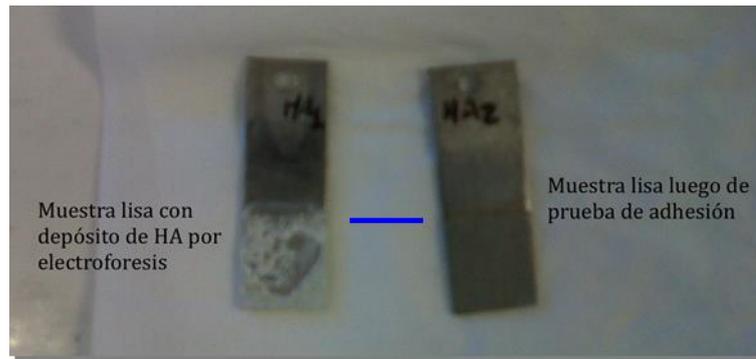


FIGURA 58. MUESTRAS DE TITANIO LISO ANTES (IZQUIERDA) Y DESPUÉS (DERECHA) DEL ENSAYO DE ADHESIÓN.

De la misma forma se analizaron las muestras con recubrimiento de hidroxiapatita por el método biomimético. En este caso tanto para la placa lisa como la superficie nanoestructurada presentaron un buen grado de adhesión.

Este estudio permitió determinar que a través de la síntesis química se puede obtener una HA capaz de ser sustituida por la HA de síntesis biomimética. Sin embargo el método de deposición no permite una adhesión de la misma con el sustrato y por tanto es fácilmente desprendible, perdiéndose gran parte del recubrimiento durante la manipulación de las muestras. A los efectos de mejorar la adhesión se probó realizar un pre-tratamiento de las mismas con NaOH y otras con HF, lo cual no arrojó resultados positivos.

Finalmente, a las muestras 17, 19 y 30 obtenidas por el método OMA se les realizó el mismo tratamiento de síntesis de hidroxiapatita biomimética que a las muestras de titanio liso y nanoestructurado. Como se describió anteriormente, éste fue el mejor recubrimiento hallado en cuanto a homogeneidad del depósito y adhesión. Las muestras permanecieron durante un mes en solución SBF (según protocolo de Materiales y Métodos) a 37°C y a pH de 7.42.

Las muestras fueron analizadas por SEM (Figura 59), luego de una inspección visual. En ambos casos, no se pudo verificar la formación de un depósito de hidroxiapatita. Si bien no se depositó HA sobre las muestras tratadas con OMA, el medio simul fluido biológico no altera la superficie modificada del material, manteniendo las características morfológicas.

Frente a estos resultados, se confirmó la presencia de hidroxiapatita en las muestras de titanio liso y nanoestructurado, pero no así en las muestras de OMA. De hecho éstas últimas no presentaron depósito de ninguna especie de Ca y P. De las muestras lisas y nanoestructuradas, se comprobó que se obtenía una mejor estructura cristalina y de dimensiones nanométricas cuando el sustrato es nanoestructurado. Al comparar la síntesis del recubrimiento por electroforesis o síntesis biomimética, se comprobó que aquellas muestras sintetizadas por método biomimético presentaban un mejor recubrimiento y una mayor adhesión.

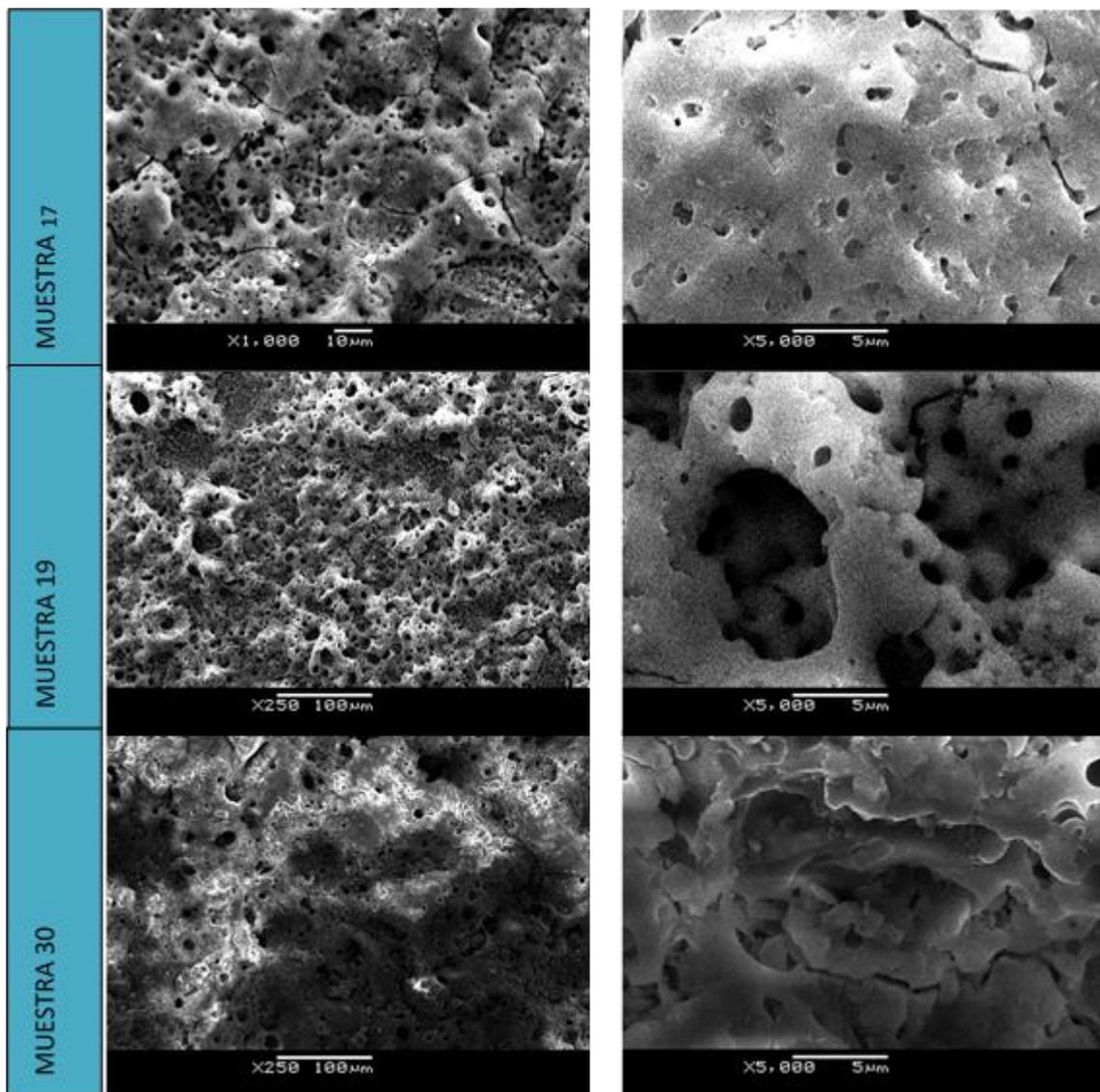


FIGURA 59. IMÁGENES SEM DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS POR OMA Y SOMETIDAS A LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE HIDROXIAPATITA POR EL MÉTODO BIOMIMÉTICO DURANTE 1 MES EN SBF A 37 °C Y PH 7.43.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en el Capítulo 3 serán discutidos aquí en el siguiente orden, de manera de aportar a la discusión acerca de las hipótesis de trabajo presentadas en esta Tesis. En primer lugar (Sección 4.1) se discutirán los resultados relacionados con las evidencias experimentales presentadas en la Sección 3.1 acerca de la necesidad de nanorugosidades para que los eventos de bioreconocimiento tengan lugar. Esta discusión se centrará en la caracterización de un biomaterial como un objeto biológico, aportando una nueva visión a la fabricación de biomateriales. Posteriormente (Sección 4.2) se discutirán aquellos aspectos mecánicos y estructurales que dan cuenta de las nuevas superficies nanoestructuradas de titanio que fueron sintetizadas. Se discutirá también la información que puede obtenerse a partir de las técnicas instrumentales empleadas, y se elaborarán algunas primeras conclusiones acerca de las dimensionalidades de las superficies obtenidas. Seguidamente (Sección 4.3) se discutirán los métodos de formación de las hidroxiapatitas sobre las superficies nanoestructuradas, en función de la nanoestructuración de las mismas y de la adhesión. Los resultados serán discutidos en función de la hipótesis de trabajo acerca de la necesidad de dos dimensiones diferentes para caracterizar a los biomateriales, para aportar a su comprobación o no. Finalmente (Sección 4.4) los resultados en su conjunto serán discutidos en comparación con otros trabajos consultados en la literatura reciente, y se establecerán las perspectivas para su continuación.

4.1. EL EVENTO DE BIORECONOCIMIENTO

Los resultados obtenidos entre la interacción del citocromo c y la superficie de Au|TBA demostró que la complementación topográfica, a nivel nano, resulta determinante para maximizar el fenómeno de bioreconocimiento. Existen varios aspectos involucrados en estos resultados, que discutiremos a continuación.

4.1.1. LA SUPERFICIE AU|TBA: BIOMIMESIS DE LA CITOCROMO C OXIDASA

Las principales características de la monocapa autoensambladas de TBA sobre electrodos de Oro policristalino (Au pc) sugieren que se trata de una superficie ideal para llevar a cabo el estudio planteado (Tabla 24) [84]. Se trata de una monocapa densa y compacta, con una concentración superficial de 0.96×10^{15} moléculas cm^{-2} , comparable con la máxima concentración teórica de 1.0×10^{15} moléculas cm^{-2} . Esta densa monocapa produce una modificación en las propiedades de mojado de la superficie, que pasa de 64.5° para el Au pc a 46.1° para el Au|TBA, es decir, más hidrofílica. A pesar de este alto grado de recubrimiento, la capacidad de transferir electrones a través de la interfase no se ve modificada cuando se compara con la superficie de Au pc sin recubrir. De hecho, frente a la reacción redox en solución para la cupla $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2}$, la velocidad de transferencia de carga es de 0.21 cm s^{-1} , comparable con el valor de 0.25 cm s^{-1} obtenido para la misma reacción pero sobre Au pc. Estos valores indican que la presencia de la monocapa de TBA autoensamblada sobre Au pc no representa un impedimento para la transferencia electrónica, lo cual se debe al bajo valor para la constante de tunelado electrónico, 0.35 \AA^{-1} , el más bajo reportado hasta la actualidad.

TABLA 24. PROPIEDADES DE LA MONOCAPA AUTOENSAMBLADA DE ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBA) SOBRE UNA SUPERFICIE DE ORO POLICRISTALINA. ADAPTADO DE REF.[84]

PROPIEDADES	VALOR	
Concentración superficial de TBA sobre Au <i>pc</i>	0.96×10^{15} moléc. cm^{-2}	
Ángulo de contacto	46.1 °	
Comportamiento ácido-base	pK ₁	1.874
	pK ₂	10.16
Dimensión superficial	por voltametría cíclica	2.17
	por espectroscopía de impedancia	2.18
Velocidad de transferencia de carga (para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$)	0.21 cm s^{-1}	
Constante de decaimiento de tunelado	0.35 \AA^{-1}	
Capacidad del dieléctrico formado por el TBA sobre Au <i>pc</i>	67 \mu F cm^{-2}	
Constante dieléctrica de la monocapa de TBA adsorbida sobre Au <i>pc</i>	38	

Todas las características mencionadas son importantes, ya que indican que la presencia de TBA sobre la superficie no resultará un impedimento para la transferencia electrónica, y por lo tanto, es posible usar métodos electroquímicos para evaluar la hipótesis de trabajo. Por otro lado, no se debe olvidar que esta monocapa posee una dimensión superficial de 2.17, medida por dos técnicas electroquímicas independientes, una electrodinámica (voltamperometría cíclica) y otra electrostática (espectroscopía de impedancia electroquímica).[84] Este valor de dimensión superficial es del mismo orden que el obtenido para el citocromo c.

Cuando la superficie de Au|TBA se pone en contacto con la solución de citocromo c (a potencial abierto), se produce una rápida adsorción espontánea. De acuerdo con los resultados de balanza de cuarzo, esta adsorción resulta en la formación de una densa monocapa, del orden del predicho por cálculos teóricos basados en las dimensiones reportadas para el citocromo c. Adicionalmente, la monocapa proteica formada resultó electroactiva, ya que empleando la Ley de Faraday, la concentración superficial calculada resultó ser la misma que la derivada de los experimentos de balanza de cuarzo. Finalmente, el hecho de que el potencial redox para el citocromo c resultara igual al reportado para esta proteína en medio acuoso, es indicativo de que la funcionalidad de la proteína no se perdió debido al proceso de adsorción. La comparación de los resultados obtenidos con el Au|TBA y los reportados para otros tioles (Tabla 25) demuestran que la superficie empleada en este trabajo da lugar a los resultados más similares al comportamiento del citocromo c *in vivo*.

Cuando se comparan estos resultados con los reportados en la literatura empleando otros tioles queda claro que la interface creada ha resultado ideal para que el citocromo c no perdiera sus características principales. De alguna manera, la superficie Au|TBA resulta biomimética con la ofrecida por la enzima citocromo c oxidasa, al ofrecer una plataforma de interacción en la que el citocromo c pudiera llevar a cabo su función (intercambio electrónico) sin alteraciones.

TABLA 25. TABLA COMPARATIVA DE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES DE DIFERENTES MONOCAPAS REPORTADAS EN LA LITERATURA EN COMPARACIÓN CON LA DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO. SE MARCAN AQUELLOS ANTECEDENTES REPORTADOS CON LOS VALORES MÁS PRÓXIMOS A LA IDEALIDAD.

Modificador superficial	Γ (pmol cm⁻²)	WHM (mV)	k_{ET} (s⁻¹)	E° (mV)	Interacción
<i>Monocapas terminadas en grupo piridina (Py)</i>					
PyC ₁₆ /C ₁₅	---	---	42	-142	Union al hemo
PyC ₁₂ /C ₁₁	---	---	1700	-144	Union al hemo
PyC ₁₁ /C ₁₀	---	96	2500	-148	Union al hemo
PyC ₆ /C ₅	---	---	2400	-162	Union al hemo
<i>Monocapas mixtas</i>					
C ₁₅ COOH/C ₁₅ OH	1.5	92.3	2.5	---	electrostática
C ₁₅ COOH/C ₁₄ OH	---	100	0.39	+23	covalente
C ₁₁ COOH/C ₁₁ OH	---	98	53	+27	covalente
Ac. tioctico / amida	9.2	91	15.8	-32	electrostática
<i>Monocapas de alquiltioles</i>					
C ₁₅ COOH	---	---	0.22	-7	electrostática
C ₁₀ COOH	28	---	7.2	---	covalente
	10		---	+40	electrostática
C ₂ COOH	10	---	1450	+55	electrostática
C ₂ SO ₃	5.9	---	100	+58	electrostática
C ₂ OH	3.5	---	800	+56	electrostática
C ₁₃ COOH	14.2	127	2.0	-14	electrostática
C ₁₁ N ⁺ (Me) ₃	16	---	---	+130	electrostática
C ₁₁ CH ₃	14.5	---	---	-320	electrostática
Cx ϕ -OH	28	---	3.3	+120	Puente de H
AC. TIOBARBITÚRICO (TBA)	30	90	38	66	Puente de H

4.1.2. ¿NANOTOPOGRAFÍA O QUÍMICA?

La descripción topográfica de la superficie de Au|TBA y del citocromo c fue, en ambos casos, a nivel nano, por lo que los valores de rugosidad dado por las dimensiones superficiales, y que resultaron ligeramente superior a 2, da cuenta de una nanotopografía complementaria. ¿Es este el único factor operante en el evento de bioreconocimiento? Los resultados comparativos mostrados en la Tabla 25 pueden dar una posible respuesta. Por un lado se observa que no existe una única modificación superficial que logre las características ideales: máxima adsorción superficial (30 pmol cm^{-2}), ancho de medio pico correspondiente a un proceso reversible ($\text{WHM} = 90 \text{ mV}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), potencial redox igual al que se verifica en medio acuoso ($E^\circ = 69 \text{ mV}$) y una alta velocidad de transferencia de carga. Los resultados obtenidos para el ácido tiobarbitúrico están muy próximos a la idealidad de un proceso reversible, manteniendo el potencial en solución. Observando los otros tiores de la Tabla 25 no parece existir una correlación entre la composición química de la monocapa y las características fisicoquímicas a nivel de la interface con el citocromo c; la complementariedad nanotopográfica parece ser decisiva al momento de establecer el fenómeno de bioreconocimiento. Este resultado está de acuerdo con las actuales tendencias en el desarrollo de biomateriales, en el que se está apuntando a la nanoestructura como único factor a considerar para la elaboración del implante. Sin embargo, la química sigue siendo importante, ya que el material que es nanoestructurado no debe inducir un efecto tóxico sobre el organismo.

Otro aspecto a considerar es que los enlaces por puente de Hidrógeno también hayan jugado un papel fundamental. Es sabido la importancia de esta interacción en bioquímica, ya que se trata de una interacción relativamente fuerte (estable) y direccional, lo que permite generar estructuras autensambladas jerárquicas, como las que se observan en la Naturaleza. El ejemplo clásico de este tipo de interacción está dado por la que se establece entre las bases purínicas y pirimidínicas, y que terminan generando estructuras micrométricas como las hebras de ADN. En el caso que hemos estudiado, el hecho que el TBA permanezca neutro al pH de trabajo descarta la posibilidad de interacciones electrostáticas, dejando a los enlaces por puente de Hidrógeno como el único modo de interacción para formar estructuras estables.

En suma, los experimentos preliminares empleando un sistema controlado y bien caracterizado, permitieron demostrar que la complementariedad nanotopográfica juega un papel fundamental en los eventos de bioreconocimiento entre dos superficies. Dado que las proteínas muestran una dimensión superficial en el entorno de 2.2, es lógico pensar que las células presenten un grado de nanorugosidad similar, por lo que es necesario ofrecerles una superficie nanoestructurada para aumentar el grado de adhesión sobre las mismas. Del mismo modo, la interacción entre el sustrato de titanio y las hidroxiapatitas de recubrimiento deberán tener una nanotopografía complementaria para mejorar la adhesión entre ambas superficies. Este es un problema actual en el diseño de implantes, y nuestros resultados sugieren que la interacción entre superficies topográficamente complementarias pueden ser la solución.

4.2. SUSTRATOS DE TITANIO

El Titanio puro y sus aleaciones son de uso frecuente en el diseño de implantes dentales y ortopédicos, debido a sus excelentes características de resistencia mecánica, estabilidad química y biocompatibilidad. Esta última está relacionada con las propiedades de la interface, en términos de su estructura, morfología y composición química.

Uno de los puntos clave para comprobar la hipótesis de trabajo planteada es observar las diferencias que se puedan inducir en la formación de los depósitos de hidroxiapatitas en función de las nanorugosidades de la superficie de titanio. Por ello, se llevó a cabo una caracterización detallada de las superficies de titanio modificadas, y se las comparó con las correspondientes de titanio liso (sin modificar).

Existen varias metodologías para producir la nanoestructuración superficial. En este trabajo de Tesis se ensayaron dos de ellas: la formación de nanotubos de dióxido de titanio, y la formación de estructuras porosas de titanio obtenidas por oxidación por micro arco.

4.2.1. NANOTUBOS AUTOENSAMBLADOS DE ORIENTACIÓN VERTICAL

Los parámetros de voltaje y concentración ácida del electrolito son críticos para la obtención de nanotubos bien definidos. En ese sentido se han optimizado las condiciones de síntesis de los nanotubos variando el tiempo y voltaje de anodizado,[85, 86] la naturaleza del electrolito soporte [10, 87, 88] y el medio de síntesis [10, 87-89]. A los efectos de optimizar el proceso de síntesis, y como fue mencionado en el Capítulo 2, se estudiaron diferentes condiciones de tiempo y voltaje, en un medio glicerol en presencia de iones fluoruro como electrolito soporte, el cual presenta las mejores condiciones de concentración iónica y ácida para la síntesis de nanotubos [82].

Los ensayos se realizaron a una concentración de iones fluoruro de 0.27 M, que de acuerdo con estudios previos, resulta óptima para obtener una capa homogénea de nanotubos bien definidos [90], y siguiendo los lineamientos generales de la técnica reportada por Xiao *et al.* [91] que incluyen una reducción en el uso de reactivos y un diseño de celda más sencillo para el proceso de anodizado. Los nanotubos sintetizados de esta forma son llamados de tercera generación ya que el uso de un medio altamente viscoso (glicerol) evita la fluctuación de la concentración y el aumento localizado del pH [87], promoviendo así la formación de un recubrimiento homogéneo en la superficie del material.

El tiempo de anodizado no resultó un parámetro crítico para la obtención de nanotubos mejor definidos y de diferente tamaño. A mayor tiempo no se incrementó ni el grosor de la pared de los nanotubos, ni el diámetro o altura del recubrimiento. Este comportamiento indica que el sistema alcanzó un estado estacionario en el cual se genera un equilibrio dinámico en el que las velocidades de disolución y de crecimiento del nanotubo se igualan [92]. Por tal motivo se decidió utilizar el menor tiempo de anodizado (210 min). El voltaje también fue estudiado en el rango 10 a 30 V. Los resultados mostraron que el voltaje óptimo estaba dado a los 20 V obteniendo una superficie recubierta de nanotubos bien definidos tal como fue reportado anteriormente por diferentes investigadores en condiciones similares de electrolito [82, 92, 93]. A un voltaje de 30 V algunas regiones de la superficie presentan una estructura irregular producto del quiebre de algunos nanotubos por el alto valor de potencial, quedando trozos de los mismos en la superficie. A ese voltaje las muestras presentaron una superficie irregular similar a la reportada por Reinhardt *et al.* [94] que identifican una estructura esponjosa en forma de coral. Otro factor determinante observado por un grupo de investigadores, sugiere que el incremento gradual del voltaje al inicio de la anodización es crucial para la formación de los poros iniciales (precursores de los nanotubos) en la superficie del material [92]. Este parámetro se tuvo en cuenta y se realizó un incremento gradual del voltaje al inicio de la anodización de 2.5 mV s^{-1} .

La formación de los nanotubos de titanio procede a través de un mecanismo que consta de varias etapas. Diferentes autores han reportado que el proceso de síntesis de los nanotubos se lleva a cabo en 3 etapas [95] o en 4 etapas [88]. Éstas consisten en procesos de disolución/deposición acoplados a reacciones electroquímicas, que lo hacen bastante complejo, por lo que es adecuado considerar las diferentes etapas en forma separada.

La etapa inicial de formación de los nanotubos en el electrolito basado en F^- , es el resultado de 3 procesos que se dan simultáneamente sobre la superficie del metal. El proceso es llamado oxidación de campo asistida del Ti para formar TiO_2 [96]. La oxidación de campo asistida se produce a partir de los iones de Ti del metal en contacto con el electrolito, y la disolución química del Ti y del TiO_2 dada por los iones de F^- y la presencia de O^{2-} proveniente del H_2O . Esta disolución se encuentra favorecida por la presencia de iones H^+ , e irá produciendo un desgaste superficial que será el origen del futuro nanotubo, y que en esta etapa del proceso es un nanoporo.

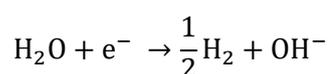
Inicialmente, se forma una capa compacta de óxido en la interface metal|electrolito (doble capa de Helmholtz), donde se concentran las especies iónicas provenientes de la disolución: H^+ , OH^- y F^- . Esto da lugar a un aumento de la corriente, debida al transporte por campo asistido de los iones F^- hacia la interface. En este punto se establece una competencia [90] entre los iones F^- y O^{2-} y se va formando progresivamente la capa de óxido sobre la superficie, lo que provoca una disminución de la corriente debido a la baja conductividad del óxido formado. [88]. En los primeros minutos de la anodización, el crecimiento de la capa de óxido producto del aumento del campo eléctrico se detiene, generándose una capa de grosor estable [90].

La oxidación de la superficie de Ti es gobernada por el potencial de formación del óxido sobre el Ti. Las propiedades electroquímicas de oxidación determinan que un potencial más positivo se relacione con un aumento de la concentración de oxígeno. Dado que el oxígeno es donador de electrones, esto hace que disminuya la concentración de electrones libres y por tanto el potencial decaiga a lo largo del film de óxido [97]. Asimismo, cuando se produce la oxidación de la superficie, la reacción de oxidación de H_2O a O_2 es inhibida con el tiempo, y se deja de observar desprendimiento de O_2 sobre el electrodo.

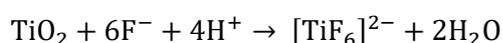
Resulta entonces que la formación del óxido inicial está asociada a la siguiente reacción en el ánodo:



mientras que en cátodo la reacción que tiene lugar genera el desprendimiento de H_2 producto de la reducción del H^+ :



Luego de la etapa inicial de oxidación de la superficie de titanio, comienza la etapa de crecimiento en forma casi simultánea, caracterizada por la disolución química de los óxidos formados [95]:



Esta etapa de disolución es fundamental para la generación de los poros iniciales [89, 95, 98].

Posterior a la etapa de decaimiento de la densidad de corriente, se registra un aumento de la misma producto de la oxidación de Ti a Ti^{4+} con una migración de los iones Ti^{4+} y el O^{2-} a través de la capa de óxido. La presencia de iones F^- forma el complejo soluble $[TiF_6]^{2-}$ en la interface óxido-electrolito. La disminución localizada de la capa de óxido generada por el aumento gradual del campo eléctrico asociado a la disolución del titanio, genera los poros en la superficie.

Durante el proceso de oxidación, los H^+ se acumulan en la superficie metálica. Por efecto electrostáticos, los iones F^- migran a los sitios de H^+ y compiten por los sitios de O^{2-} en el óxido. Cuando la concentración de estos iones alcanzan un nivel crítico en la región local, [99] la disolución del TiO_2 ocurre a través de la formación del complejo $[TiF_6]^{2-}$. Por lo tanto, el crecimiento de los nanotubos queda gobernado por la competición que se establece entre la formación/disolución del TiO_2 y la formación del complejo $[TiF_6]^{2-}$.

Este mecanismo genera una disminución de las cargas positivas y por lo tanto conduce a un aumento en la densidad de carga negativa en el óxido dadas por la formación de $[\text{TiF}_6]^{2-}$. De esta forma se produce la migración a la interface metal/óxido de los H^+ , facilitando la oxidación del Ti. Durante este nivel de anodización los nanoporos son nucleados en la superficie del óxido. Se observa un estado estable del crecimiento de los nanotubos sobre la superficie de óxido cuando la corriente anódica alcanza una meseta [96]. Luego de la anodización se obtiene una capa de nanotubos producto de la incidencia de las líneas de corriente horizontales que ayudan en el proceso de oxidación de la superficie y genera la estructura en forma de tubo. Este fenómeno es llamado auto-ensamblado [90].

Las diferentes velocidades de reacción para las ecuaciones de formación de TiO_2 y del complejo fluorurado conlleva a la generación de una composición diferencial entre la base y las paredes de los nanotubos. Esto también depende de las diferentes tasa de migración del F^- y el O^{2-} . Se ha observado que la base del nanotubo contiene una capa rica en iones F^- debido a que la velocidad de migración de los F^- en la capa de óxido es dos veces mayor que la velocidad de los O^{2-} [96], acumulándose los iones en la interface metal-óxido. Así mismo, debido a la migración de los iones en la capa de óxido, el campo eléctrico generado es mayor que en la superficie de los nanotubos. Esto genera una separación de cargas entre la base rica en F^- (electronegativa) y la superficie de los nanotubos de TiO_2 (electropositiva) [98]. Este hallazgo podría tener incidencia en las propiedades eléctricas del material, como se describirá posteriormente.

Las imágenes de SEM correspondiente a las superficies generadas a 10 V, 20 V y 30 V muestran que sólo se obtiene una superficie homogéneamente recubierta de nanotubos definidos a 20 V. En cambio el tratamiento realizado a 10 V y 30 V no presentó los mismos resultados: a 10 V la estructura que se observa es la de una superficie bajo un tratamiento abrasivo, en este caso provocado por el F^- del electrolito y el campo eléctrico. Se distinguen algunos poros irregulares en la superficie (círculos en rojo), precursores de los nanotubos. La morfología se debe a que la movilidad de los iones a este voltaje, generaron un campo eléctrico en la superficie que no fue suficiente para que se generaran una cantidad mínima de poros iniciales, y el posterior crecimiento de los nanotubos. A 30 V el exceso de voltaje generó un recubrimiento similar a una esponja en la que se distinguen estructuras en forma de anillos debajo de ella (círculo en rojo). En este caso la movilidad de los iones fue mayor, provocando luego del crecimiento de los nanotubos, una capa homogénea que recubre toda la superficie. Así mismo se observan depósitos de material por encima de la capa esponjosa, esto puede deberse a perturbaciones locales del campo eléctrico (flechas azules).

A los 20 V se observa una superficie homogéneamente recubierta de una estructura en forma de nanotubos con una geometría cuasi-ovalada. Esta geometría puede deberse a variaciones de la velocidad de difusión de los iones durante el crecimiento de los nanotubos, causado por las fluctuaciones del voltaje inherentes al equipamiento utilizado. Las paredes de los nanotubos presentan un grosor de 35 nm en promedio y una altura de 1 μm .

Macak *et al.*, [82, 90, 100, 101] caracterizaron la morfología de los nanotubos en diferentes medios y condiciones, e identificaron que el factor determinante del crecimiento de los nanotubos estaba dado por la difusión de los reactivos en la superficie de los nanotubos y en la solución. También demostraron que la temperatura y el tiempo del anodizado eran determinantes en el largo de los nanotubos, ya que durante la síntesis a 40 °C y más de 6 hs, se produce el desprendimiento de los nanotubos del sustrato. En estas condiciones, la viscosidad del medio favorece el crecimiento por auto-ensamblaje de los nanotubos definidos en la superficie del material, a una tasa de crecimiento de 50 nm V^{-1} .

El tratamiento térmico de la superficie modificada con nanotubos de TiO_2 promueve la cristalización de las estructuras generadas. En particular, el tratamiento térmico a 550 °C genera una mezcla de

estructuras cristalinas dominada por la anatasa sobre el rutilo. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de Ge *et al.*, [85] quienes determinaron que la fase anatasa aparece a temperaturas por encima de los 300 °C mientras que la fase rutilo lo hace por encima de los 450 °C. Para temperaturas por encima de los 600 °C, los reportes coinciden en la destrucción de los nanotubos de titanio [85, 102].

El análisis de las muestras por XPS permite determinar los átomos presentes en el material y la estructura química que forman. La mejora en la resolución y sensibilidad de la técnica se debe al efecto que generan los estrictos procedimientos de limpieza empleados, que descartan aquellos elementos que no forman parte de los nanotubos de titanio, y que surgen de la contaminación de la muestra durante la manipulación. Los elementos que se identificaron en la superficie incluyen también a residuos de las sales empleadas durante la síntesis, y que permanecen adheridas o incluídas dentro de los nanotubos. Durante el tratamiento térmico a 400 °C, sólo se observan diferencias marginales en la proporción de N y de F, tal cual fuera observado por otros autores,[102] y que sugiere que se afecta principalmente al NH₄F empleado en la síntesis (la sustancia se descompone a 100 °C). La principal contaminación proviene de la materia orgánica, la cual sólo disminuye drásticamente con el bombardeo con plasma de Ar⁺. Una vez eliminada esta interferencia, el análisis de los porcentajes atómicos permite concluir inequívocamente que la naturaleza química de los nanotubos de titanio corresponde al Ti^{IV}O₂.

A partir de la aplicación de la técnica de EDS se pudo determinar que existen dos composiciones químicas diferentes para la base y la pared del nanotubo. La base del nanotubo presenta mayoritariamente Ti debido a que la síntesis de nanotubos se realizó sobre una placa 99% Ti. En cambio la pared presenta una composición de Ti y O producto de la anodización. Debido a que la altura del recubrimiento es de unas micras, la intensidad de pico para el Ti es notoriamente mayor. Si bien era de esperar la presencia de F [10] la sensibilidad del método de análisis no permitió que los picos de F fueran detectados. Sin embargo cuando se realizó la técnica de XPS (método más sensible), los átomos de F aparecen en un 5.56 %.

La ausencia de átomos de O en la base del nanotubo es interesante, ya que sugiere que la formación de los nanotubos se lleva a cabo en forma lateral. De hecho, se ha demostrado que en las superficies modificadas anódicamente con nanotubos, una vez eliminados los mismos, se observa una capa de titanio (no de TiO₂) que aparece “impresa” donde se encontraban los nanotubos,[101] lo que sugiere que el fondo de los mismos está formado por el sustrato metálico no oxidado.

El análisis de las propiedades de mojabilidad por ángulo de contacto para las superficies anodizadas a diferentes voltajes, permitió determinar las características de mojabilidad de la superficie. En este caso se observó que la estructura de la superficie en forma de nanotubos, genera un recubrimiento hidrofóbico. Más aún, cuando los nanotubos son destruidos (anodización a 30 V), la superficie tiene características hidrofílicas. Estos resultados deben ser analizados desde dos puntos de vista: la hidrofobicidad/hidrofiliidad de la superficie, y la superhidrofobicidad obtenida. La mayoría de los estudios de las propiedades de mojabilidad de las superficies modificadas con nanotubos de titanio concuerdan que las mismas son de naturaleza hidrofílica.

Las propiedades de mojabilidad de la superficie se relacionan con la estructura de la misma. Wenzel [103] y Cassie [104] realizaron estudios sobre el efecto de la rugosidad de la superficie en las medidas del ángulo de contacto. La misma establece que la configuración de equilibrio del líquido sobre una superficie rugosa está dada por la capacidad del mismo de introducirse y seguir la rugosidad de la superficie (Figura 60). De acuerdo a lo establecido por Wenzel la rugosidad mejora la mojabilidad para una superficie hidrofílica, mientras que para superficies hidrofóbicas ocurre lo contrario [66]. Los resultados obtenidos muestran que la formación de los nanotubos corresponden a una superficie superhidrofóbica lo que de acuerdo con la teoría de Cassie-Baxter [104], es asimilable a la superficie con un alto grado de nanoestructuración.

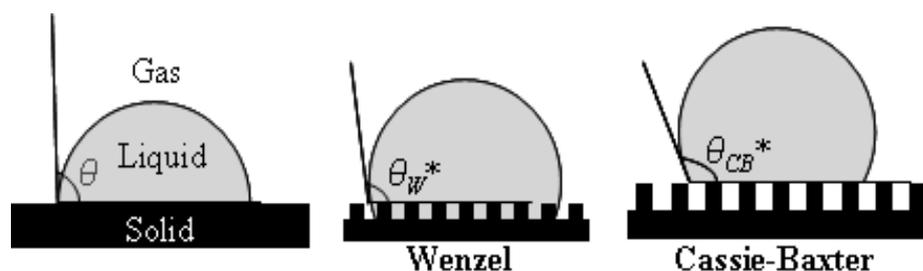


FIGURA 60. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FORMACIÓN DE UNA GOTA LÍQUIDA EN EQUILIBRIO CON EL AIRE Y CON SUPERFICIES DE DIFERENTE RUGOSIDAD

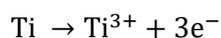
Este hallazgo permite determinar que una superficie nanoestructurada se corresponde con una alta hidrofobicidad, similar a la hallada en la naturaleza como las superficies auto-limpiantes de las hojas de Loto, o el plumaje de los pájaros. Esta característica le brinda al material la propiedad de mayor resistencia a los procesos corrosivos que se pudieran dar en el medio biológico, así como generar una superficie que permita la adhesión de células y crecimiento de estructuras calciformes.

Por otra parte el resultado obtenido está en desacuerdo con los obtenidos por otros autores, que encontraron que la nanoestructuración del titanio da lugar a la formación de una superficie superhidrofílica. Sin embargo, recientes estudios [105] muestran que las superficies de nanotubos de TiO_2 sometidas a tratamiento térmico en el entorno de los $600\text{ }^\circ\text{C}$ dan lugar, al ser almacenadas en aire, a superficies con ángulos de contacto superiores a los 140 ° .

COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA SUPERFICIE

La naturaleza del electrolito soporte juega un rol fundamental en las reacciones redox que tienen lugar en el titanio. Por ejemplo, los iones cloruro forman complejos muy estables con el Ti(IV) , pero no con el Ti(III) , mientras que con los iones sulfato ocurre lo contrario. De esta manera, como los estudios electroquímicos se llevaron a cabo en presencia de iones sulfato, es necesario considerar la formación de especies de Ti(III) en el medio. Adicionalmente, los diferentes cationes empleados en el electrolito soporte, i.e. amonio y sodio, determinan el pH del medio. Las soluciones acuosas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tienen un pH de 5.5, mientras que las de Na_2SO_4 tienen un pH de 7.

En medio Na_2SO_4 , se observa un típico voltamperograma que incluye una corriente anódica con un único máximo a ca. $-1.0\text{ }V_{\text{calomel}}$, que da la transición entre los potenciales activos del metal y los potenciales pasivos. A $E < -1.0\text{ }V_{\text{calomel}}$, las corrientes crecientes que se observan corresponden al proceso de disolución del metal:

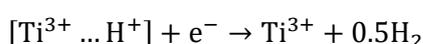
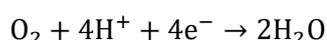
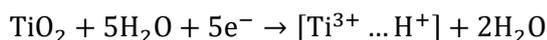


La modificación de la superficie del Ti a través de la oxidación electroquímica genera un semiconductor tipo-n [106]. Las propiedades eléctricas estudiadas por voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica demuestran que la oxidación de la superficie produce cambios en las propiedades de conducción eléctrica diferente en el TiO_2 que al estado en metal puro. Estas propiedades

se asocian con el hecho de que las impurezas generadas en la red del material durante los procesos de oxidación y reducción, actúan de transportadores de carga a lo largo de la superficie.

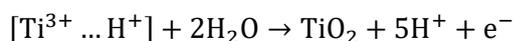
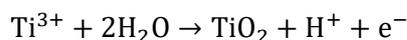
La reducción del Ti^{4+} en el TiO_2 da como resultado la especie Ti^{3+} que se cree es responsable de la conducción eléctrica en el TiO_2 . Esta afirmación surge del hecho que el Ti^{3+} es generado como impureza en el semiconductor durante la reducción anódica. Del estudio realizado, se observaron dos comportamientos bien diferenciados a velocidades altas y bajas, dado por la aparición a velocidades altas de un segundo pico anódico. Por su parte, a bajas velocidades de barrido se identificó un proceso de adsorción reductivo.

Las ecuaciones que dan cuenta de los procesos son:



La reacción de reducción del TiO_2 para formar Ti^{3+} se acopla a un proceso de intercalación de iones H^+ en la red de oxígeno en la superficie del nanotubo. Este proceso de reducción es detectado a velocidades de barrido de potencial entre 20 mVs^{-1} y 80 mVs^{-1} . Simultáneamente se produce la reducción del oxígeno en la superficie de TiO_2 [94], evidenciada a través de la corriente catódica creciente que se observa a los potenciales más negativos.

Finalmente, las reacciones anódicas son el reverso de las reacciones catódicas antes descritas:



En este caso, la superficie presenta un comportamiento interesante en la región anódica. Como se mencionó anteriormente se observan dos picos, uno reversible localizado a un potencial de $-1,205 \text{ V}$ y el segundo pico es irreversible localizado a un potencial de $-0,708 \text{ V}$, ambos con respecto al electrodo de $Ag|AgCl$. Este comportamiento se observa en condiciones ácidas debido a que el potencial redox del TiO_2 es desplazado hacia el potencial ventana del electrolito [94]. Este efecto se observó cuando se realizó la voltamperometría cíclica de la superficie utilizando el electrolito Na_2SO_4 a 0.1 V s^{-1} de velocidad de barrido (Figura 29). En ese caso no se observa el segundo pico anódico ($E_p = -0,708 \text{ V}$) y el comportamiento de la superficie es diferente. Comparando ambas voltamperometrías también se observa un corrimiento del potencial de reducción del H^+ de $-1,30 \text{ V}$ en el electrolito Na_2SO_4 , a $-1,60 \text{ V}$ en $(NH_4)_2SO_4$ (Figura 26). Este comportamiento está dado por el efecto del pH del medio que provoca cambios en el comportamiento eléctrico del material. Si bien las medidas fueron realizadas en condiciones atmosféricas, la densidad de corriente de reducción del oxígeno es despreciable, debido al dominio de los dos picos de reducción del titanio.

PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS SUPERFICIES POR EIS.

COMPORTAMIENTO DE LA LÁMINA DE TI

Las medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica permiten determinar las reacciones de oxidación y reducción de la superficie en estudio así como los procesos de adsorción y difusión de las especies generadas. El estudio de la superficie de Ti lisa permitió distinguir dos comportamientos diferenciados que se relacionan con dos estructuras que componen la superficie del material. En la región

de potencial comprendida entre 0 y -0.7 V se observa un comportamiento de la superficie característico de un capacitor CPE (Figura 34) debido a la presencia de un recubrimiento de una capa pasivante de óxido generada por el contacto con el aire. Por el contrario, en la región de potenciales más negativos comprendido entre -0.8 y -1.3 V, el sistema ingresa en la zona de desprendimiento de hidrógeno la cual favorece la remoción del óxido remanente en la superficie, dejando el metal al descubierto. En esta región la superficie se comporta como un capacitor puro C en el circuito equivalente.

En la región de potenciales entre -0.5 y -0.7 V se observa un comportamiento diferencial que no fue posible representar por los circuitos equivalentes propuestos. Esta zona de transición podría deberse a que la proporción de superficie recubierta de óxido, y de metal sin recubrir, son equivalentes y por lo tanto no se observa la prevalencia de un circuito sobre otro. En esta región la superficie tiene un comportamiento dual.

COMPORTAMIENTO DE LA LÁMINA DE Ti CON RECUBRIMIENTO DE TiO₂

En el estudio del comportamiento de la superficie modificada con nanotubos de TiO₂, también se observa un comportamiento diferencial en el rango de potencial analizado. En este caso el comportamiento se debe a los procesos que se dan en la superficie de los nanotubos y los que se dan en la base de los mismos. Ambos comportamientos fueron representados por dos circuitos equivalentes. En el caso de la superficie de los nanotubos el comportamiento se asocia a un capacitor CPE debido a la presencia de óxido que forma parte del TiO₂ de los nanotubos. La representación de este circuito se mantuvo a potenciales más negativos correspondientes a la zona de desprendimiento de H₂. Este resultado permitió determinar la respuesta homogénea de la superficie a los cambios de potencial y la estabilidad por medio de la adhesión de la superficie al sustrato.

A partir de este estudio se pudo determinar un comportamiento diferencial entre la superficie de los nanotubos y la base interna del mismo. En la superficie de los nanotubos se estarían dando procesos difusionales entre el TiO₂ y los iones del electrolito. Debido a las líneas de corriente esto genera un campo eléctrico en la superficie de los nanotubos favoreciendo esta difusión. En cambio en el interior de los nanotubos el campo eléctrico generado es menor, sólo registrándose el comportamiento resistivo de la solución de electrolito y las propiedades capacitivas del material. Con estos resultados, se demostró que la técnica de EIS se puede utilizar para estudiar, de manera diferencial, el comportamiento de la superficie y de la base de los nanotubos.

4.2.2. TITANIO TRATADO CON OXIDACIÓN POR MICRO ARCO (OMA)

El tratamiento de superficies por Oxidación por Micro Arco (OMA) es una técnica ampliamente empleada en la generación de superficies microporosas de TiO₂ en sustratos de titanio puro y comercial. Esta nueva superficie suele ser porosa y permanece firmemente adherida al sustrato. La técnica de OMA también tiene la posibilidad de incorporar Ca y P en la capa superficial, cuando se controla la composición del electrolito.

Las muestras analizadas fueron sintetizadas por OMA bajo licencia de patentamiento del electrolito utilizado. La formación de la capa cumple con las siguientes etapas que se detallan en la Figura 61.

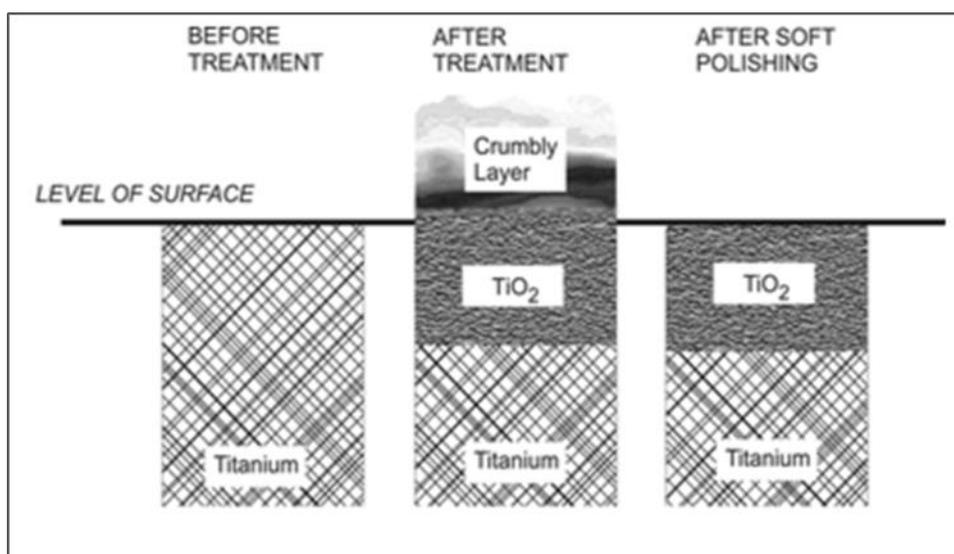


FIGURA 61. ESQUEMA DEL PROCESO PROPUESTO PARA LA FORMACIÓN DE LA CAPA POROSA DE TiO_2 SOBRE LA LAMINA DE TITANIO PURO. ESQUEMA PREPARADO POR EL DR. PIOTR TSYGANKOV Y DR. ANDREI PAVLOV.

El micro arco es generado por la aplicación de un voltaje a la solución de electrolito que supera cierto límite produciendo la ruptura dieléctrica de la capa de TiO_2 de la superficie del sustrato de titanio. Los iones positivos del titanio y los iones OH^- del electrolito se mueven rápidamente en direcciones opuestas, dando lugar a la formación de nuevo TiO_2 . Este procedimiento se repite dependiendo del espesor de la capa porosa que se quiera obtener. Luego del tratamiento se realiza un pulido suave empleando ultrasonido, para quitar excedente de electrolitos de la superficie e impurezas. Esta nueva capa de TiO_2 es diferente a la que se puede formar en forma dinámica en un barrido de potencial: suele ser más porosa y encontrarse firmemente adherida al sustrato, lo cual representa una ventaja para su empleo en la fabricaciones de implantes de sustitución ósea [27]. Otra ventaja del procedimiento de oxidación por micro arco es la posibilidad de incorporar Ca y P en la capa superficial, controlando la composición del electrolito [107, 108].

El procedimiento empleado para obtener las muestras analizadas en este trabajo surge de una modificación creada por los Drs. Tsygankov y Pavlov, de la Universidad Bauman de Moscú, y que cedieron sus muestras para su caracterización y uso en este trabajo de Tesis. Entre las modificaciones planteadas por el grupo de investigadores rusos, está el uso de un circuito de pulso de capacitancia, que trabaja al mismo tiempo como una resistencia de lastre reactiva (reactive ballast resistance) y como un acumulador de energía. Esto hace que la chispa tenga una mayor potencia, dando lugar a recubrimientos más delgados y porosos. Las etapas más relevantes involucradas en el proceso OMA se detallan en la Figura 61. Luego del tratamiento, se realiza un pulido suave empleando ultrasonido, para el acabado final.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y QUÍMICAS DE LOS DEPÓSITOS OBTENIDOS

Las imágenes SEM (Figura 37 y 38) revelan la formación de una superficie suavemente ondulada, salpicada por una distribución homogénea de poros de diámetros submicrométricos. Esta formación porosa provocada por el medio abrasivo y el voltaje empleado, concuerda con lo reportado por otros autores [109, 110]. Esta modificación se genera a partir de partículas depositadas en la superficie durante la oxidación [111]. Inicialmente se produce la disolución localizada en la capa de óxido a partir de las partículas y la interconexión de las mismas generan el poro.

Las tres muestras tratadas a diferentes tiempo y en el mismo electrolito presentan una composición relativa de átomos similar entre sí, tanto en el análisis de la superficie como del corte de perfil. En los tres casos la relación de O y Ti en la superficie del material es de 2:1, mientras que el porcentaje de Ti en el centro del material (sustrato) es de 99 %. Átomos como el Fe, Zn, Al, Ca, K, Pt y Si se encuentran en forma de trazas, representando entre 1 y 0.01 % del total de los átomos de la superficie. La distribución de F y P en las muestras analizadas se observan principalmente en la superficie oxidada. También se encontraron átomos de P posiblemente bajo la estructura de PO_4 en la cara interna de la capa de óxido. Si bien las especies de P migran más lentamente que los iones O^{2-} , los poros iniciales generados en la superficie sirven de pasaje para el electrolito a la capa interna del recubrimiento de óxido. Comparando estos resultados con la síntesis de nanotubos, la mayor variante entre la anodización electroquímica y la OMA, es el voltaje aplicado en ambos métodos. En el primer caso un voltaje menor y una mayor viscosidad del medio permiten un crecimiento homogéneo y controlado de los nanotubos. En cambio en el caso de OMA el método es más agresivo, generando huecos en la superficie producto de la oxidación. De todas formas como los electrolitos principales que participan en la reacción son los mismos, es de esperar que las reacciones que se den de oxidación sean semejantes en ambos métodos.

El estudio de la proporción de los átomos de Ti, O y Ca muestra que el agregado de CaO como sustituto de TiO_2 no arrojó los resultados esperados y por el contrario el porcentaje hallado en la superficie de la muestra es de 0.93% con respecto al total de átomos presentes. Sin embargo el porcentaje de Ti en la misma muestra fue de 22%. Este resultado permite afirmar que el Ca no sustituyó al Ti para formar CaO. Además permite deducir que el Ti del TiO_2 de todas las muestras pertenece al sustrato y no al agregado de TiO_2 al electrolito.

Una de las características de los compuestos biomiméticos de minerales de calcio, es la relación entre Ca/P de los depósitos. Ese valor se ha encontrado que es de 1.67 para generar un recubrimiento biocompatible. En estudios anteriores se ha encontrado que la relación de Ca/P en la superficie modificada por ésta técnica, aumenta de 1.3 a 1.8 con el aumento de voltaje aplicado [110]. Sin embargo, en la muestra analizada no se encuentra esa relación y por el contrario el valor hallado se encuentra entre 0.03 y 0.18. Estos resultados permiten suponer que la biocompatibilidad de este material sería muy baja.

4.3. RECUBRIMIENTO DE HIDROXIAPATITA

La literatura describe una amplia variedad de técnicas de síntesis de hidroxiapatitas, lo que permite elegir entre ellas según los objetivos perseguidos en el trabajo. La formación de hidroxiapatitas estequiométricas a partir de sus precursores es un proceso espontáneo ($\Delta G < 0$), con un cambio entálpico exotérmico ($\Delta H < 0$) determinado por el calor liberado durante la formación de los cristales, y un término entrópico desfavorable ($T \cdot \Delta S < 0$) debido a la formación de un sistema cristalino a partir de precursores en solución (Tabla 26) [112].

TABLA 26. PROPIEDADES TERMODINÁMICAS PARA LA SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA ESTEQUIOMÉTRICA

	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	T. ΔS (kJ mol ⁻¹)
HIDROXIAPATITA ESTEQUIOMÉTRICA	-12674	-13477	-806

El proceso tiene una cinética lenta, por lo que un aumento de la temperatura de la síntesis lo favorecería. Si bien esta mayor temperatura favorece el término entrópico pueda inhibir la síntesis es llevarla a cabo a una temperatura por encima del ambiente, pero como se desprende de los datos de la Tabla 26, la incidencia del término entrópico es despreciable. Por ese motivo, el uso de temperaturas moderadas es habitual en la síntesis de hidroxiapatitas, demostrando una incidencia muy favorable en la cinética [113].

Las propiedades termodinámicas observadas para la síntesis de hidroxiapatitas estequiométricas no difiere de las hidroxiapatitas nanoestructuradas, no maduras (Figura 62). De este modo, desde el punto de vista energético (termodinámico) no existen impedimentos para la síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas, por lo que la eventual nanoestructuración provendrá de la velocidad de formación de cristales, y el autoensamblado de los mismos. En esta dirección, la incidencia de la superficie de base (titanio) proveyendo las nanorugosidades resulta una alternativa para la síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas. Sin embargo, también es posible producir hidroxiapatitas nanoestructuradas en solución, en la medida que se generen estructuras autoensambladas jerárquicas.

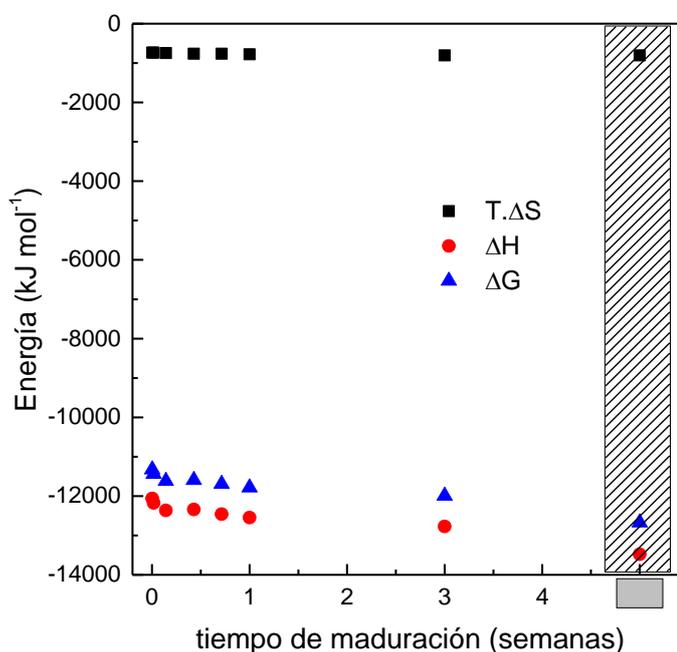


FIGURA 62. VARIACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS (TÉRMINO ENTRÓPICO, ENTALPÍA Y ENERGÍA DE GIBBS) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE MADURACIÓN DE LA HIDROXIAPATITA SINTETIZADA. LA REGIÓN MARCADA CORRESPONDE A LOS VALORES DE HIDROXIAPATITAS ESTEQUIOMÉTRICAS. DATOS REPORTADOS EN LA REF.[112]

La medicina de reconstrucción ósea, ha pasado de generar implantes robustos de materiales poco amigables para las condiciones biológicas, hay biomateriales “inteligentes” de diseño sofisticado que simula las estructuras biológicas a ser reemplazadas. La HA se describe como estructuras hexagonales apiladas formadas por los grupos PO_4^{3-} creando dos tipos de túneles paralelos al eje *c* de la celda unidad.[114] La primera especie de túnel, coincide con la estructura del eje ternario y está ocupada por iones Ca^{2+} mientras que el segundo el cual está recubierto internamente por iones Ca^{2+} y O^{2-} está ocupado por iones OH^- . El diámetro del túnel (3 Å) le da a las apatitas la propiedad de intercambio de iones a altas temperaturas, e inclusive puede actuar como hospedaje para pequeñas moléculas. Estas propiedades se han utilizado en conjunto con las características ampliamente estudiadas y probadas de los metales, para generar implantes híbridos. En este sentido simular las condiciones en las que se produce el crecimiento óseo en el organismo, ha sido el principal interés de la comunidad científica. Para ello se estudiaron 3 superficies diferentes de material basado en Ti, las cuales fueron modificadas por distintas técnicas descritas anteriormente (OMA y anodización electroquímica). Sobre este material se creció HA bajo dos métodos (biomimético y por precipitación acuosa) a los efectos de determinar cuál generaba mejores recubrimientos para uso en implantes. La diferencia entre ambos métodos es que en el de precipitación acuosa, la obtención de la HA se realiza sin la presencia del sustrato, y el polvo obtenido luego de calcinación, es depositado por método electroforético sobre los sustratos antes mencionados. En el caso de la síntesis biomimética, la formación y crecimiento de la HA se da directamente sobre el sustrato a partir de los electrolitos del medio (SBF).

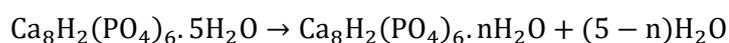
4.3.1. HIDROXIAPATITA OBTENIDA *EX SITU*

La síntesis de HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] se llevó a cabo por medio de la siguiente reacción:



Luego del tratamiento por calcinación se obtiene un polvo blanco que fue caracterizado por XRD. Los resultados muestran que el compuesto sintetizado es HA altamente cristalina, con un tamaño de cristaliza nanométrico. El mecanismo de formación de la HA está dado a través del precursor OCP $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, que también fue encontrado en el análisis por XRD.

El OCP se forma más rápidamente que la HA y se ha encontrado es el precursor del proceso de formación inicial del mineral del hueso [115]. Dado que la síntesis se realizó mediante el agregado de los compuestos sólidos a una solución acuosa a temperatura de 60°C, primero pudo haberse generado el OCP dado que la relación de Ca/P necesaria para la síntesis es de 1.33. Inicialmente mientras se produce la disolución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ las concentraciones libres de Ca^{2+} y PO_4^{3-} son suficientes para que se produzca el compuesto intermediario OCP. Si bien otros compuestos como el fosfato de calcio amorfo, ACP, podrían haberse formado inicialmente, en el análisis sólo se encuentra el OCP. El proceso de maduración en las aguas madres de la síntesis, hace que éste recrystalice en otros compuestos dependiendo de los electrolitos de síntesis y su concentración [18]. Por tal motivo inicialmente durante la síntesis pudo haberse formado el compuesto ACP que luego de la maduración se recrystalizó en OCP. El OCP sólo difiere de la HA, en que entre sus capas de $\text{Ca}/\text{PO}_4^{3-}$ se intercala una capa de H_2O [116]. El proceso de calcinación pudo haber eliminado la capa de agua de la mayoría de los cristales sintetizados, favoreciendo la transformación a HA. La siguiente ecuación ilustra el proceso [117]:



Por tanto lo que se detecta en el diagrama de XRD es el compuesto OCP que luego por un proceso de recrystalización durante la deposición electroquímica, se transforma en HA. Si bien la formación de OCP se

da a un pH de 5.5 - 7, la temperatura y la agitación favorecen la formación del precursor. Algunos autores sugieren que los cristales están formados por mezclas intercristalinas de OCP y HA.[117] Los planos cristalinos preferenciales hallados para la HA fueron el (211) y (300) principalmente. Estos datos coinciden con los hallados para la síntesis de apatitas carbonatadas en donde la temperatura del tratamiento provocaba un aumento en la intensidad de la fase de apatita alrededor del plano (211), aumentando por tanto la cristalinidad [118].

El estudio de la estructura y los entornos químicos del compuesto sintetizado se estudiaron por FTIR. Los resultados muestran la formación de carboxiapatita nanoestructurada. Si bien se ha reportado con anterioridad que el tratamiento térmico posterior a la síntesis del compuesto hace que pierda contenido de CO_3^{2-} [118], en este caso se observan tres frecuencias vibracionales para el CO_3^{2-} . El modo vibracional centrado en 861 cm^{-1} se corresponde con entornos no-apatíticos pertenecientes a los dominios de IR de $\text{v}_2\text{CO}_3^{2-}$ que se identifican con bandas no características de los carbonatos. Se ha reportado que estas bandas se relacionan con la síntesis de apatitas nanocristalinas a pH fisiológico [28]. Para la señal centrada en 876 cm^{-1} se observa un pico correspondiente a carbonatos apatíticos tipo B. Estos se presentan cuando la estructura es cristalina. El pico hallado a 1653 cm^{-1} no pudo identificarse como frecuencia del CO_3^{2-} y podría relacionarse con la región correspondiente al agua.

En el caso de los grupos PO_4^{3-} encontrados, las frecuencias de los modos vibracionales corresponden a v_1PO_4 y v_3PO_4 . Cuando se estudian los entornos apatíticos se observa que éstos pertenecen a apatitas nanoestructuradas ($960, 1022, 1044, 1061, 1090\text{ cm}^{-1}$) para ambos modos vibracionales. Estos resultados permiten concluir que la apatita sintetizada se corresponde con una carboxiapatita nanoestructurada. Como se mencionó anteriormente, esta estructura química es característica de las apatitas biológicas.

4.3.2. HIDROXIAPATITA OBTENIDA *IN SITU*: MÉTODO ELECTROFORÉTICO

La electrodeposición de HA sobre un sustrato es uno de los más comunes métodos de síntesis de HAs cristalinas [9]. Sin embargo en el presente trabajo se realizaron varios experimentos modificando las condiciones de voltaje, temperatura, y electrolito, sin obtener los resultados esperados. Por tal motivo se procedió a sintetizar la HA primero y luego depositarla por un método electroforético. Éste método ha sido utilizado por empresas que desarrollan biomateriales para sustitución ósea a nivel industrial. En el Anexo 3 se muestra un ejemplo de los análisis realizados a los depósitos de hidroxiapatitas de productos comerciales fabricados con esta metodología.

Las muestras elegidas como sustrato fueron láminas de Ti 99 % lisas y láminas nanoestructuradas con nanotubos de TiO_2 . Se utilizaron 3 diferentes voltajes de síntesis y se determinó que se producía un recubrimiento cuando el tratamiento se realiza a 10 V y 20 V en ambos sustratos. El tiempo también fue estudiado como una variante en la síntesis y se demostró que a 1 min de tiempo de síntesis se obtenía un recubrimiento homogéneo en ambas superficies. Cuando se realizaron las pruebas de adhesión se observó que el recubrimiento se desprendía por completo en todas las muestras. A pesar de sumergir a las muestras en agua, lo cual cabría suponer que por el alto grado de insolubilidad en ese medio del mineral de Ca y P formado, no debería desprenderse, el bajo grado de adhesión observado hace suponer que otros factores de la superficie, influyeron en el desprendimiento.

Si se comparan los diagramas de XRD para el depósito de HA sobre la lámina lisa y nanoestructurada de Ti (Figura 49 y 50), se observan diferencias en la intensidad y altura de picos, principalmente. En el caso de la superficie lisa, los picos muestran un depósito policristalino sin un plano característico que sobresalga sobre el resto. Las alturas de los picos además son notoriamente de menor intensidad que para el depósito sobre la superficie nanoestructurada. Esto supone que el nivel de cristalinidad es bajo y

menos definido. Dado el grosor de los picos para algunos planos, el tamaño de las cristalitas es mayor que en la superficie de nanotubos. Sin embargo, en ésta última, los planos (211) y (300) son los principales cristales encontrados. Esto determina que, si bien el depósito no es monocristal, sólo dos planos son los preferenciales. Por su parte el grosor de pico es angosto denotando un tamaño de cristalitas nanométrico. En ambas superficies además, no se observa la presencia de OCP como precursor de la síntesis, confirmando este resultado, que el proceso de electroforesis permitió la recristalización de los iones sobre el sustrato. El depósito de HA sobre el sustrato se da por un proceso de nucleación en ciertos lugares activos de la superficie. Se ha reportado que el proceso de nucleación durante una electrodeposición, puede darse de dos formas, como una nucleación instantánea o una nucleación progresiva [119]. La nucleación se da por un proceso instantáneo, cuando la tasa de formación de los núcleos en un sitio determinado es 60 veces mayor que la tasa esperada para producir el recubrimiento del mismo sitio, sólo por crecimiento. En cambio el proceso de nucleación se dice es progresivo cuando el recubrimiento esperado sobre un sitio del sustrato, por crecimiento es 20 veces mayor que si fuera por nucleación. En este caso la síntesis de HA se daría por un proceso de nucleación instantánea favorecido por el campo eléctrico generado durante la electroforesis. La síntesis además, se produce a través de la ruta sólido - líquido – sólido [120], en donde se forma el OCP inicialmente, y éste es disuelto durante el proceso de electroforesis. Los iones en solución luego recristalizan sobre el sustrato formando la HA. Para el caso en el que se cristaliza sobre la superficie de nanotubos, la estructura cristalina de la HA se mantiene, prevaleciendo los planos preferenciales (211) y (300). En cambio para la superficie lisa, la recristalización se produce de una forma menos cristalina, no existiendo un plano preferencial definido. El campo eléctrico suministrado para la síntesis, permite la movilidad de los iones hacia la superficie del sustrato permitiendo el ensamblaje de los mismos en nanocristales. Estos resultados permiten afirmar que una superficie nanoestructurada favorece la cristalización de la HA sobre el sustrato, manteniendo las características de tamaño de cristalita y planos preferenciales que el compuesto de partida.

4.3.3. HIDROXIAPATITA OBTENIDA IN SITU: MÉTODO BIOMIMÉTICO

La síntesis de la HA biomimética se realizó directamente sobre el sustrato, a diferencia de la síntesis por precipitación acuosa, en la cual la reacción se realiza aparte y con la HA obtenida se deposita por método electroforético sobre el sustrato. La solución de síntesis fue preparada de acuerdo a la composición química de fluido biológico, con la concentración iónica casi igual a los constituyentes del plasma sanguíneo humano. En estas condiciones se procuró que todos los elementos necesarios para la síntesis biológica fueran replicados. Por este motivo es que se hace referencia a una síntesis biomimética, ya que pretende mimetizar el proceso que se da naturalmente en el organismo. La principal ventaja que presenta esta síntesis basada en la nucleación y crecimiento del fosfato de calcio sobre un sustrato metálico, radica en el hecho que: i) se realiza a baja temperatura (36.5 – 37 °C), ii) la formación de apatitas no estequiométricas que asemejan los minerales del hueso, iii) la posibilidad de generar depósitos, inclusive sobre implantes de geometría compleja, e incorporar moléculas biológicamente activas o iones al recubrimiento [114].

DEPÓSITO DE HIDROXIAPATITA SOBRE LA SUPERFICIE DE TITANIO LISA

Cuando se analizaron las láminas lisas de Ti éstas presentaron a nivel macroscópico un cambio de color (dorado y azul) y signos de corrosión. Sin embargo no se observaron depósitos de HA en las imágenes macro y micro de la superficie. Si bien a menor magnificación se observa una diferencia notoria entre la superficie nanoestructurada y lisa, a nivel micro (50 μm), una superficie agrietada de líneas paralelas y regulares se observan sobre la lámina. El estudio de la topología de la superficie, y la estructura cristalina se hicieron a través de microscopía SEM y XRD, respectivamente. Estos resultados mostraron que se

sintetizó HA sobre la superficie en una estructura compacta en forma de láminas paralelas al sustrato. Al nivel nanométrico se observa que el recubrimiento presenta una leve rugosidad, pero predomina la estructura en forma de capas lisas superpuestas denotando un crecimiento en dos dimensiones. La cantidad de HA biomimética es baja dado que no está favorecida la nucleación en la superficie lisa. Investigadores hallaron que en SBF los grupos -OH se adsorben a la superficie de una capa de TiO₂ compacta, favoreciendo la adsorción de iones Ca²⁺ a la superficie, iniciándose allí la nucleación. En el presente trabajo la lámina de Ti presenta una superficie de TiO₂ pasivante sobre la cual se podría haber generado el mismo mecanismo [121]. La interface TiO₂/ solución tiene una naturaleza dipolar dado por los iones que la componen. Sobre el sustrato de Ti, existe una deficiencia de cargas negativas, como se mencionó anteriormente, debido a la ausencia de iones O²⁻ que pasaron a formar parte de la estructura del TiO₂ pasivante. En medio SBF los iones -OH migran a los sitios que dejaron vacantes los O²⁻ y se adsorben a la superficie formando Ti-OH en la interface sólido-líquido. Los grupos Ti-OH dependen significativamente del pH que los rodea con lo cual al pH fisiológico de 7.4, la superficie es ligeramente negativa por la presencia de hidroxilos ácidos deprotonados [121]. En estas condiciones iones como el Ca²⁺ migran hacia la superficie del sustrato favoreciendo la nucleación de los iones Ca²⁺ con los iones HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻ para formar los fosfatos de calcio como la HA.

Los diagramas de XRD (Figura 56) mostraron un pico cristalino preferencial correspondiente al plano (210) verificando la presencia de HA sobre la superficie. También se observa un pico correspondiente a OCP, que al igual que la HA sintetizada por precipitación, éste actúa como precursor de la formación de HA. El resto de los picos que se observan corresponden a estructuras de cristalinidad no definida de la HA, sugiriendo que se generó una superficie compacta de estructura amorfa.

DEPÓSITO DE HIDROXIAPATITA SOBRE RECUBRIMIENTO DE NANOTUBOS DE TiO₂

Cuando se estudiaron las características del recubrimiento sobre la superficie de nanotubos se observó que ésta presentaba un arreglo de esferas en forma de esporas las cuales a su vez estaban compuestas por pequeñas láminas en un arreglo semi-concéntrico. Esta estructura jerárquica tridimensional es la que se busca para utilizarla de andamiaje para el crecimiento del hueso entorno al implante y una estructura similar se ha obtenido por método hidrotermal [122]. El mecanismo de formación de la HA sobre la superficie nanoestructurada es similar al mostrado para el caso de la superficie lisa. En donde la adsorción de iones -OH generan la formación de Ti-OH favoreciendo la adsorción posterior de Ca²⁺. Dada la difusión de los iones sobre la superficie, y ante la presencia de distintas especies de PO₄³⁻, está favorecida la nucleación en la superficie e intersticios de los nanotubos. Así mismo la nanoestructuración le brinda propiedades a la superficie que la hace un mejor sustrato para la síntesis. En este caso los nanotubos por su estructura tridimensional proporcionan mayor área respecto al volumen que ocupan y por tanto generan mayores sitios para la nucleación de los iones. Se ha observado en trabajos previos que el tratamiento térmico para cristalinizar la superficie, favorece la nucleación y posterior recubrimiento de la HA [121], principalmente cuando la estructura de los nanotubos de TiO₂ es de tipo anatasa. La rugosidad de la superficie favorece una nucleación controlada multinuclear. El posterior crecimiento del cristal a partir de los núcleos iniciales se realiza a menor velocidad lo cual permite un crecimiento parejo y ordenado de las láminas de HA que formarán las estructuras de esporas.

Los diagramas de XRD presentan un pico diferencial a (210), al igual que para la superficie lisa, demostrando que la estructura cristalina que se forma sobre ambos sustratos es similar. El cálculo del tamaño de cristalita (22.14 nm) reveló que el plano principal en los que se arreglan los cristales de HA sobre el sustrato, son de tamaño nanométrico. También se observa un pico correspondiente al OCP, precursor de la HA. En estudios recientes se identificó que la síntesis de HA a partir del precursor de fase DCPD, se divide en dos pasos. En la fase inicial, las nanopartículas de HA son rápidamente formadas a

través de una nucleación heterogénea y un crecimiento sobre la superficie de DCPD. Luego, la velocidad de crecimiento de los nanocristales de HA es enlentecido por el cambio en el proceso de cristalización [123]. Este mecanismo podría asemejarse al que se da con la presencia de OCP y HA en ambas superficies. Como se mencionó anteriormente, la velocidad de formación de los OCP es mayor que la de HA y por tanto éstos podrían ser los compuestos iniciales del proceso de nucleación en la superficie. A partir de éstos núcleos formados por el precursor, se sintetiza la HA por sobre ellos.

DEPÓSITO DE HIDROXIAPATITA SOBRE SUPERFICIES OXIDADAS POR MICRO ARCO

La formación in situ de apatitas sobre las superficies oxidadas de Ti por OMA es fuertemente dependiente de la composición química de la interfase.[110] En presencia de un medio similar fisiológico, a pesar de estar presentes las condiciones termodinámicas para que se produzca la capa de hidroxiapatita, se sabe que existe una barrera cinética para la nucleación homogénea de apatita, y son necesarios “estímulos químicos” para que se produzca la reacción. Por ejemplo, los grupos hidroxilos presentes en el SiOH, TiOH y COOH son inductores eficientes para la nucleación de las apatitas. Para el caso de superficies hiperoxidadas, la formación de CaTiO_3 puede dar lugar por hidrólisis a iones Ca^{2+} , OH^- y $\text{TiO}(\text{OH})_2$, lo que genera grupos OH superficiales capaces de inducir la nucleación de apatitas. Además de la existencia de grupos OH superficiales, la presencia adicional de iones Ca^{2+} , OH^- y HPO_4^{2-} aumentan la supersaturación natural de las superficies similar fisiológicas, favoreciendo la deposición de apatitas [110].

Los resultados indican que no se formó un depósito de apatita sobre las muestras obtenidas por OMA, y en principio, la interpretación de este resultado tendría que tener en cuenta la formación o no de especies hidroxiladas sobre la superficie. En el caso de las muestras obtenidas en ausencia de calcio, la que fue tratada por OMA durante 30 min (muestra 17; Tabla 20) presenta un número estequiométrico para el compuesto oxidado de titanio correspondiente a una relación Ti:O 1:2, por lo que la formación de TiO_2 como único compuesto parece ser la interpretación correcta. En este sentido, no se espera la formación de apatitas sobre la superficie, ya que no existen grupos OH superficiales que puedan actuar como inductores de la nucleación de apatitas.

Para las otras muestras obtenidas con un mayor tiempo de tratamiento, 60 y 90 min, las relaciones estequiométricas Ti:O fueron de 1:2.5 (promedialmente), lo que indica que no se forma TiO_2 , al menos exclusivamente. La presencia de átomos de O indica la formación de óxidos, por lo que cabe analizar la posibilidad de formación de otros óxidos superficiales (Tabla 27).

TABLA 27. ALGUNOS COMPUESTOS DE TITANIO. RELACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA Y FORMAS DE OBTENCIÓN

Óxido	Relación Ti:O (átomos)	Obtención
TiO	1:1	Reacción entre Ti y TiO_2 a 1500 °C
Ti_2O_3	1:1.5	Reacción entre Ti y TiO_2 a 1600 °C
TiO_2	1:2	
Ti_3O_5	1:1.66	
$\text{TiO}(\text{OH})_2$	1:3	Hidrólisis del TiO_2
TiPO_4	1:4	Migración iónica a altos voltajes

Los valores intermedios entre 2 y 3 para las relaciones atómicas O:Ti sugieren la hidrólisis parcial de la superficie para dar $\text{TiO}(\text{OH})_2$, el cual a pH básico formaría $\text{TiO}(\text{OH})\text{O}^-$. Sin embargo, esta estructura negativa no sería capaz de adsorber los aniones PO_4^{3-} o HPO_4^{2-} .

Como interpretación alternativa, puede considerarse la inclusión de fosfato durante el proceso de chispa, que produce la migración de especies altamente cargadas hacia el interior del depósito. La migración de los iones fosfato en comparación con los iones O^{2-} es lenta, por lo que se ha sugerido que la misma tiene lugar a través de los poros [124]. En este caso, se podría formar TiPO_4 , y del balance de átomos de oxígeno realizado, que arrojó valores de $n = 2.39$ y 2.68 para las muestras 18 y 19, respectivamente, se podría asumir la formación de un compuesto de fórmula general $\text{TiO}_{2-x}(\text{OH})_{2x}$. Los óxidos de Titanio formados para 60 y 90 min de tratamiento de oxidación por microarco serían $\text{TiO}_{1.61}(\text{OH})_{0.78}$ y $\text{TiO}_{1.32}(\text{OH})_{1.36}$, respectivamente. Ambos óxidos muestran un defecto de grupos OH, por lo que no serían adecuados como núcleos de deposición de apatitas.

El análisis del depósito de HA sobre el material con el tratamiento OMA, arrojó como resultado que tanto el método de síntesis por electrodeposición como el tratamiento biomimético, no mostró depósito de HA en ninguno de los dos casos (Figura 54, Figura 55). Este resultado contradice lo reportado por otros autores que trabajaron en las mismas condiciones [110]. Si bien se puede suponer que existió algún error durante el proceso de síntesis de HA, la deposición fue realizada en las mismas condiciones que para las láminas de titanio sin modificar, y las modificadas por anodización electroquímica. Frente a estos resultados, sólo queda suponer que la estructura del material no permitió el depósito de HA en la superficie. La composición química, por el contrario no ha afectado el depósito de HA ya que las concentraciones halladas de los átomos era en el orden de trazas y no diferían en gran medida de las encontradas en la lámina de Ti y los nanotubos. Asimismo, varios trabajos encontraron que era necesario un tratamiento hidrotérmico posterior al tratamiento de OMA, para que se produzca el crecimiento de la HA sobre el material [109, 125]. Este tratamiento estaría generando una superficie bioactiva que favorece el depósito de HA [110]. Así mismo, sólo se han encontrado resultados positivos de inducción de apatitas en SBF, cuando ésta es generada por el tratamiento hidrotérmico previo. Si este tratamiento no fue realizado a las muestras, entonces es de esperar que éste haya sido el motivo de la ausencia de depósito. Si bien el recubrimiento generado tiene una porosidad producto del alto voltaje y las condiciones de la oxidación, el tamaño de los mismos es del orden de las micras siendo 1000 veces mayor que el tamaño de los nanotubos. Frente a esta superficie la HA no pudo formarse quedando la superficie igual que sin recubrimiento. Si comparamos este resultado con los obtenidos por método biomimético sobre placa de Ti liso, vemos que, en ese caso se generó un recubrimiento multicapa que seguía la estructura del sustrato. Sin embargo la superficie modificada con OMA al parecer carece de sitios que permitan la nucleación de la HA. Más allá de las características de la superficie, los compuestos químicos sobre ella también influyen la nucleación. Un ejemplo de ello es la contaminación con otros átomos que presenta la superficie que pudo ser un factor determinante en la nucleación. En ese sentido, si en la superficie se encuentran grupos hidroxilos tales como SiOH, TiOH y COOH es sabido son inductores eficientes para la nucleación de la HA. En el film oxidado a alto voltaje, CaTiO_3 se hidroliza a Ca^{2+} , OH^- y $\text{TiO}(\text{OH})_2$ en SBF. El óxido hidroxilato de Ti es considerado insoluble y produce una superficie de TiOH, la cual actúa como un sitio de nucleación [110]. Se ha encontrado que en soluciones de SBF 5 veces más concentrada, se produce un recubrimiento de apatita, a pesar de no incorporarse Ca y P a la superficie de Ti, previa a la incubación. Sin embargo en los análisis realizados a las distintas muestras, los valores encontrados de Ca fueron del orden de trazas y no se hallaron indicios de la formación de $\text{TiO}(\text{OH})_2$. Estos resultados permiten determinar que en términos de la topografía de la superficie y los componentes químicos, no existieron puntos que permitieran la inducción y nucleación de la HA en este sustrato.

4.4. COMPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS

La nucleación de la apatita sobre el sustrato involucra un reconocimiento interfacial en la geometría (entramado, topografía, simetría espacial), en la química (enlace, coordinación, estequiometría) y electrostática (potencial, carga) [109].

Desde el punto de vista de la geometría, crear materiales a través de la síntesis por multi-escalado, para generar biomateriales híbridos, permite simular el arreglo jerárquico que presenta la formación de los huesos [125]. En este caso la HA sintetizada por método biomimético presenta una estructura jerárquica tridimensional, donde las esferas en forma de esporas están compuestas por láminas de HA de tamaño nanométrico, como se mencionó anteriormente. En reciente trabajo se ha encontrado estructuras jerárquicas de HA en forma de flores, en donde las láminas que forman los pétalos, tienen como unidades básicas estructuras similares a nanovarillas [122]. Se ha reportado además que modificaciones en la estructura del titanio como aumento en la rugosidad, sirven de andamiaje para el crecimiento de recubrimientos tridimensionales de diferentes características.[125]. Estas estructuras tiene la propiedad de mejorar la biocompatibilidad en el medio biológico e inducir la osteointegración. En el desarrollo de biomateriales, el sitio de interés tanto para los médicos como los fabricantes, es la interface implante - tejido óseo. Se ha visto que un recubrimiento de HA mejora la formación del hueso que la rodea favoreciendo la osteoconducción, y facilita el anclaje entre el tejido de los huesos y la prótesis para mejorar la osteointegración. Así mismo, en estudios con diferentes HA y cerámicos nanoestructurados, se ha visto que la estructura de la superficie favorece selectivamente la adsorción de determinadas proteínas pequeñas inductoras del crecimiento del tejido óseo. Más aún se ha visto que las características de la superficie nanoestructurada puede actuar como disparador físico de la diferenciación osteogénica [126]. Este hallazgo podría revolucionar la industria de biomateriales dado que no habría necesidad de incorporar otros suplementos de inducción de osteogénesis, disminuyendo los costos del tratamiento y los riesgos para el paciente.

Con respecto a la química de la superficie, se ha visto que los biomateriales basados en calcio y fosfatos pueden interactuar con sus ambientes iónicos de diferentes maneras: a través del crecimiento del cristal, por degradación, o intercambio de iones (sustitución). El intercambio iónico, por ejemplo, puede darse tanto entre la interface formada en la superficie hidratada del cristal, o dentro de la estructura de red cristalina a través de la difusión de iones [127].

Se ha encontrado a través del análisis espectroscópico y químicos de apatitas nanoestructuradas, que: i) las apatitas nanoestructuradas presentan ambientes químicos catiónicos y aniónicos no apatíticos; ii) al menos parte de éstos ambientes (carbonatos principalmente) están localizados en la superficie de los nanocristales y están en fuerte interacción con los dominios hidratados [28]. La superficie hidratada está compuesta por iones móviles como Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , y CO_3^{2-} en los sitios no apatíticos. Esta capa hidratada también se ha visto reduce la tensión superficial de DCPD y OCP por lo cual cabe suponer que lo mismo ocurre con la HA. En otros estudios identificaron, en experimentos de apatitas en contacto con medios de cultivo, que la superficie expuesta de apatitas de Ca^{2+} y P al medio de cultivo, presentaban una superficie química carbonatada, sugiriendo que el carbonato tiene un rol fundamental en la actividad iónica de las apatitas [127].

Se ha observado que la afinidad tanto de proteínas inductoras como factores de crecimiento de huesos, a adsorberse sobre las apatitas, está favorecida cuando éstas son no estequiométricas, pobremente cristalinas y poseen abundantes especies no apatíticas (carboxiapatitas) en la superficie [28].

Frente a los datos proporcionados por la bibliografía, y los resultados obtenidos para los tres materiales analizados, se determina que las muestras que presentaron una estructura de nanotubos de TiO_2 favorecieron el crecimiento de la HA en la superficie de los mismos. La síntesis con mejores resultados del mineral sustituto de hueso, fue por método biomimético, en donde se observa un recubrimiento de arreglo jerárquico tridimensional. El análisis de las características del recubrimiento determinó que se tratara de carboxiapatita nanoestructurada, la cual coincide con el principal componente de los huesos. Las pruebas de adhesión tuvieron como resultado que las superficies recubiertas por éste método, mantuvieron sus características iniciales intactas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis se consideraron diferentes superficies de titanio, con topografías a nivel micro y nano para determinar la incidencia que tenían en la formación de depósitos espontáneos de hidroxiapatita con un buen grado de adhesión. El objetivo principal fue la mejor comprensión de la incidencia de la nanoestructuración de la superficie en los fenómenos de bioreconocimiento. El titanio es capaz de formar enlaces covalentes con las hidroxiapatitas, por lo que la existencia de sitios de nucleación para su formación resulta clave. La pregunta que buscamos responder es si estos sitios de nucleación deberían estar determinados a nivel nano o a nivel micro.

Para responder a estas preguntas, hemos comenzado con un modelo muy bien caracterizado a nivel molecular, consistente en una superficie pulida de Oro que fue recubierta por una capa homogénea de ácido tiobarbitúrico, y se la hizo interactuar con el citocromo c. Este procedimiento es conocido como autoensamblado molecular, caracterizado por estar bajo control entálpico, y que tiene asociado una considerable disminución en la entropía. Es el proceso que da cuenta de los diferentes fenómenos asociados con la existencia de la vida misma, como es la formación de las membranas celulares y los sistemas biológicos a nivel macro. Nuestros resultados demostraron que cuando a una proteína se le ofrece una superficie con un nivel de rugosidad similar a la de su superficie accesible por solvente, es capaz de interactuar (adsorberse) en un mayor grado. Cuando se compara este resultado con el de otras piridinas y mercaptopiridinas con iguales sustituyentes, se observa que los resultados no pueden ser explicados en base a la química de la interacción, sino a algunos aspectos físicos, como la topografía de la superficie. Este resultado demuestra que la complementariedad topográfica es un factor clave para que se produzca el fenómeno de bioreconocimiento.

A continuación, se extendió este estudio para considerar la interacción entre un biomaterial y la hidroxiapatita que naturalmente se forma en nuestro cuerpo. Para ello, se trabajó con el mismo material desde el punto de vista químico (dióxido de titanio) pero con detalles en su topografía diferentes: uno con rugosidades a nivel de la nanoescala y otro con rugosidades a nivel de la microescala. En este último caso, se empleó una superficie que, a nivel de microscopía en la microescala, luce como un hueso esponjoso. A la hora de comparar los resultados, sólo la superficie con modificaciones a nivel de la nanoescala resultó adecuada para la deposición espontánea de la hidroxiapatita, a pesar de que la microscopía mostró un arreglo que en nada se parecía al del hueso. Entonces, ¿en qué consiste la biomimesis? ¿Es necesario que luzca igual, o debe mimetizarse otro aspecto? Nuestros resultados indican que, nuevamente, la topografía resulta clave a la hora de explicar los fenómenos de bioreconocimiento. Son las rugosidades a nivel nano las que resultaron fundamentales para que se produzca la deposición de la hidroxiapatita.

Con estos resultados, que confirman los hallazgos de otros autores, pero empleando una hipótesis de trabajo diferente, surge el análisis del futuro de los implantes. ¿Cuál sería la estructura de un implante que permita cumplir con los objetivos de sustitución, en este caso, ósea? Para ello debemos volver a nuestros resultados con el citocromo c, y con la teoría de West-Brown-Enquist. De acuerdo con nuestros resultados, y en conexión con la mencionada teoría, es posible considerar a los objetos biológicos respondiendo a dos dimensiones diferentes, en función de su funcionalidad. Por ejemplo, como demostramos en este trabajo de Tesis, el citocromo c actúa como un objeto de dimensión superficial ca. 2.2 para interactuar con el medio circundante, y como un objeto biológico con una dimensión ca. 3 para cumplir su función de transporte electrónico. Existe abundante bibliografía que demuestra que esa dimensión de 2.2 puede caracterizarse como una superficie de ligera rugosidad que define la interacción

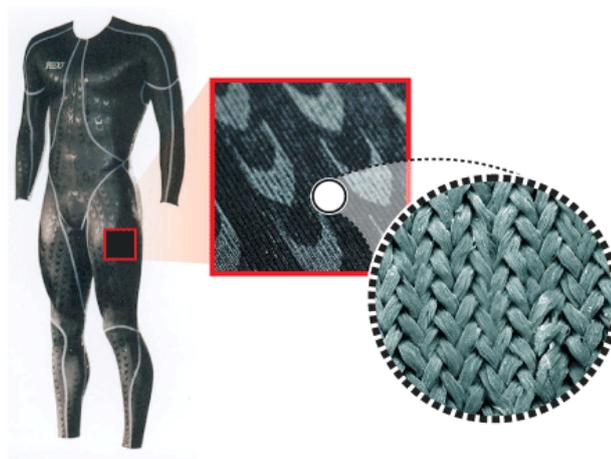
con el medio mediante un equilibrio entre la capacidad de captación y la capacidad de desprendimiento, permitiendo el camino de “ida y vuelta” en la interacción. Por otra parte, una superficie que a otro nivel muestra un grado de invaginación que hace que ocupe todo el espacio volumétrico provee la estructura espacial adecuada para cumplir la funcionalidad.

La Naturaleza, como fuente de inspiración de los nuevos desarrollos tecnológicos, nuevamente nos da una lección en su experimentación llevada a cabo a lo largo de millones de años. Consideremos algunas estructuras naturales y las “copias” realizadas por el Hombre:



El estadio Olímpico de Pekín fue realizado a semejanza de un nido de pájaro. Esta construcción no obedeció a un mero capricho estético, sino que resultó de estudios profundos que demostraron que esta estructura aportaba una estabilidad superior a la estructura global. Obsérvese que desde el punto de vista de las dimensiones, la estructura del estadio (como la del nido de pájaro) puede considerarse como una línea que cambia de dirección de manera de cubrir toda una superficie, es decir, una línea de dimensión efectiva cercana a 2. Nuevamente se cumple que la funcionalidad va de la mano con un nivel superior de dimensionalidad.

Otro ejemplo que ha encontrado una aplicación importante en el mercado, es el diseño de los trajes de baño para los deportistas:



La estructura de la tela no es la de una superficie lisa, sino que tiene un ligero rugosado que hace que el agua se mueva en forma más aerodinámica sobre el mismo. Este es un ejemplo de interacción con el medio, en el que la ligera rugosidad de la superficie interaccionante permite una mejor interacción con el medio.

Son muchos los ejemplos que se encuentran en la literatura, pero volvamos a los implantes. ¿Cómo debería ser la estructura de un implante ideal? De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, y con la infinidad de ejemplos que se encuentran en la literatura y a nivel comercial, un implante ideal podría consistir en una superficie con un alto grado de invaginación de tal manera que genere un volumen cuya superficie externa tenga una dimensión ligeramente superior a 2, y que su estructura esté representada por una dimensionalidad cercana a 3. De esta manera, el implante tendría cavidades internas que puedan ser surcadas por venas y arterias, y una superficie con una ligera rugosidad a nivel nano que induzca la formación de hidroxiapatita. Y esto no se aleja de la realidad:



El interior del hueso de la figura consiste en una superficie altamente porosa que tiende a cubrir todo el volumen (es decir, con una dimensión de ca. 3), mientras que la superficie interaccionante con el medio presenta una ligera rugosidad (ca. 2.2) que permite la deposición/disolución de hidroxiapatita. Esta superficie ligeramente rugosada también se encuentra en la región de invaginación, pero la dimensionalidad efectiva varía a diferentes escalas. A escala nano, las interacciones predominantes son entre el colágeno y la hidroxiapatita en el hueso compacto; a nivel micro la estructura porosa del hueso esponjado le brinda estabilidad mecánica y dureza estructural.

La Naturaleza tiene todo resuelto, pero es necesario poder comprender el por qué de lo que observamos. En este trabajo de Tesis hemos pretendido dar una interpretación a la estructura de los objetos biológicos en su interacción con el medio, como forma de considerar un nuevo diseño, racional y biomimético, de los biomateriales.

5.1 PERSPECTIVAS DE FUTURO

El desarrollo de los biomateriales ha evolucionado a la creación de nuevos dispositivos con diferentes propiedades que potencian la función para la cual fueron creados. El presente trabajo permitió identificar dos aspectos fundamentales para mejorar el uso de estos bioimplantes, la biomimesis topográfica y el bioreconocimiento a través de los enlaces. Desde este punto de vista se abre un abanico de posibilidades de nuevos desarrollos y de aplicaciones de estos hallazgos en otros campos.

Tal es así que en el caso de su aplicación en el desarrollo de bioimplantes, la aplicación de la metodología de FT-IR permitió identificar las apatitas nanoestructuradas en el caso de materiales quirúrgicos, y se vio que daba resultados confiables pudiendo predecir la adhesión o no del recubrimiento sobre el implante.

Para el desarrollo de nuevas superficies para su uso en sensores, permite el uso de la HA como material de bioreconocimiento. Asimismo, permite estudiar los eventos de bioreconocimiento en cultivos celulares así como colágeno desde una perspectiva diferente centrándonos en los estudios de las interfaces material-componente biológico.

Diferentes estudios en medicina han relacionado la disponibilidad biológica de la HA asociada a problemas de salud humana como por ejemplo las calcificaciones deslocalizadas recurrentes, y patologías asociadas a enfermedades como la enfermedad celíaca.

Si bien la lista puede ser extensa lo importante a recalcar es que cualquiera de las posibilidades que se abren de continuar este trabajo requiere de la participación de diferentes áreas del conocimiento para desarrollarlos. Es aquí que este trabajo se ramifica hacia la necesidad de creación de equipos multidisciplinarios para abordar los diferentes temas.

REFERENCIAS

- [1] D.F. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, Liverpool, 1999.
- [2] A. Batchelor, M. Chandrasekaran, in: (Ed.)^(Eds.); Imperial College Press, 2004.
- [3] R.K. Woo, D.D. Jenkins, R.S. Greco, in: F.B.P. R.S. Greco, R.L. Smith, (Ed.)^(Eds.)*Nanoscale technology in biological systems*; Taylor and Francis, 2005.
- [4] S.K. Bhatia, *Biomaterials for clinical applications*. Springer, New York, 2010.
- [5] M. Yaszemski, D.J. Trantolo, *Biomaterials in Orthopedics*. 2004.
- [6] J. Breme, C.J. Kirkpatrick, R. Thull, *Metallic Biomaterial Interfaces*. Wiley, 2008.
- [7] W.J. Kroll, *Journal of the Franklin Institute* 260 (1955) 169.
- [8] T. Kokubo, *Bioceramics and their Clinical Applications*. Elsevier Science, 2008.
- [9] E.A. dos Santos, M.S. Moldovan, L. Jacomine, M. Mateescu, J. Werckmann, K. Anselme, P. Mille, H. Pelletier, *Materials Science and Engineering: B* 169 (2010) 138.
- [10] J.M. Macak, L.V. Taveira, H. Tsuchiya, K. Sirotna, J. Macak, P. Schmuki, *Journal of Electroceramics* 16 (2006) 29.
- [11] K. Cheng, W. Weng, H. Wang, S. Zhang, *Biomaterials* 26 (2005) 6288.
- [12] C. Suba, M. Lakatos-Varsányi, a. Mikó, L. Kovács, N. Velich, B. Kádár, G. Szabó, *Materials Science and Engineering A* 447 (2007) 347.
- [13] D.F. Williams, *Biomaterials* 35 (2014) 10009.
- [14] Q. Chen, G.A. Thouas, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 87 (2015) 1.
- [15] A.K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, M.J. Buehler, *Nat Commun* 4 (2013) 1724.
- [16] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, A. Lebugle, H. Sfihi, A. Barroug, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 38 (2007) 996.
- [17] M.J. Yaszemski, *Biomaterials in Orthopedics*. CRC Press, 2003.
- [18] S.V. Dorozhkin, *Materials* 2 (2009) 1975.
- [19] A. Gautieri, S. Vesentini, A. Redaelli, M.J. Buehler, *Nano Letters* 11 (2011) 757.
- [20] M. Fang, E.L. Goldstein, E.K. Matich, B.G. Orr, M.M. Banaszak Holl, *Langmuir* 29 (2013) 2330.
- [21] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 7591.
- [22] M. Garcia-Holguera, O.G. Clark, A. Sprecher, S. Gaskin, *Building Research and Information* (2015).
- [23] S.H. Teng, E.J. Lee, C.S. Park, W.Y. Choi, D.S. Shin, H.E. Kim, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 2453.
- [24] J.M. Holzwarth, P.X. Ma, *Biomaterials* 32 (2011) 9622.
- [25] Y.T. Wang, S.Y. Chang, Y.C. Huang, T.C. Tsai, C.M. Chen, C.T. Lim, *Nano Letters* 13 (2013) 5247.
- [26] Y. Fan, Z. Sun, J. Moradian-Oldak, *Biomaterials* 30 (2009) 478.
- [27] L.-H. Li, Y.-M. Kong, H.-W. Kim, Y.-W. Kim, H.-E. Kim, S.-J. Heo, J.-Y. Koak, *Biomaterials* 25 (2004) 2867.
- [28] D. Eichert, C. Drouet, C. Rey, H. Sfihi, C. Combes, *Nanocrystalline Apatite-Based Biomaterials*. Nova Science Publishers, 2009.
- [29] O. Gauthier, J.M. Bouler, P. Weiss, J. Bosco, G. Daculsi, E. Aguado, *J Biomed Mater Res* 47 (1999) 28.
- [30] K.A. Hing, S.M. Best, W. Bonfield, *J Mater Sci Mater Med* 10 (1999) 135.
- [31] G. Carotenuto, G. Spagnuolo, L. Ambrosio, L. Nicolais, *J Mater Sci Mater Med* 10 (1999) 671.
- [32] M. Sato, T.J. Webster, *Expert review of medical devices* 1 (2004) 105.
- [33] T.J. Webster, E.S. Ahn, *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 103 (2007) 275.
- [34] S.C. D'Andre, A.Y. Fadeev, *Langmuir* 19 (2003) 7904.
- [35] M. Okada, K. Furukawa, T. Serizawa, Y. Yanagisawa, H. Tanaka, T. Kawai, T. Furuzono, *Langmuir* 25 (2009) 6300.
- [36] J.P. Sun, J. Dai, Y. Song, Y. Wang, R. Yang, *ACS Appl Mater Interfaces* 6 (2014) 20738.

- [37] P. Tengvall, I. Lundström, *Clinical Materials* 9 (1992) 115.
- [38] J. Hwang, Y. Jeong, J.M. Park, K.H. Lee, J.W. Hong, J. Choi, *International Journal of Nanomedicine* 10 (2015) 5701.
- [39] S. Das, M. Bhowmick, S.K. Chattopadhyay, S. Basak, *Current Science* 109 (2015) 893.
- [40] A. Malshe, K. Rajurkar, A. Samant, H.N. Hansen, S. Bapat, W. Jiang, *CIRP Annals - Manufacturing Technology* 62 (2013) 607.
- [41] J.H. Fewell, *Journal of Bioeconomics* (2015).
- [42] L.M. Svanborg, M. Hoffman, M. Andersson, F. Currie, P. Kjellin, A. Wennerberg, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 40 (2011) 308.
- [43] N.G. Durmus, T.J. Webster, *Nanomedicine (Lond)* 7 (2012) 791.
- [44] B. León, J.A. Jansen, in: (Ed.)^(Eds.); Springer Science + Business Media, LLC, DOI 10.1007/978-0-387-77718-4_2, 2009.
- [45] P. Tambasco de Oliveira, A. Nanci, *Biomaterials* 25 (2004) 403.
- [46] O. Im, J. Li, M. Wang, L.G. Zhang, M. Keidar, *International journal of nanomedicine* 7 (2012) 2087.
- [47] R.L. Price, M.C. Waid, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, *Biomaterials* 24 (2003) 1877.
- [48] M. Sato, M.A. Sambito, A. Aslani, N.M. Kalkhoran, E.B. Slamovich, T.J. Webster, *Biomaterials* 27 (2006) 2358.
- [49] G.B. West, J.H. Brown, B.J. Enquist, *Science* 276 (1997) 122.
- [50] M. Pereyra. ¿Son las proteínas objetos fractales? . Universidad de la República, Montevideo, 2007.
- [51] M. Pereyra. Las dimensionalidades del citocromo c. Universidad de la República, Montevideo, 2007.
- [52] G.B. West, J.H. Brown, B.J. Enquist, *Science* 276 (1997) 122.
- [53] G.B. West, J.H. Brown, B.J. Enquist, *Science* 284 (1999) 1677.
- [54] A.A. Kaczor, R. Guixà-González, P. Carrió, C. Obiol-Pardo, M. Pastor, J. Selent, *Journal of Molecular Modeling* 18 (2012) 4465.
- [55] F.K. Pettit, J.U. Bowie, *J Mol Biol* 285 (1999) 1377.
- [56] M. Lewis, D.C. Rees, *Science* 230 (1985) 1163.
- [57] N. Todoroff, J. Kunze, H. Schreuder, G. Hessler, K.H. Baringhaus, G. Schneider, *Molecular informatics* 33 (2014) 588.
- [58] A. Banerji, C. Navare, *Journal of molecular recognition : JMR* 26 (2013) 201.
- [59] M. Pereyra, E. Méndez, in: P.M.T. (Ed.), (Ed.)^(Eds.)Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science; In Tech, 2011.
- [60] L.F. Pacios, *Comput. Chem.* 18 (1994) 377.
- [61] L.F. Pacios, *J. Mol. Model.* 1 (1995) 46.
- [62] D. Avnir, D. Farin, P. Pfeifer, *Nature* 308 (1984) 261.
- [63] L. Fernández Pacios, *Chemical Physics Letters* 242 (1995) 325.
- [64] H. Takadama, T. Kokubo, in: T. Kokubo, (Ed.)^(Eds.)Bioceramics and their clinical applications; CRC Press, Boca Ratón, 2008, p 785.
- [65] C. Lages, E. Mendez, *Anal Bioanal Chem* 388 (2007) 1689.
- [66] C. Lages. Implementación de la técnica de ángulo de contacto para el estudio de interfases. Universidad de la República, 2006.
- [67] F.A. Miller, C.H. Wilkins, *Analytical Chemistry* 24 (1952) 1253.
- [68] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, M.J. Glimcher, *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22 (2004) 310.
- [69] C. Combes, C. Rey, S. Mounic, *Key Engineering Materials* 192-195 (2001) 143.
- [70] C. Rey, A. Hina, A. Tofighi, M.J. Glimcher, *Cells and Materials* 5 (1995) 345.
- [71] C. Rey, J. Lian, M. Grynepas, F. Shapiro, L. Zylberberg, M.J. Glimcher, *Connective Tissue Research* 21 (1989) 267.
- [72] M. Lebon, I. Reiche, F. Fröhlich, J.J. Bahain, C. Falguères, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392 (2008) 1479.

- [73] Y. Leung, M.A. Walters, R.Z. LeGeros, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 46 (1990) 1453.
- [74] D. Eichert, C. Drouet, H. Sfihi, C. Rey, C. Combes, *Nanocrystalline apatite-based biomaterials*. 2009.
- [75] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I.R. Dickson, M.J. Glimcher, *Calcified Tissue International* 45 (1989) 157.
- [76] H. El Feki, C. Rey, M. Vignoles, *Calcified Tissue International* 49 (1991) 269.
- [77] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher, *Calcified Tissue International* 49 (1991) 251.
- [78] G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres, *Calcified Tissue International* 63 (1998) 475.
- [79] D. Eichert, H. Sfihi, C. Combes, C. Rey, in: (Ed.)^(Eds.)*Key Engineering Materials*, 2004, p 927.
- [80] D. Eichert, C. Drouet, H. Sfihi, C. Rey, C. Combes, in: (Ed.)^(Eds.)*Nanotechnology Research Progress*, 2009, p 143.
- [81] M. Fedurco, *Coord. Chem. Rev.* 209 (2000) 263.
- [82] J.M. Macak, P. Schmuki, *Electrochimica Acta* 52 (2006) 1258.
- [83] E.I. Dorozhkina, M. Epple, S.V. Dorzhkin, *Key Engineering Materials* 240-242 (2003) 85.
- [84] E. Méndez, M. Wörner, C. Lages, M.F. Cerdá, *Langmuir* 24 (2008) 5146.
- [85] R. Ge, W. Fu, H. Yang, Y. Zhang, W. Zhao, Z. Liu, C. Wang, H. Zhu, Q. Yu, G. Zou, *Materials Letters* 62 (2008) 2688.
- [86] E. Peláez-Abellán, L. Rocha-Sousa, W.D. Müller, a.C. Guastaldi, *Corrosion Science* 49 (2007) 1645.
- [87] J.M. Macak, K. Sirotna, P. Schmuki, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 3679.
- [88] X. Yu, Y. Li, W. Wlodarski, S. Kandasamy, K. Kalantarzadeh, *Sensors and Actuators B: Chemical* 130 (2008) 25.
- [89] M.R. Sturgeon, P. Lai, M.Z. Hu, *Journal of Materials Research* 26 (2011) 2612.
- [90] J.M. Macak, H. Hildebrand, U. Marten-Jahns, P. Schmuki, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 621 (2008) 254.
- [91] S. Xiao, J. Qu, H. Liu, X. Zhao, D. Wan, *Journal of Solid State Electrochemistry* 13 (2009) 1959.
- [92] L.V. Taveira, J.M. Macák, H. Tsuchiya, L.F.P. Dick, P. Schmuki, *Journal of The Electrochemical Society* 152 (2005) B405.
- [93] a. Jaroenworoluck, D. Regonini, C. Bowen, R. Stevens, (2008) 2.
- [94] D. Reinhardt, S. Kriek, S. Meyer, *Electrochimica Acta* 52 (2006) 825.
- [95] J. Bai, B. Zhou, L. Li, Y. Liu, Q. Zheng, J. Shao, X. Zhu, W. Cai, J. Liao, L. Zou, *Journal of Materials Science* 43 (2008) 1880.
- [96] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, *Angewandte Chemie - International Edition* 50 (2011) 2904.
- [97] E.N. Paleolog, *Journal of The Electrochemical Society* 125 (1978) 1410.
- [98] Z.-Y. Luo, D.-C. Mo, S.-S. Lu, *Journal of Materials Science* 49 (2014) 6742.
- [99] A. Kar, K.S. Raja, M. Misra, *Surface and Coatings Technology* 201 (2006) 3723.
- [100] J.M. Macak, H. Tsuchiya, A. Ghicov, K. Yasuda, R. Hahn, S. Bauer, P. Schmuki, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 11 (2007) 3.
- [101] J.M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerova, P. Schmuki, *Angewandte Chemie - International Edition* 44 (2005) 7463.
- [102] H. Li, L. Cao, W. Liu, G. Su, B. Dong, *Ceramics International* 38 (2012) 5791.
- [103] R.N. Wenzel, *Industrial & Engineering Chemistry* 28 (1936) 988.
- [104] A.B.D. Cassie, S. Baxter, *Transactions of the Faraday Society* 40 (1944) 546.
- [105] L. Yang, M. Zhang, S. Shi, J. Lv, X. Song, G. He, Z. Sun, *Nanoscale Research Letters* 9 (2014).
- [106] A.M. Schmidt, D.S. Azambuja, E.M.a. Martini, *Corrosion Science* 48 (2006) 2901.
- [107] H. Ishizawa, M. Ogino, *Journal of Biomedical Materials Research* 29 (1995) 65.
- [108] X. Zhu, D.W. Son, J.L. Ong, K. Kim, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14 (2003) 629.
- [109] Y. Han, S.H. Hong, K. Xu, *Surface and Coatings Technology* 168 (2003) 249.

- [110] W.H. Song, Y.K. Jun, Y. Han, S.H. Hong, *Biomaterials* 25 (2004) 3341.
- [111] Z. Liu, G.E. Thompson, *Journal of Materials Engineering and Performance* 24 (2014) 59.
- [112] S. Rollin-Martinet, A. Navrotsky, E. Champion, D. Grossin, C. Drouet, *American Mineralogist* 98 (2013) 2037.
- [113] C. Liu, Y. Huang, W. Shen, J. Cui, *Biomaterials* 22 (2001) 301.
- [114] D. Eichert, M. Salomé, M. Banu, J. Susini, C. Rey, *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 60 (2005) 850.
- [115] E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.a. Planell, S.M. Best, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 177.
- [116] S.V. Dorozhkin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24 (2013) 1335.
- [117] J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier Science, 2013.
- [118] Y.S. Wu, Y.H. Lee, H.C. Chang, *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 237.
- [119] R. Narayanan, S.K. Seshadri, *Materials Chemistry and Physics* 106 (2007) 406.
- [120] H. Ito, Y. Oaki, H. Imai, *Cryst. Growth Des.* 8 (2008) 1055.
- [121] J. Kunze, L. Müller, J.M. Macak, P. Greil, P. Schmuki, F.a. Müller, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 6995.
- [122] M.-G. Ma, *International Journal of Nanomedicine* (2012) 1781.
- [123] D.W. Kim, I.S. Cho, J.Y. Kim, H.L. Jang, G.S. Han, H.S. Ryu, H. Shin, H.S. Jung, H. Kim, K.S. Hong, *Langmuir* 26 (2010) 384.
- [124] F. Barrère. *Biomimetic calcium phosphate coatings: physicochemistry and biological activity*. University of Twente, Enschede, Holanda, 2002.
- [125] Y. Han, J. Zhou, L. Zhang, K. Xu, *Nanotechnology* 22 (2011).
- [126] B. Li, X. Liao, L. Zheng, X. Zhu, Z. Wang, H. Fan, X. Zhang, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3794.
- [127] J. Gustavsson, M.P. Ginebra, E. Engel, J. Planell, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 4242.
- [128] H.Y. Erbil, *Advances in Colloid and Interface Science* 170 (2012) 67.
- [129] P. Letellier, A. Mayaffre, M. Turmine, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 355 (2010) 197.
- [130] R.N. Wenzel, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry (Washington, D. C.)* 28 (1936) 988.
- [131] A.B.D. Cassie, S. Baxter, *Transactions of the Faraday Society* 40 (1944) 546.
- [132] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, *Journal of Chemical Education* 60 (1983) 702.
- [133] G.A. Mabbott, *Journal of Chemical Education* 60 (1983) 697.
- [134] R.S. Nicholson, *Analytical Chemistry* 37 (1965) 1351.
- [135] R.S. Nicholson, I. Shain, *Analytical Chemistry* 36 (1964) 706.
- [136] A.J. Bard, G. Inzelt, F. Scholz, *Electrochemical Dictionary*. Springer-Verlag, Berlin, 2008.

ANEXO 1. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

A1.1. MEDIDAS DE ÁNGULO DE CONTACTO

Las medidas de ángulo de contacto (CA) son esencialmente medidas de equilibrio termodinámico.[128, 129] El dispositivo empleado fue específicamente diseñado para cumplir con los requisitos de tal equilibrio,[65] ya que incluye un sistema cerrado con un ambiente saturado de humedad, de manera que se pueda establecer el equilibrio entre la gota de líquido y el vapor de agua que satura la cámara. Una vez establecida esta condición, y trabajando a temperatura ambiente, es posible medir el ángulo de contacto que forma una gota de agua sobre una superficie (Figura 63). Se establecen 3 definiciones principales, en función del ángulo medido:

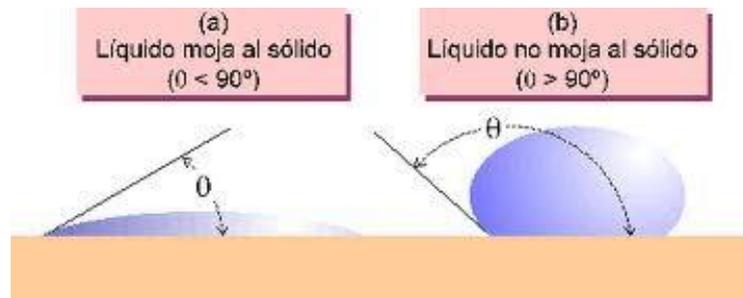


FIGURA 63. DEFINICIONES DE ÁNGULOS DE CONTACTO EN FUNCIÓN DE LA FORMA DE LA GOTTA SOBRE LA SUPERFICIE

- Superficie hidrofílica, aquella que es “mojada” por la gota de agua, la que forma un ángulo de contacto $CA < 30^\circ$.
- Superficie hidrofóbica, que no es “mojada” por la gota de agua, la que forma un ángulo de contacto $CA > 90^\circ$
- Superficie parcialmente humectable, es aquella en la que la gota de agua forma un ángulo de contacto entre $30^\circ < CA < 90^\circ$

Estas definiciones se establecen para superficies lisas, y en todos los casos se cumple el modelo de Young), para el que se define el ángulo de contacto intrínseco, θ_y :

$$\cos(\theta_y) = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}$$

donde γ_i representa la tensión interfacial para los equilibrios sólido-vapor (SV), sólido-líquido (SL) y líquido-vapor (LV).

Cuando la superficie es rugosa, el modelo de Young debe ser corregido para tener en cuenta dicha rugosidad, para dar lugar al modelo de Wenzel: [130]

$$\cos(\theta_w) = r \cos(\theta_\gamma)$$

donde θ_w representa al ángulo de contacto aparente de Wenzel. Este modelo parte del supuesto que la superficie rugosa es químicamente homogénea.

El modelo de Wenzel predice un aumento del carácter hidrofóbico o hidrofílico de una superficie con la rugosidad de la misma. Cuando se emplean superficies lisas químicamente heterogéneas, el modelo de Cassie da cuenta del ángulo de contacto medido como el promedio ponderado de las mojabilidades características de las superficies involucradas:

$$\cos(\theta_c) = f_1 \cos(\theta_{\gamma,1}) + f_2 \cos(\theta_{\gamma,2})$$

El caso final corresponde a una superficie que presenta irregularidades tanto físicas como químicas. En este caso, el modelo de Cassie-Baxter [131] propone una situación en la que el líquido no queda en contacto con la totalidad de la superficie rugosa, sino que quedan pequeños bolsones de aire encerrado en las ranuras de la superficie, dando lugar a una interface mixta, tipo SL y LV.

$$\cos(\theta_{CB}) = r_f \cos(\theta_\gamma) + f - 1$$

donde f representa la fracción del sólido que se encuentra en contacto con el líquido, y r_f es la rugosidad correspondiente al área de mojado. Este estado particular se le denomina “estado faquir”, y corresponde a una situación metaestable, que con el tiempo deriva inevitablemente en un estado tipo Cassie.

La presencia de los bolsones de aire debido a rugosidades en la escala nano aumenta significativamente la hidrofobicidad o hidrofiliidad original, estableciéndose dos nuevos regímenes para definir la mojabilidad de las superficies:

- Superficie superhidrofílica, en la que el ángulo de contacto formado es $CA < 10^\circ$
- Superficie superhidrofóbica, en la que el ángulo de contacto formado es $CA > 150^\circ$

Por lo tanto la obtención de una superficie cuya mojabilidad se encuentre en los extremos posibles es indicativo de una topografía nanoestructurada.

A1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SUPERFICIES

La composición química de la superficie metálica puede obtenerse por dos métodos: la espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*, EDS) o la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS).

A1.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA POR EDS

Las medidas por EDS hacen uso del espectro de rayos X emitido por una muestra sólida que es bombardeada con un haz de electrones, para obtener un análisis químico localizado. Todos los elementos de números atómicos 4 (Be) a 92 (U) se pueden detectar por este principio. El análisis cualitativo involucra la identificación de las líneas espectrales, mientras que el análisis cuantitativo involucra la medida de la intensidad de cada línea para cada elemento en la muestra. Las medidas pueden hacerse sobre puntos

específicos de la muestra, o se puede seleccionar un área de manera de obtener mapas de distribución de elementos en toda el área seleccionada.

Los sistemas de medida por EDS se encuentran usualmente asociados a los microscopios de barrido electrónico (SEM). Estos microscopios están equipados con un cátodo y unos lentes magnéticos que se emplean para enfocar el haz de electrones con el que se bombardea la muestra.

Las medidas de intensidad de los rayos X se lleva a cabo por conteo de fotones, y la precisión alcanzada puede llegar a ser mejor que el 1 % para los elementos más pesados, y del 2 % para los más livianos. Los límites de detección pueden llegar al 1 ‰ (en peso), valor que puede reducirse empleando tiempos de conteo mayores.

La resolución espacial queda determinada por el grado de penetración y esparcimiento del haz de electrones sobre la muestra. Como los electrones son capaces de penetrar una cantidad de masa fija, la resolución espacial pasa a ser una función de la densidad de la muestra. Usualmente, la resolución es de unas 2 μm . Cuando se usa una capa delgada conductora, el esparcimiento del haz queda limitado, y se llega a mejores resoluciones.

Durante el bombardeo de electrones producido por el haz, los electrones del material que ocupan los orbitales más internos son removidos del mismo, dejando una vacante que es ocupada por los electrones de orbitales de mayor energía. Esta transición electrónica tiene asociada una energía que es típica de cada átomo, la cual puede ser medida para su cuantificación. Estas energías se miden en electron volts (eV), que corresponde a 1.602×10^{-19} J. El rango de energías de interés para el análisis por EDS se encuentra en el rango 1 – 10 keV.

A1.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA POR XPS

La técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), también conocida como espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA), es una de las más utilizadas a nivel de técnicas de caracterización superficial, proveyendo información valiosa de la composición química de una capa superficial de no más de 80 Å de profundidad. La técnica se basa en el principio de fotoemisión. Cuando los fotones derivados de una fuente de rayos X de alta energía golpean la superficie de una muestra, la energía del fotón puede ser transferida directamente a un electrón de la capa de valencia, de tal forma que si su energía excede a la correspondiente a la energía de unión (*binding energy*, BE) del electrón de la capa de valencia, éste es eyectado como un fotoelectrón. Su energía cinética (KE) es medida por un analizador de energía, y a través de una ecuación simple, se puede relacionar esta energía cinética con la energía de unión:

$$KE = h\nu - BE$$

donde el producto $h\nu$ es la energía del fotón incidente.

La energía de unión del fotoelectrón es característica del elemento y del orbital molecular desde el cual fue eyectado, dando lugar a un espectro de picos para cada orbital de los elementos presentes en la muestra. El área bajo el pico es proporcional al número de electrones emitidos a una energía de unión específica, por lo que se relaciona con el número de átomos de ese tipo presente en la muestra.

A1.3. ESPECTROSCOPIA IR POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es un tipo de espectrometría de absorción que tiene lugar en la región infrarroja del espectro electromagnético. En esta región, los enlaces de las sustancias poseen energías de vibración específicas que ocurren a frecuencias (energías) que dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular y las masas atómicas de los elementos que forman el enlace.

Para que la absorción de energía en esa región de lugar a una absorción deben cumplirse algunas condiciones. Cuando se produce la absorción de energía, la molécula debe producir un cambio en el momento dipolar. En estas condiciones se dice que se el modo vibracional es IR activo. En la aproximación de Born-Oppenheimer, cuando el hamiltoniano molecular correspondiente al estado electrónico estándar puede ser aproximado por un oscilador armónico cuántico en las cercanías de la geometría molecular de equilibrio, las frecuencias vibracionales de resonancia son determinadas por los modos normales correspondientes a la superficie de energía potencial del estado electrónico estándar. Estas frecuencias de oscilación se relacionan, en una primera instancia, con la longitud del enlace y las masas de los átomos en cada extremo del mismo. Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijereteo, rotación, giro y aleteo.

Desde el punto de vista práctico, las muestras son intrpuestas en el camino de un rayo de luz monocromática en la región del infrarrojo, y se registra la cantidad de energía absorbida. En general, la muestra es analizada en el rango de número de onda entre 4000 – 400 cm^{-1} . Las muestras se prensan entre dos ventanas transparentes al IR cuando se trata de líquidos. En el caso de muestras sólidas, las mismas se mezclan con KBr en una proporción 1 a 4 (en masa), y se prensan bajo una presión del orden de las toneladas para inducir la formación de una fase cristalina transparente del KBr.

A1.4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

A1.4.1 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Es el tipo más común de voltametría, en la que se mide la respuesta de corriente de un electrodo frente a una perturbación cíclica de potencial consistente en una rampa positiva seguido de otra negativa que culmina en el potencial de origen.

Cuando la especie electroactiva difunde en solución, se detecta una corriente de pico anódico positiva (I_{pa}) centrada a un potencial de pico anódico (E_{pa}). Cuando el potencial se revierte (E_{switch}), en el barrido catódico se detecta una corriente catódica negativa que dibuja un pico (I_{pc}) centrado en el potencial de pico catódico (E_{pc}).[132-135]

El pico de corriente para un proceso reversible a 25 °C, en condiciones de difusión lineal semi-infinita, está dado por la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2}$$

donde n es el número de electrones, A es el área del electrodo (cm^2), C es la concentración (mol cm^{-3}), D es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), y ν es la velocidad de barrido (V s^{-1}). Por tanto la corriente es directamente proporcional a la concentración y aumenta con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

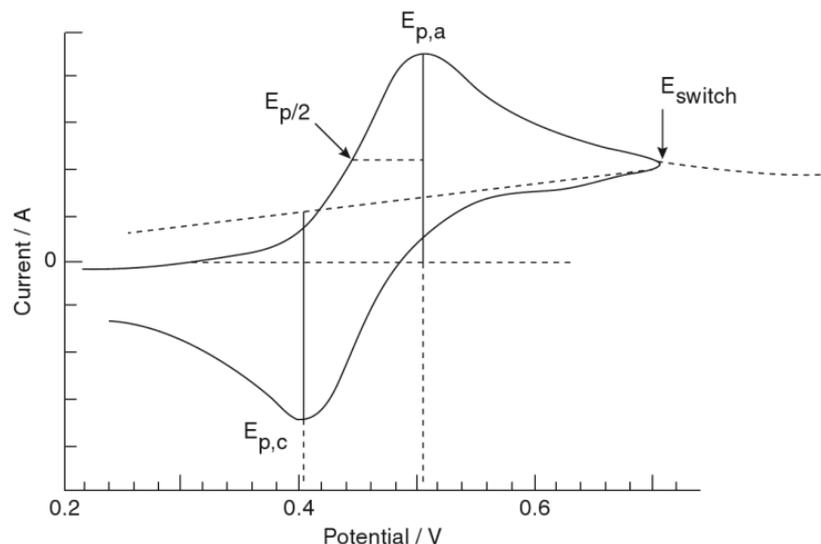


FIGURA 64. RESPUESTA DE CORRIENTE A LA APLICACIÓN DE UN BARRIDO DE POTENCIAL CÍCLICO, PARA EL CASO DE UNA ESPECIE ELECTROACTIVA EN SOLUCIÓN. ADAPTADO DE REF.[136]

La relación de los picos de corriente catódica y anódica, $i_{p,a}/i_{p,c} = 1$ para una cupla reversible simple. La posición de los picos catódico y anódico sobre el eje del potencial (E_p) están relacionados con el potencial formal del proceso redox:

$$E^o = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2}$$

y la separación entre los picos, en V, está dada por:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0.059}{n}$$

La separación de picos puede ser utilizada para determinar el número de electrones intercambiados, y como criterio para el comportamiento Nernstiano. Tanto la posición del pico catódico como anódico son independientes de la velocidad de barrido.

Para un proceso irreversible (aquel que presenta un intercambio electrónico lento), los picos individuales se encuentran reducidos en tamaño y muy separados entre sí. Los sistemas totalmente irreversibles se caracterizan por un corrimiento del potencial de pico con la velocidad de barrido:

$$E_p = E^o - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.78 - \ln \left(\frac{k^o}{\frac{1}{D^2}} \right) + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right]$$

donde α es el coeficiente de transferencia y n_a es el número de electrones involucrados en el paso determinante de la velocidad de transferencia de carga. De esta manera, el E_p se ubica a potenciales mayores que E^o , y este sobrepotencial está relacionado con la velocidad de transferencia de carga (k^o)

y α . Independientemente del valor de k^o , este desplazamiento del potencial de pico puede ser compensado por un cambio en la velocidad de barrido.

La corriente de pico para el proceso irreversible está dada por:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Cuando el proceso electroquímico se encuentra inmovilizado sobre la superficie del electrodo, la voltamperometría cíclica da lugar a un perfil diferente al mostrado en el caso difusional: la curva de respuesta asemeja una campana gaussiana.

Para un intercambio electrónico de 1 e, el ancho de medio pico es de 90.6 mV, y la corriente de pico varía linealmente con la velocidad de barrido de potencial:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} v$$

donde Γ representa la concentración superficial de la especie electroactiva.

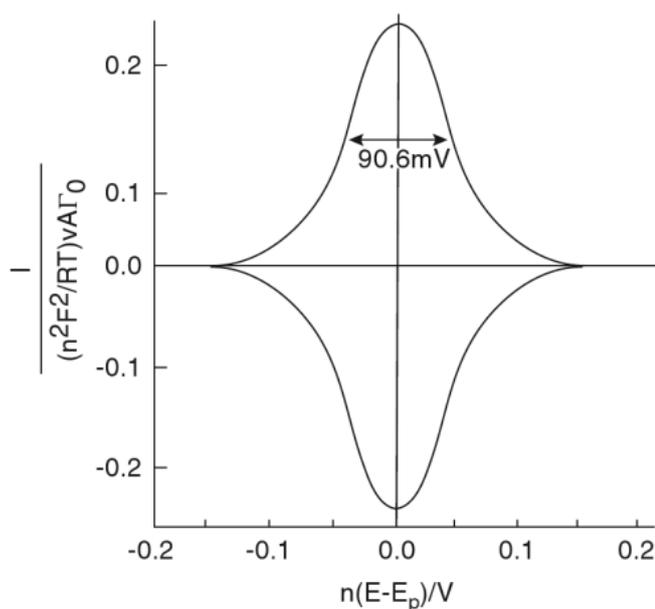


FIGURA 65. RESPUESTA DE CORRIENTE A LA APLICACIÓN DE UN BARRIDO DE POTENCIAL CÍCLICO, PARA EL CASO DE UNA ESPECIE ELECTROACTIVA ADSORBIDA SOBRE EL ELECTRODO. ADAPTADO DE REF.[136]

A1.4.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

La Espectroscopia Impedancia Electroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS), es una técnica no destructiva que permite caracterizar el comportamiento electroquímico de una interfase

electrodo-electrolito. Tiene por tanto aplicaciones importantes en la evaluación del desempeño de metales desnudos o recubiertos en diferentes ambientes

La impedancia o impedancia compleja (Z) de un sistema electroquímico se define sobre la base de una corriente alterna de la forma $I = I_o + I' \cos(\omega t + \varphi)$ que circula a la misma frecuencia ω que el potencial impuesto al electrodo de trabajo, $E = E_o + E' \cos(\omega t)$, en un entorno de potencial del orden de los mV. El cociente de las amplitudes de potencial y corriente, E'/I' , junto con el ángulo de fase φ , aportan la información necesaria para definir la impedancia compleja:

$$Z = \frac{E'}{I'} \exp(-i\varphi)$$

donde i es la unidad imaginaria ($i = \sqrt{-1}$). Esta impedancia compleja puede escribirse en función de dos cantidades reales:

$$Z' = \text{Re}(Z) = \frac{E'}{I'} \cos\varphi$$

$$Z'' = \text{Im}(Z) = -\frac{E'}{I'} \sin\varphi$$

que se conocen como la parte “real” y “compleja” de la impedancia, respectivamente. El módulo y el argumento de la impedancia se calculan como:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} = \frac{E'}{I'}$$

$$\arg(Z) = \arctg\left(\frac{Z''}{Z'}\right) = -\varphi$$

Las medidas de espectroscopía de impedancia requieren el cumplimiento de algunas condiciones: i) la medida se lleva a cabo en condiciones de equilibrio ($I_o = 0$); ii) el estado de equilibrio debe ser estable, lo cual se logra disminuyendo la amplitud de la perturbación externa a un mínimo; iii) la amplitud del potencial sinusoidal impuesto debe ser lo suficientemente pequeño como para que la corriente inducida en el sistema se encuentre dentro del rango lineal de respuesta, es decir, E' e I' deben ser proporcionales; iv) el registro de la impedancia sólo debe hacerse una vez que se establezca una variación nula de la intensidad del sistema (condición de equilibrio electroquímico).

La corriente que fluye en el circuito se debe a la circulación de electrones en los electrodos metálicos y de iones en electrolito. Para interpretar la corriente de iones conviene distinguir dos procesos en la superficie del electrodo de trabajo: uno que incluye reacciones químicas y transferencia de electrones a través de la interface electrodo-solución y que puede llamarse proceso faradaico, por cuanto se cumple la ley de Faraday de que la cantidad de carga transferida es proporcional a la cantidad de la reacción química involucrada. El otro proceso no-faradaico y sin reacciones de transferencia de carga a través de la interface, se debe a adsorciones y desorciones que generan en el circuito señales de corriente alterna. Para poder interpretar la impedancia medida, es necesario representar el sistema electroquímico a través de un circuito que se denomina circuito equivalente, y donde los diferentes elementos que lo integran representan procesos faradaicos y no-faradaicos involucrados en el sistema en estudio. La migración de iones en el electrolito y lejos de la interface, igual que la circulación de electrones en los metales, exhiben un comportamiento tipo óhmico, razón por la cual se incluye siempre un elemento resistivo R_{sol} en el circuito equivalente. Por su parte, el movimientos de reactivos y de productos de las reacciones químicas,

hacia o fuera de la interface, o en la superficie de la misma, pueden distinguirse entre sí de acuerdo al régimen difusional involucrado: semi-infinito, finito, o sobre superficies porosas. La impedancia en cada uno de los casos tendrá su expresión matemática correspondiente (Tabla 28).

TABLA 28. ELEMENTOS PRINCIPALES EMPLEADOS EN LOS CIRCUITOS EQUIVALENTES

Elemento del circuito equivalente	Impedancia
Resistencia(R)	R
Capacitor (C)	$\frac{1}{\omega C}$
Elemento de fase constante (Q)	$\frac{1}{Y} (i\omega)^n$
Warburg difusión semi-infinita (W_s)	$\frac{1}{Y} \sqrt{i\omega}$
Warburg difusión límites porosos (W_o)	$\frac{1}{Y} \sqrt{i\omega} \coth(B\sqrt{i\omega})$
Warburg difusión infinita (W_T)	$\frac{1}{Y} \sqrt{i\omega} \operatorname{th}(B\sqrt{i\omega})$

ANEXO 2. CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS

En este Anexo se muestran los resultados obtenidos en la Tesis de Licenciatura de Marco Navatta, que fue hecha en el marco del Proyecto ANII – FCE dirigido por el Dr. Eduardo Méndez. El objetivo de la Tesis del Lic. Navatta fue sintetizar diferentes apatitas, y caracterizarlas por FTIR (Figura 66) y XRD (Figura 67) de manera de obtener datos relevantes para la identificación de las bandas vibracionales de las apatitas depositadas sobre diferentes sustratos. Los resultados de esta Tesis fueron analizados en conjunto entre el estudiante Navatta, la Lic. Pereyra y el Dr. Méndez.

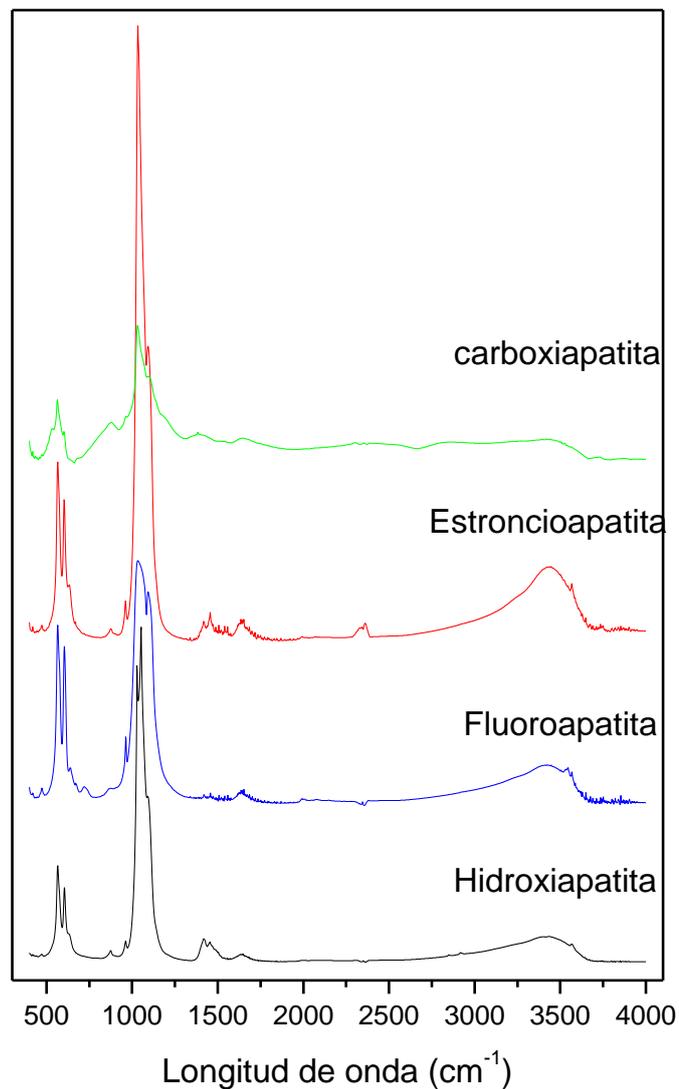


FIGURA 66. ESPECTROS FTIR PARA LAS DIFERENTES APATITAS SINTETIZADAS EN EL TRABAJO DE TESINA DEL LIC. MARCO NAVATTA.

Los detalles del análisis de estos espectros a través del método de espectrometría derivada se encuentra en la mencionada Tesis de Grado. El análisis fue realizado en conjunto en el Laboratorio de Bioamateriales, y dio lugar a la Tabla de asignación de espectros que se muestra en la Tabla 25.

Los espectros XRD (Figura 67) fueron realizados para las apatitas sintetizadas. La asignación de los picos se lleva a cabo con el patrón de difracción reportado en las Tablas Internacionales.

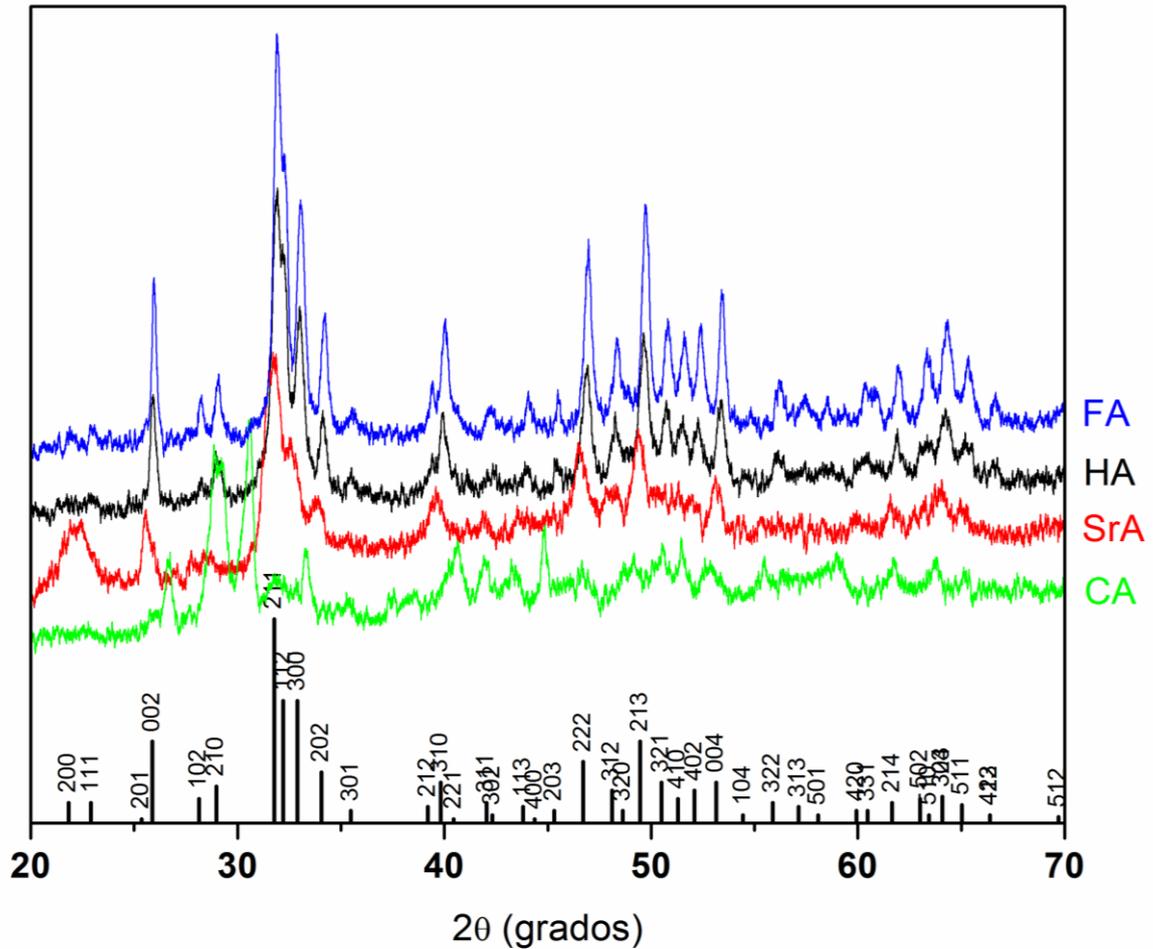
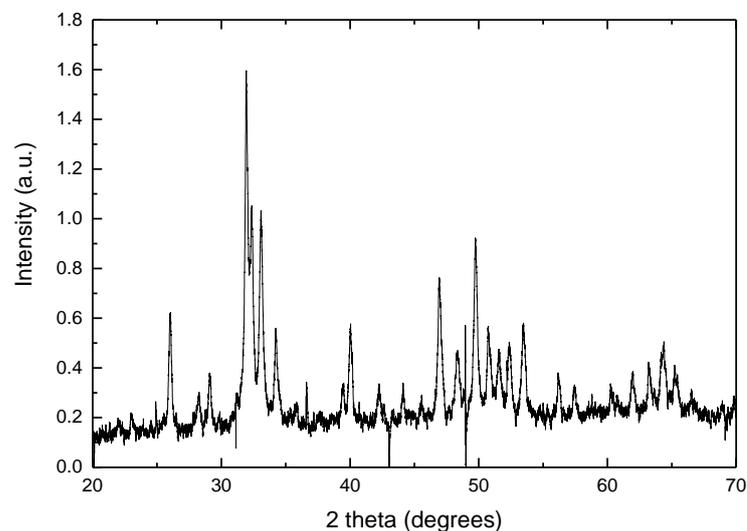


FIGURA 67. ESPECTROS XRD PARA LAS APATITAS SINTETIZADAS, JUNTO CON EL PATRÓN PARA LA HIDROXIAPATITA

ANEXO 3. ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES

En el transcurso de este trabajo de Tesis, una empresa colombiana nos solicitó evaluar sus productos para explicar el bajo grado de adhesión de las hidroxiapatitas sobre los tornillos de titanio desarrollados por ellos para uso quirúrgico. Por razones de confidencialidad, el nombre de la empresa se mantendrá en reserva, y sólo se mostrarán los estudios realizados y las conclusiones a las que se llegó.

La evaluación se hizo bajo la hipótesis de trabajo que, o el tornillo, o la hidroxiapatita, o ambos, no se encontraban nanoestructurados, y por lo tanto no se producía la adecuada complementación topográfica para conseguir la adhesión necesaria. Para ello, se tomaron imágenes SEM de los tornillos sin recubrimiento y con recubrimiento, y se pidió a la empresa muestra del recubrimiento de hidroxiapatita para su análisis por FTIR y XRD.



De acuerdo con lo indicado por la empresa, se empleó el método de precipitación acuosa para la síntesis de la hidroxiapatita, mezclando soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M y $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.48 M en relación Ca/P de 1.67, y basificando el pH hasta 10. Luego de agitar en forma continua durante 3 hs, la solución se dejó envejecer por 144 hs, se secó a 60 °C por 24 hs y se calcinó a 1050 °C por 1 h. La hidroxiapatita resultante se adhirió a los tornillos quirúrgicos mediante el proceso electroforético.

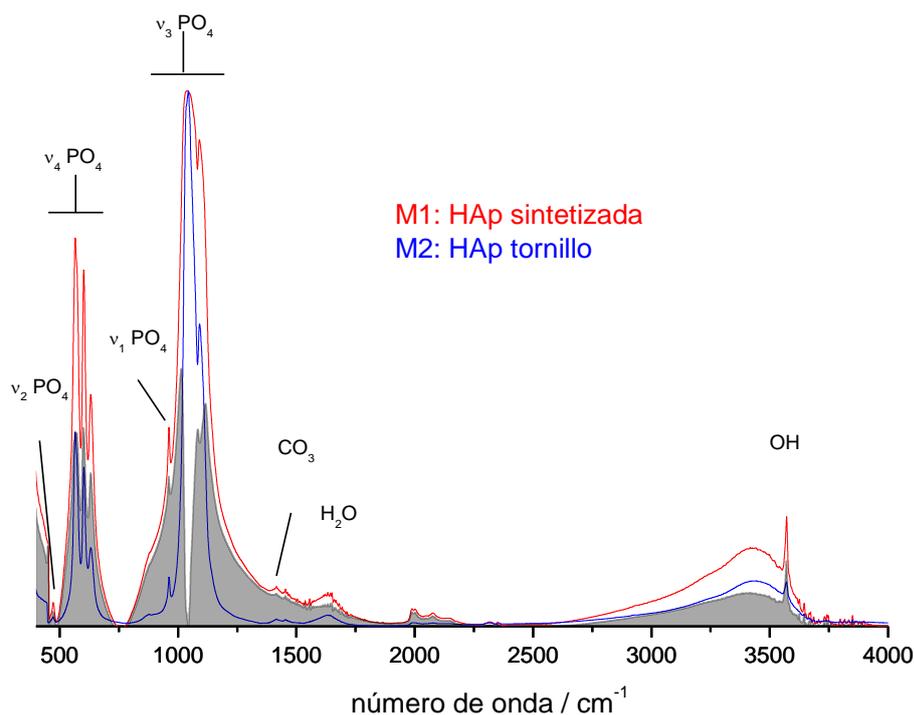


FIGURA 68. ANÁLISIS POR FTIR DE LA MUESTRA DE HIDROXIAPATITA COMERCIAL (TRAZO ROJO) Y LA HIDROXIAPATITA DEPOSITADA SOBRE EL TORNILLO QUIRÚRGICO (TRAZO AZUL) EMPLEANDO EL MÉTODO ELECTROFORÉTICO. EN GRIS SE REPRESENTA EL ESPECTRO RESTA ENTRE AMBOS.

El análisis de la región $\nu_3\text{PO}_4$ entre $800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 69) para la hidroxiapatita sintetizada mostró una banda de absorción compleja cuyo máximo se extiende entre 1030 y 1050 cm^{-1} , que incluye bandas correspondiente a grupos fosfatos en ambientes apatíticos y no-apatíticos. Por su parte, la hidroxiapatita depositada sobre el tornillo muestra dos bandas parcialmente superpuestas, con máximos relativos centrados en 1041 cm^{-1} y 1089 cm^{-1} , que se identifican como fosfatos en ambientes apatíticos. La muestra sintetizada muestra una absorción continua entre $800 - 1014 \text{ cm}^{-1}$ y entre 1117 hasta 1400 cm^{-1} , que se pierde selectivamente durante la deposición sobre el tornillo. Estas regiones incluyen las bandas de absorción de grupos PO_4 en ambientes no-apatíticos, así como las bandas de absorción de grupos HPO_4 .

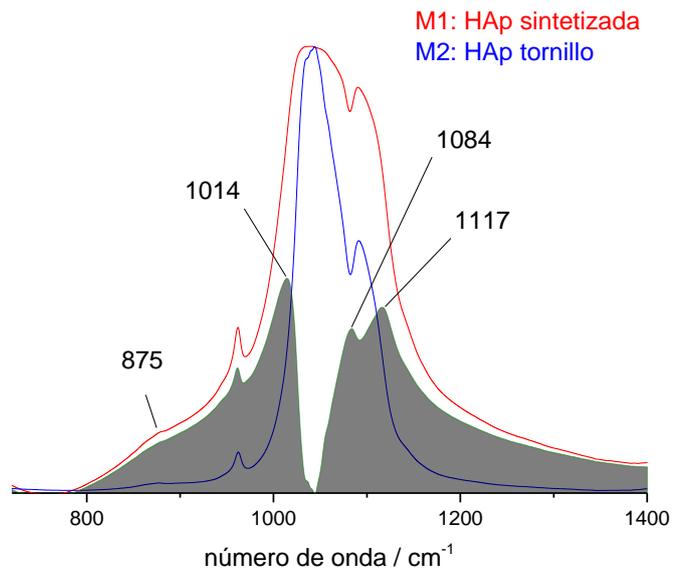


FIGURA 69. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA REGIÓN $\nu_3\text{PO}_4$

La región $\nu_4\text{PO}_4$ entre $800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 70) de la hidroxiapatita sintetizada muestra bandas centradas en 567 cm^{-1} y 602 cm^{-1} , características del grupo PO_4 en ambientes apatíticos, junto con la banda del grupo OH centrada en 631 cm^{-1} . Adicionalmente, aparece un hombro a 575 cm^{-1} , que corresponde al grupo PO_4 en ambientes no-apatíticos. Las mismas bandas aparecen en la hidroxiapatita depositada sobre los tornillos, pero del análisis de la porción que se pierde durante la deposición, se observa la pérdida selectiva de las regiones no-apatíticas, dadas por la banda a 575 cm^{-1} , y una serie de bandas superpuestas entre $500 - 560 \text{ cm}^{-1}$, que puede ser atribuida a las bandas de absorción del grupo HPO_4 reportadas a $533, 551$ y 562 cm^{-1} junto con la banda del grupo PO_4 en regiones no-apatíticas.

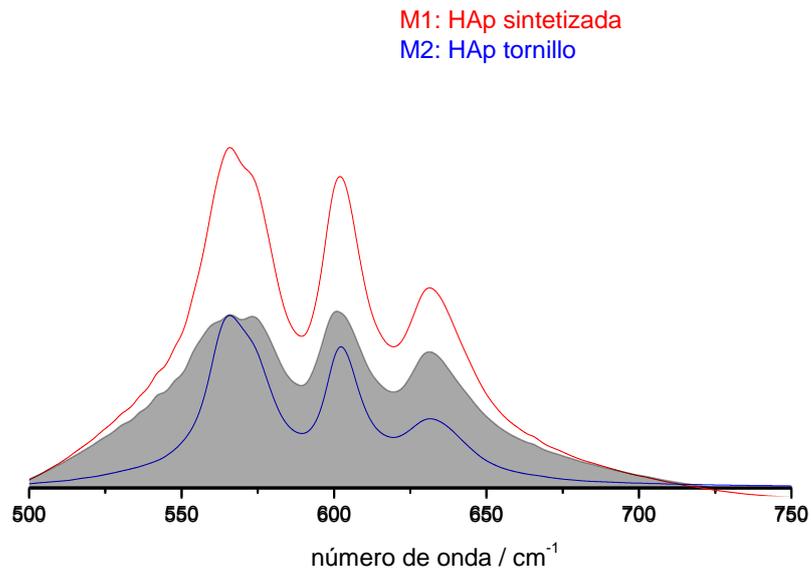


FIGURA 70. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA REGIÓN $\nu_4\text{PO}_4$

Finalmente, cabe notar que la hidroxiapatita sintetizada muestra una banda de absorción centrada en 877 cm^{-1} , que se asigna al grupo CO_3 tipo A, y que permanece en la hidroxiapatita adherida al tornillo. También la presencia de la banda de absorción aguda a 3573 cm^{-1} correspondiente al grupo OH aparece tanto en la hidroxiapatita sintetizada como en la adherida al tornillo, y es típica de las hidroxiapatitas estequiométricas.

El análisis realizado permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- La hidroxiapatita sintetizadas es una carboxiapatita tipo A, con la presencia de regiones apatíticas y no-apatíticas.
- La hidroxiapatita que permanece adherida a los tornillos muestra la presencia corresponde a una carboxiapatita con un alto grado de componentes estequiométricos).
- La porción de apatita perdida durante el proceso de adsorción responde principalmente a las regiones no-apatíticas de la carboxiapatita sintetizada.

En resumen, el material sintetizado, una vez depositado sobre los tornillos, ve modificado su región externa consistente en los dominios no-apatíticos, manteniéndose la región apatítica (estequiométrica) sobre el tornillo. En consecuencia, se produce una baja adhesión de las hidroxiapatitas sobre la superficie del tornillo.