



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**MODIFICACIONES INDUCIDAS EN SUPERFICIES DE TITANIO Y ÓXIDO DE
TITANIO POR LA INMERSIÓN EN SOLUCIONES RICAS EN PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA:
M EN C. ABRIL FONSECA GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA.SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. MARGARITA RIVERA HERNANDEZ
INSTITUTO DE FÍSIC6
DR. STEPHEN MUHL SAUNDERS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2017.
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES.....	III
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	V
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 EL TITANIO Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS.....	3
2.2 ESTADO DEL ARTE DEL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEL TITANIO COMO IMPLANTE	6
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVO GENERAL	12
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
5. MATERIALES Y METODOS.....	14
5.1 MATERIALES	15
5.2 MÉTODOS	15
5.2.1 Preparación de las muestras	15
5.2.2 Crecimiento de las películas de óxido de titanio cristalina y amorfa mediante evaporación catódica en radiofrecuencia	16
5.2.2.1 Determinación de la estructura mediante difracción de rayos X	17
5.2.3 Reacción a cuerpo extraño o respuesta Inflamatoria	19
5.2.3.1 Respuesta inflamatoria simulada	20
5.2.4 Caracterización de los materiales prístinos y tratados con la respuesta inflamatoria simulada.....	22
5.2.4.1 Cuantificación de la composición química mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X	22
5.2.4.2 Evaluación de morfología, topografía y rugosidad mediante técnicas microscópicas y perfilometría	24
5.2.4.3 Determinación de la mojabilidad de los materiales	27
5.2.4.4 Calculo la energía libre superficial mediante ángulo de contacto	30
5.2.4.5 Valoración de la carga en superficie	33
5.2.4.6 Determinación de la respuesta electroquímica	35
5.2.4.6.1 Potencial a circuito abierto.....	39
5.2.4.6.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica	40

5.2.4.6.2.1 Respuesta del electrodo a un potencial de perturbación sinusoidal	40
5.2.4.6.2.2 Interpretación de los resultados de impedancia	42
5.2.4.6.3 Polarización potenciodinámica.....	44
5.2.5 Funcionalidad de los materiales como biomateriales	46
5.2.5.1 Ensayos de adhesión celular y de diferenciación celular	51
6. RESULTADOS	53
6.1 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS MATERIALES	53
6.2 CUANTIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA EN SUPERFICIES	56
6.3 ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA, TOPOGRAFÍA	64
6.4 ANÁLISIS DE RUGOSIDAD	69
6.5 ÁNGULO DE CONTACTO CON AGUA	71
6.6 DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA DE SUPERFICIE	72
6.7 ANÁLISIS DE LA CARGA EN SUPERFICIE.....	75
6.8 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE LOS MATERIALES.....	77
6.8.1 Potencial a circuito abierto.....	77
6.8.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica.....	79
6.7.2.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en cpTi	80
6.7.2.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en SS	82
6.7.2.3 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en cTiO ₂	84
6.7.2.4 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en aTiO ₂	85
6.8.3 Polarización potenciodinámica.....	87
6.9 FUNCIONALIDAD DE LOS MATERIALES COMO BIOMATERIALES.....	89
6.9.1 Estudio de la adhesión celular	90
6.9.2 Estudio de diferenciación celular	94
6.9.2.1 Expresión de RUNX-2 en núcleos	94
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	100
7.1 cpTi versus SS	101
7.2 Discusión de cpTi versus cTiO ₂ y aTiO ₂	108
8. CONCLUSIONES	114
9. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS.....	116
10. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS.....	117
11. REFERENCIAS	119
12. ANEXOS	130
ANEXO1	130

ANEXO 2	136
ANEXO 3	139

Resumen

Actualmente, el titanio es considerado el mejor material para reemplazo óseo, esto debido a su alta resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y su osteointegración, esta última cualidad se ha visto en resultados *in vivo*, su única desventaja es su baja resistencia al desgaste. Sin embargo, muchos autores proponen que el éxito del titanio radica en las propiedades intrínsecas de su óxido nativo. Una de las hipótesis planteadas para explicar la osteointegración del titanio es que la capa de óxido nativo crece a causa de las condiciones químicas generadas durante la respuesta inflamatoria fisiológica (presencia de especies reactivas como el peróxido de hidrógeno), generando una capa porosa con capacidad de captación de iones de calcio y fósforo del medio biológico.

La propuesta de este trabajo de investigación fue simular las condiciones químicas del medio biológico durante un proceso de respuesta inflamatoria y evaluar los cambios en las propiedades superficiales del titanio una vez que ha sido expuesto a dichas condiciones en el laboratorio por periodos de tiempo prolongados (7 días). La respuesta inflamatoria simulada consistió en colocar en inmersión a los materiales de estudio en una solución Hartmann con una concentración 50 mM de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a un pH= 5.2, y 37 °C, esta solución fue remplazada cada 24 horas. Para corroborar si la respuesta del titanio es exclusiva, se sometió otro metal utilizado en implantes ortopédicos, como el acero inoxidable de grado médico, al mismo tratamiento en solución inflamatoria simulada.

Por otro lado, considerando que la biocompatibilidad del titanio se asocia a su capa de óxido nativo, se propuso comparar al titanio y el acero con películas de óxido de titanio crecidas en el laboratorio. Películas de alrededor de 70 nm de TiO_2 amorfas y cristalinas fueron depositadas sobre sustratos de titanio utilizando un sistema de evaporación catódica, dicho espesor sería 5-6 veces mayor que el espesor de una capa de óxido nativo.

Las propiedades evaluadas antes y después del tratamiento fueron la composición química superficial, la rugosidad, la mojabilidad, la energía y carga de superficie. Igualmente se evaluó la respuesta electroquímica de los materiales, utilizando a la solución Hartmann como electrólito. Finalmente, se realizaron ensayos de adhesión y diferenciación celular utilizando osteoblastos humanos

En resumen, observamos que el titanio es el que sufre los mayores cambios de superficie debido al H_2O_2 y efectivamente la interacción celular mejora después del tratamiento. Esto nos hace pensar que el Ti a diferencia del acero sufre una mejor adaptación en los ambientes fisiológicos. El análisis del comportamiento electroquímico y biológico de las películas de TiO_2 nos permite proponerlas como una alternativa para el desarrollo de recubrimientos que mejoren el funcionamiento de implantes metálicos no basados en titanio.

Abstract

At the present time, titanium is considered the best material for bone replacement. This metal has high corrosion resistance, biocompatibility and promotes osseointegration as has been seen *in vivo* results. Titanium has only a disadvantage, its low wear resistance. However, most of the authors propose that the success of titanium is due to the intrinsic properties of its native oxide. The oxide layer grows as a response to the chemical environment present during the physiological inflammatory response (there are reactive oxygen species such as hydrogen peroxide), forming a porous layer with the capability to capture Calcium and Phosphor ions from the biological medium.

The proposal of this research work was to simulate the chemical conditions found in the biological medium during the inflammatory response process and evaluate the changes in the surface properties of titanium once that it has been exposed to such conditions in the lab for long periods (7 days). The simulated inflammatory conditions consisted of immersing the samples in Hartmann's solution adding 50 mM of hydrogen peroxide (H_2O_2) at pH= 5.2 and 37°C, the solution was changed every 24 hours.

To corroborate if the response of Ti is exclusive, another metal used in orthopedic implants such as the medical grade stainless steel was exposed to the same treatment of simulated inflammatory conditions.

On the other hand, since the biocompatibility of Ti has been attributed to the native oxide layer, it was proposed to compare the Ti and the stainless steel to titanium oxide coatings grown in the lab. Thin films of about 70 nm thick of amorphous and crystalline TiO_2 were deposited on Ti substrates by magnetron sputtering; such film thickness was 5-6 times thicker than the native oxide.

The properties evaluated before and after the treatment were surface chemical composition, roughness, surface energy and charge. Similarly, the electrochemical response of all materials was evaluated using the Hartmann solution as the electrolyte. Finally, assays of cell adhesion and proliferation of human osteoblasts were also performed.

In summary, it was found that titanium is the material that suffers the strongest changes due to the H_2O_2 and effectively, the cell interactions are improved after the treatment. Based on this, it might be thought that indeed Ti adapts better to the physiological medium than the stainless steel. The analysis of the electrochemical and biological response of the TiO_2 thin films allow us to propose them as an alternative for the development of coatings to improve the performance of non-Ti based metallic implants.

Agradecimientos profesionales

Al finalizar una etapa, siempre hay un sinfín de gratitud a todas las personas que hicieron posible llegar a la meta. Es por esto que es mi deseo manifestar y decir gracias a cada una de las personas e instituciones que hicieron posible esto.

Primero de todo al CONACyT institución quien me otorgó la beca con la cual fue posible mantener mi manutención en la Ciudad de México. Así como el apoyo CONACyT 251279.

Agradecimiento a la UNAM y al posgrado de ciencia en ingeniería de materiales por aceptarme como estudiante de doctorado y permitirme ser parte de esta gran casa educativa. Así como a los proyectos de DGAPA-PAPIIT (IN18814 y IN100116). Al proyecto de Phocsleen 318977.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) por permitirme realizar en sus instalaciones el desarrollo experimental de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Sandra Rodil por aceptarme como su estudiante, por su paciencia, porque ha sido una gran guía a lo largo de mi formación. Le doy gracias por todo su tiempo y dedicación, así como el apoyo económico que me brindó mediante la modalidad de ayudante de investigador-CONACYT.

Al Dr. Stephen Muhl por su apoyo y asesorías a lo largo de mis estudios de doctorado.

A la Dra. Margarita Rivera por sus valiosas recomendaciones y asesorías durante mi trabajo de investigación.

A la M. en C Erika Ruvalcaba, Dr. David Garcíadiago y a la Dra. Cristina Velasquillo por su apoyo y colaboración para el desarrollo de los estudios de adhesión celular y diferenciación celular en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

Al Dr. Andrés Castell, al Dr. José Campos, Dr. Alfredo Maciel y nuevamente al Dr. David Garcíadiago, por sus valiosas revisiones, con las cuales se enriqueció este trabajo de investigación.

A los técnicos del IIM-UNAM, la M en C. Adriana Tejeda Cruz, el Ing. Carlos Flores Morales, el Dr. Omar Novelo Peralta, Fis. Josué Esaú Romero Ibarra, el Q. Miguel Ángel Canseco Martínez, M en C. Salvador Morales López, el IT. Alberto López Vivas, el C. Caín González Sánchez, Fis. Lázaro Huerta Arcos y el Ing. Hermilo Zarco García, por su apoyo a lo largo del desarrollo del trabajo de investigación.

Al Dr. Jonatan Pérez y al Dr. Agileo Hernández por siempre haber sido solidarios conmigo y haberme orientado a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis compañeros del grupo PlasnaMat Lizeth, Osmary, Claudia, Karen, Dahinay, Pamela, Ana, Tania, Celia, Julio, al Dr. Fermín, Dr. Ernesto, Dr. Amin, Ricardo, Roberto, Juan Carlos, Alan, Agustín, Askur y Johans por ser buenos compañeros y mantener un ambiente de apoyo y solidaridad en el laboratorio.

Agradecimientos personales

Desde el fondo de mi corazón, tengo demasiado que agradecer a mis padres Carmen García y Gerardo Fonseca porque siempre me alentaron a seguir y no rendirme, me han apoyado siempre, me han dado cariño y consejos siempre que los he necesitado en cada etapa de mi vida, sin mencionar el apoyo económico que siempre me han dado, sin ellos no hubiera sido posible llegar hasta donde estoy.

A mis hermanas Xochitl y Citlali porque siempre me alentaron a seguir adelante.

A mi querido amigo y novio José Luis por tu amor y porque siempre me apoyaste a seguir y no rendirme.

A mis amigos que son muchos, pero a todos saben los guardo en mi corazón.

Desgraciadamente, muchas veces mediante palabras no se puede describir el profundo agradecimiento, sin embargo, no queda más que decir

¡**Gracias** por haber estado de alguna manera u otra a lo largo de este camino y ser un gran apoyo para continuar hasta llegar al final!

1 INTRODUCCIÓN

La ciencia e ingeniería de materiales es un campo interdisciplinario cuya encomienda es la de crear nuevos materiales y mejorar los ya conocidos. Esto lo hace mediante el desarrollo de un conocimiento profundo de las relaciones entre su estructura, síntesis y procesamiento.

En la ciencia e ingeniería de materiales se reconoce a un **biomaterial**, por la capacidad específica del material de estar en contacto con el cuerpo humano sin causar un daño inaceptable hacia los sistemas biológicos, ya sea a nivel celular o a nivel del sistema, a esta capacidad se le conoce como **biocompatibilidad** [1]. Un biomaterial es definido como un material sintético o natural que puede ser usado en aplicaciones médicas para aumentar, reparar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo que se ha perdido por un trauma, enfermedad o lesión [2]. Un biomaterial también puede ser empleado como un sistema de liberación controlada de fármacos.

La funcionalidad de un biomaterial puede determinarse a través de estudios *in vitro* y/o *in vivo*. Los estudios **in vitro** con un biomaterial se realizan a nivel celular, apoyados de ensayos de biología molecular. El tipo de células que se utilice en los ensayos dependerá de la aplicación del biomaterial. Por ejemplo, un biomaterial cuya aplicación va encaminada al remplazo o soporte óseo debe mostrar **osteconducción**, la cual es la capacidad de mantener o promover la diferenciación celular (osteoblastos) de las células que interactúan con el biomaterial.

En los estudios **in vivo** con un biomaterial a nivel sistema, es decir, orientados a aplicaciones específicas, también se puede hacer uso de ensayos de biología molecular. Por ejemplo, en reparación ósea se buscan dos cualidades en un biomaterial: **osteoinducción** y **osteointegración**, la primera nos indica la posibilidad del biomaterial de ayudar a la cicatrización del tejido óseo, mientras que la segunda propiedad nos habla de la posibilidad del biomaterial de fusionarse con el hueso.

El Ti y sus aleaciones son los biomateriales metálicos más utilizados en hueso, poseen propiedades mecánicas y densidad más similares al hueso en comparación con otras aleaciones metálicas, además, son altamente resistentes a la corrosión en los fluidos fisiológicos [3-6]. El Ti es utilizado en craneoplastia [7-9], como stent o endoprótesis vascular [10, 11], como vástago de prótesis de cadera [4], prótesis de cadera y tórax [12, 13], en prótesis de transfemoral o transtibial [14] y como implantes dentales [5, 15-18]. Siendo estos últimos los de mayor aplicación; la Asociación Americana Dental (no existen aún datos estadísticos para México) estimó que en el 2007 aproximadamente 300,000 pacientes recibieron un tratamiento para colocarles uno o varios implantes dentales [19]. Sin embargo, sólo el 89% de los implantes fueron exitosos, en una duración y funcionalidad en periodos de entre 10 y 15 años, posteriores a la fecha en que se colocaron.

Los factores que desencadenan el éxito o el fracaso de un implante dental son múltiples [20, 21] y varían desde el material, el diseño o incluso el método de colocación, pero, en el caso de los implantes dentales de Ti presentan osteointegración, este proceso *in vivo* es mediado por la capa de óxido de Ti que crece en el Ti tras ser implantado [22].

2. ANTECEDENTES

2.1 El titanio y sus aplicaciones biomédicas

El Ti es un metal noble, el cual comenzó a emplearse como dispositivo médico, quirúrgico y dental poco después de la segunda guerra mundial. Las buenas propiedades del Ti y de sus aleaciones tales como módulo elástico similar al del hueso, biocompatibilidad y mayor resistencia a la corrosión en comparación con otros metales como el acero inoxidable han hecho del Ti un material muy utilizado para aplicaciones biomédicas [23].

En el año 1959, Brånemark realizó estudios *in vivo* en un conejo al que le implantó una prótesis de Ti en hueso peroné, inicialmente Brånemark intentó ver la medula ósea del peroné con la ayuda de microscopía intravital, lo que encontró fue que la prótesis del Ti se había fijado al peroné del conejo [24]. Brånemark observó que la unión implante-hueso era muy fuerte, debido a que la superficie del Ti interacciona fuertemente con el hueso, a lo que consideró como una incorporación de la prótesis al hueso. Además, notó que al querer separar la prótesis del hueso se provocaba una fractura en el hueso [24, 25].

Al proceso que da lugar a la fuerte unión entre el Ti y el hueso, Brånemark la nombró “**osteointegración**” [24, 25]. Con las investigaciones de Brånemark se abrieron nuevas fronteras de conocimiento en torno del Ti y sus propiedades fisicoquímicas *in vivo* como *in vitro* [19-29].

Sin embargo, a pesar de la exitosa osteointegración del Ti, una de las debilidades observadas en este metal es la baja resistencia al desgaste en su superficie, por consiguiente, se han propuesto aleaciones fase- β y fase α - β como opciones para aplicaciones biomédicas.

Entre las aleaciones de fase α - β más utilizadas, se encuentra la aleación de Ti-6Al-4V que tiene un módulo elástico superior al Ti puro. Otras aleaciones fase- β utilizan como estabilizantes diferentes contenidos de metales de transición como el niobio, circonio, tantalio, níquel, molibdeno o rutenio como por ejemplo: Ti-15Mo, la Ti-13Nb-13Zr, la Ti-12Mo-6Zr-2Fe (TMZF), la Ti-15Mo, la Ti-16Nb-10Hf (Tiadyne

1610), la Ti-15Mo-5Zr-3Al, la Ti-35.3Nb-5.1Ta-7.1Zr (TNZT), y la Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) que son de las más utilizadas.

Recientemente, se han desarrollado otras aleaciones fase- β compuestas por elementos de bajo costo como son el Fe, el Cr, el Mn, el Sn y el Al (Ti-10Cr-Al, Ti-Mn, Ti-Mn-Fe, Ti-Mn-Al, Ti-Cr-Al Ti-Sn-Cr, Ti-Cr-Sn-Zr, Ti-(Cr, Mn)-Sn, y la Ti-12Cr) con el fin de reducir los altos costos de los metales de transición, pero estas aleaciones poseen módulos elásticos menores que el titanio puro [30-34].

El problema de las aleaciones de Ti es que, en comparación con el Ti puro, tienen una menor resistencia a la corrosión, además, los estabilizantes suelen ser elementos tóxicos, los cuales en caso de ser liberados *in vivo* debido a un proceso de corrosión pueden ocasionar daños severos a los tejidos circundantes. Por lo tanto, el Ti puro sigue siendo una mejor opción sobre sus aleaciones en lo que se refiere a la resistencia a la corrosión y estabilidad química.

Desde el punto de vista de la ciencia de materiales aún se desconoce de forma precisa cuáles son las propiedades fisicoquímicas del Ti que dan lugar al proceso de osteointegración en implantes óseos. Muchos de los estudios publicados sobre el Ti demuestran sus bondades en comparación con sus aleaciones, se han analizado diferentes topografías o diseños de los implantes, pero en pocas ocasiones se han realizado comparaciones con otros metales en los que se midan cuidadosamente las propiedades superficiales de cada uno de ellos [23, 31-34] y se correlacionen con la respuesta biológica.

Es un hecho indiscutible que clínicamente el Ti funciona y en gran parte esto es debido a la capacidad de su superficie de pasivarse, lo que le provee una alta resistencia a la corrosión en medios biológicos, muy superior a otros metales y/o aleaciones de uso médico que fallan justamente al evaluarse en medios biológicos, donde no solo hay presencia de cloruros y/o grupos OH, sino también otros iones y moléculas orgánicas complejas.

Sin embargo, otros metales de transición presentan propiedades similares de pasivación, entonces ***¿Por qué el Ti es mejor biomaterial que otros metales o aleaciones para aplicaciones óseas?*** Esta pregunta es la motivación de éste

trabajo de tesis, abordar desde el punto de vista de los materiales los procesos de interacción básica del metal con el medio que lo rodea y determinar la influencia de sus propiedades superficiales en dicha interacción.

Diferentes grupos de investigación han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* con Ti, con los cuales intentan comprender la causa de su osteointegración, estos estudios sugieren que la excelente biocompatibilidad del Ti es debido a sus óxidos [35].

En nuestro caso nos centramos en abordar a detalle la última hipótesis propuesta por el grupo de Brånemark. Dicha propuesta publicada en el año 2012 por *Jaafar Mouhyi et al.* [22], se basa en un análisis de los resultados obtenidos *in vivo*, en implantes extraídos de pacientes después de un tiempo de funcionamiento. La propuesta sugiere que la osteointegración del Ti es consecuencia de las propiedades de la capa de óxido de Ti nativa, la cual crece de forma acelerada *in vivo*, y al crecer desarrolla una estructura porosa que promueve la acumulación de iones que provienen del medio biológico, además, la capa de óxido aísla al Ti y con esto modula la respuesta inmunológica inherente a la implantación [22].

Jaafar Mouhyi et al. [22] observaron que el espesor de la capa de óxido de Ti crece en el implante dental bajo condiciones *in vivo* aumentando de 5 a 200 nm en los primeros 6 años de implantación. De forma similar, otros grupos han observado que el espesor de la capa de óxido de Ti se triplica en los 3 primeros meses posteriores a la colocación del implante *in vivo* [2, 22, 36, 37].

El crecimiento de la capa de óxido en el Ti durante los tres primeros meses después de su implantación está asociado a la respuesta del material ante **la reacción a cuerpo extraño o respuesta inflamatoria**, la cual es provocada por el tejido circundante al implante. Esta reacción consiste en la migración de granulocitos al sitio donde se colocó el implante, construyendo una primera defensa natural, en la que se genera un estrés oxidativo donde se producen altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) de entre las cual se encuentra en mayor abundancia el *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2); la finalidad de las ROS es eliminar al invasor [22].

Sin embargo, en el caso del Ti se ha propuesto que la presencia del H_2O_2 lejos de destruir el implante lo que provoca es el crecimiento de la capa de óxido, el cual es clave para la osteointegración del implante de Ti, ya que entonces es la capa de óxido de Ti la que interacciona directamente con el tejido óseo, y todo indica que sus propiedades de biocompatibilidad son superiores al Ti metálico [22].

2.2 Estado del arte del estudio de la respuesta inflamatoria del titanio como implante

La reacción a cuerpo extraño o respuesta inflamatoria conlleva la presencia de monocitos, macrófagos y células gigantes, las cuales generan un microambiente oxidante en el cual se encuentran las ROS, las cuales son el hidroxiperóxido (HOO^-), el hidroxilo (OH^-), el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que interactúan con el cuerpo extraño.

El efecto de las ROS depende de las propiedades del material implantado, en esta interacción ROS-biomaterial se puede generar pasivación o corrosión no controlada, esta última puede desembocar en la degradación del implante. Respecto al Ti y su interacción con las ROS lejos de generarse un proceso de corrosión sin control, lo que se logra es algo inigualable, pues la capa de óxido de titanio crece llevando al Ti a una mejor integración o unión biológica con el hueso circundante, es decir, su osteointegración.

De hecho, en la propuesta de *Jaafar Mouhyi et al.* consideraron casos clínicos, donde se planteó la falla de algunos implantes dentales de Ti como consecuencia de la reducción de la capa de óxido de Ti. Esta disminución de la capa del óxido produjo un problema en la interfase metal-tejido, lo cual afectó a la biocompatibilidad del implante, facilitando el crecimiento bacteriano. La formación de la biopelícula bacteriana ocasionó en los pacientes una afección conocida como peri-implantitis, donde se pierde hueso [22].

Para reparar los implantes donde se presentó peri-implantitis, estos se retiraron, se limpiaron y trataron con agentes como el H_2O_2 esto con la finalidad eliminar las bacterias y mejorar su arquitectura fisicoquímica superficial, lo cual involucra el

crecimiento de la capa de óxido, con este procedimiento en la mayoría de los casos se logró una reincorporación exitosa del mismo implante al tejido óseo [22].

A pesar de que esta hipótesis del crecimiento de la capa de óxido de Ti es relativamente nueva como una explicación para el éxito de los implantes de Ti, a finales de los 80'-90's se realizaron trabajos *in vitro* cuya finalidad era evaluar la respuesta del Ti a ambientes ricos en especies oxidantes, particularmente el peróxido de hidrógeno y que actualmente se reconoce como un ambiente que simula el microambiente biológico asociado a la respuesta inflamatoria o reacción a cuerpo extraño.

El primer trabajo sobre la respuesta del Ti *in vitro* a condiciones de respuesta inflamatoria simulada fue realizado por **Pentti Tengvall et al. en 1989** [36, 37], investigaron *in situ* el crecimiento de la capa pasiva analizando con un elipsómetro los cambios en el ángulo elipsométrico, Δ , cuando el metal (película de Ti de 200 nm de espesor) era expuesto a la solución salina amortiguada de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) con diferentes concentraciones de H_2O_2 , las cuales variaron de 1.0 mM a 0.33 M.

El cambio en el ángulo elipsométrico Δ en Ti causado por la presencia del H_2O_2 , fue considerado una medida indirecta de la velocidad de la oxidación en el Ti, esto significa crecimiento de la capa del óxido de Ti. Es decir, conforme se incrementó la concentración de H_2O_2 , mayor fue el cambio en el ángulo elipsométrico.

El crecimiento de la capa de óxido de Ti en un ambiente biológico desencadena una serie de eventos que parecen ser los que explican el éxito del Ti *in vivo*. Basados en esa teoría, **Pentti Tengvall et al. en 1989** [36, 37] propusieron un modelo de la interacción entre la capa de óxido nativo y el H_2O_2 . La figura 1 esquematiza dicho modelo mostrando que en la interacción se forma una matriz de $TiOOH$ hidratada, es decir $TiOOH(H_2O)_n$.

Los autores proponen que sería esta matriz difusa y porosa la que interacciona con el ambiente *in vivo*. Esta matriz posee buenas propiedades de intercambio iónico, que generan un excelente medio para que se fijen las proteínas y las células [36, 37]. En la figura 2 [37] se muestra esta matriz.

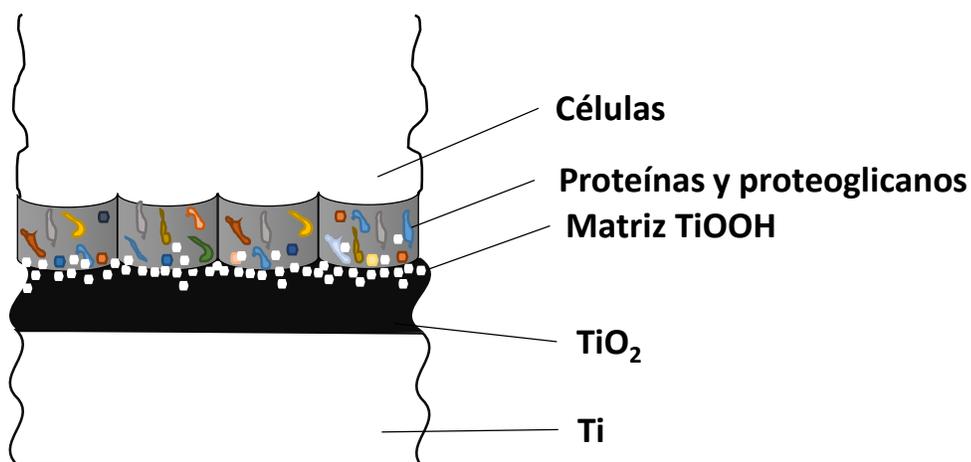


Figura 1. La capa de TiO_2 va cambiando gradualmente a una matriz $TiOOH$ que está hidratada con buen intercambio iónico con las proteínas. La matriz de $TiOOH$ puede ser formada por partículas que se encuentren lejos de la superficie del implante. Adaptada de [37].

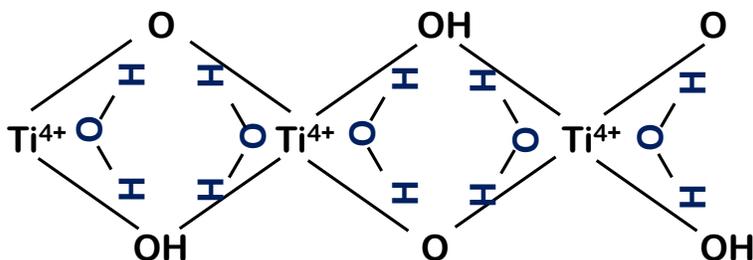


Figura 2. Formación de la matriz de $TiOOH(H_2O)_n$. Adaptada de [37].

En **1996 Pan et al.** [38], investigaron *in situ* el crecimiento de la capa de óxido de Ti en un ambiente de PBS y PBS con H_2O_2 a 100 mM, en este estudio utilizaron espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés). Además, monitorearon la degradación del H_2O_2 , debido a su contacto con Ti, observando que en las primeras 24 horas la concentración del H_2O_2 se reducía a un 40% dejando la concentración en 60 mM, sin mayor disminución durante las dos semanas siguientes.

El estudio de EIS de **Pan et al.** [38] lo realizaron durante 30 días, para el análisis de los resultados utilizaron un circuito equivalente que describió perfectamente el comportamiento electroquímico. Los resultados que obtuvieron mostraron que la presencia del H₂O₂ incrementa la velocidad de corrosión, liberando iones de Ti que son utilizados para la generación de la capa de óxido. Propusieron que dicha capa estaba formada por dos subcapas, una interna y otra externa, la capa interna era densa y la capa externa muy porosa, lo que permite la incorporación de iones de minerales, tal como el grupo fosfato que proviene de los fluidos fisiológicos. Cuando la capa externa alcanza un cierto espesor crítico se sella y eventualmente impide la liberación de iones de Ti, alcanzándose un valor máximo de disolución del Ti [38].

En **2001 Fonseca et al.** [39], realizaron un experimento ligeramente diferente. Con el fin de evitar el efecto de las reacciones electro-químicas del peróxido en los valores de corriente eléctrica y voltajes medidos, expusieron el Ti en un biofluido artificial (PBS) que contenía H₂O₂ en concentraciones de 50 y 100 mM, pero el H₂O₂ se retiraba después de 7 días de incubación, y se monitoreaba electroquímicamente (EIS) a las superficies de Ti inmersas en PBS por periodos de hasta 30 días. Los espectros de impedancia fueron analizados utilizando [39] un circuito equivalente con elementos diferentes al circuito anteriormente propuesto por **Pan et al.** [38]. Sin embargo, la interpretación es muy similar, ya que propusieron la existencia de una capa compuesta por una parte interna compacta y otra externa muy porosa. También observaron que la resistencia a la corrosión del Ti disminuía debido a la presencia del peróxido. Ellos sugirieron que la concentración de 100 mM de H₂O₂ era muy alta y la corrosión continuaba a lo largo de los días a pesar de haber retirado el H₂O₂, mientras que al trabajar con 50 mM, se observaba una estabilización del proceso de corrosión después de retirar el H₂O₂. Además, 50 mM de H₂O₂ es una concentración más similar a la generada fisiológicamente durante una respuesta inflamatoria [39].

En **2001, Jane O. Bearinger et al.** [40], investigaron *in situ* la modificación de la topografía del Ti debido a su interacción con PBS bajo condiciones de potencial a circuito abierto y de polarización catódica (-1 V), pero a tiempos largos de inmersión (18 horas). Observaron que la capa de óxido de Ti crecida en estas

condiciones era cristalina y crecía de manera epitaxial. Además, observaron que la capa de óxido tenía forma de domos hidratados. Sin embargo, cuando el Ti se secaba (2.5 horas de secado bajo condiciones atmosféricas), la topografía final del Ti era casi igual a la que presentaba antes de ser expuesto al PBS. Por otro lado, al aplicar un potencial por encima del potencial catódico (-1 V) [40] observaron que se formaron domos en las fronteras de grano, esto lo relacionaron con la hidratación de la capa de óxido de Ti nativa, pues sus propiedades eléctricas (la resistencia y resistencia de polarización habían disminuido, mientras que la capacitancia se había incrementado un orden de magnitud) eran típicas de una capa de óxido de Ti delgada [40].

En **2003 Jane O. Beringer et al.** [41], investigaron la modificación superficial del Ti y Ti-6Al-4V debido a su interacción con PBS y con PBS/30 mM de H₂O₂ por un tiempo de no más de 30 min, el tiempo fue suficiente para observar coalescencia de domos en ambos biomateriales. En condiciones de potencial anódico (+1 V) observaron un mayor crecimiento de domos de óxido, pero al aplicar un potencial catódico (0 V), no se observó la reducción de dichos domos. Por lo que consideraron que la capa de óxido en Ti continuaba hidratada, lo cual validaron con estudios de capacitancia. Otro resultado que obtuvieron fue que las muestras expuestas a PBS/30 mM H₂O₂ presentaban una mayor capacitancia que las expuestas solo a PBS. El incremento de la capacitancia lo asociaron con la forma de la capa, la cual consideraron como porosa y formada por OH-Ti en lugar de un óxido de Ti estequiométrico, lo cual explicaba porque dicha capa no era capaz de proporcionar pasividad a la superficie en esos cortos tiempos de exposición, esta pasividad se logra hasta que otras biocapas se depositarán [41].

Finalmente, en el año de **2014, Emily Brooks et al.** [42], investigaron la influencia de la respuesta inflamatoria simulada y de la polarización catódica en las propiedades electroquímicas del Ti y de la aleación de Ti-6Al-4V. y durante el proceso de tribocorrosión que sufre una prótesis de cadera. La respuesta inflamatoria simulada que ellos utilizaron fue una solución de PBS/150 mM de H₂O₂ con pH de 5.0.

Se hicieron tres grupos de estudio, cada grupo fue integrado por el cpTi y la aleación Ti6Al4V.

- Grupo 1 se incubó durante 24 horas en PBS.
- Grupo 2 se incubó en la solución inflamatoria simulada durante 24 horas.
- Grupo 3 se incubó en la solución inflamatoria simulada durante 24 horas y se le aplicó un potencial de -1 V en la incubación

Después del tiempo de incubación se realizaron estudios de polarización potenciodinámica y EIS con la finalidad de evaluar la corrosión en los tres grupos.

En el grupo 1, no hubo cambios importantes en la superficies del cpTi y de Ti-6Al-4V, por lo que los metales se pasivaron fácilmente.

En el grupo 2 se observó una disminución en la resistencia en la corrosión, así como, la liberación de iones metálicos en ambos biomateriales cpTi y Ti-6Al-4V.

En el grupo 3 fue donde observaron la mayor disminución en la resistencia a la corrosión, así como la mayor liberación de los iones metálicos. Este resultado, llevó a **Emily Brooks et al.** [42] a considerar a la aleación de Ti-6Al-4V una mala opción para su aplicación en implantes de cadera, ya que el vanadio es altamente tóxico.

En resumen, vemos que todos los estudios realizados sobre el Ti que intentan comprender su comportamiento en condiciones de respuesta inflamatoria simulada utilizan soluciones de H₂O₂. Sin embargo, en estos trabajos se ha intentado analizar la superficie durante el proceso mismo de modificación, lo que dificulta la información que puede obtenerse. Además es importante mencionar que no se compara la respuesta del Ti con materiales diferentes o con una superficie de óxido de titanio estequiométrico.

Es por esta razón, que en el presente trabajo de tesis, se propuso medir de forma más general las modificaciones superficiales generadas en el Ti después de interactuar con H₂O₂ (concentración que simula la respuesta inflamatoria), para lo cual se expone por tiempos prolongados y se analiza posteriormente en condiciones ambientales. Con esta propuesta de trabajo de investigación, se plantearon las siguientes preguntas:

1. ¿Las modificaciones que puede tener el Ti son exclusivas de este metal?
2. ¿Qué pasa en superficies donde ya hay una capa de óxido de titanio presente?

Para responder estas preguntas se compararán las respuestas del Ti puro con acero inoxidable de grado médico y películas de óxido de titanio (TiO_2), buscando evaluar la siguiente hipótesis.

3. HIPÓTESIS

Cuando el Ti es expuesto a un ambiente rico en H_2O_2 , el cual simula la respuesta inflamatoria, su capa de óxido crece en espesor confiriéndole propiedades superficiales específicas las cuales lo convierten en un excelente biomaterial a diferencia del acero inoxidable y más similar a las películas de TiO_2 .

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar y evaluar las modificaciones físico-químicas superficiales ocasionadas en el Ti como consecuencia de su interacción con soluciones ricas en H_2O_2 , las cuales simulan la respuesta inflamatoria del cuerpo humano, comparando su respuesta con el acero inoxidable 316L, así como con películas de óxido de titanio amorfas y cristalinas crecidas mediante un método de depósito físico. Además, valorar como dichos cambios superficiales afectan la funcionalidad de los materiales en aplicaciones médicas orientadas a la sustitución de hueso.

4.1 Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se plantearon se relacionan con las propiedades físico-químicas a determinarse.

1. Evaluar los cambios en la composición química de la superficie de los materiales de estudio como consecuencia de su interacción con soluciones ricas en H_2O_2 , las cuales simulan la respuesta inflamatoria del cuerpo humano.
2. Determinar los cambios en la topografía y rugosidad de los materiales de estudio como consecuencia de su interacción con soluciones ricas en H_2O_2 .

3. Medir el cambio en la mojabilidad y la energía superficial provocados por la interacción de las muestras con el H_2O_2 .
4. Determinar el cambio de la carga superficial de los materiales debido a su interacción con el ambiente rico en H_2O_2 .
5. Evaluar el comportamiento electroquímico de las muestras antes y después de su tratamiento con H_2O_2 .
6. Valorar la funcionalidad de los materiales como biomateriales antes y después de la exposición a la solución rica en H_2O_2 .

5. MATERIALES Y METODOS

En este trabajo de investigación, se evaluó el efecto de la inmersión en soluciones ricas en H₂O₂ sobre las propiedades superficiales de titanio puro, cpTi; acero inoxidable 316L (SS, siglas en inglés); películas de óxido de titanio cristalinas, cTiO₂ y películas de óxido de titanio amorfas, aTiO₂.

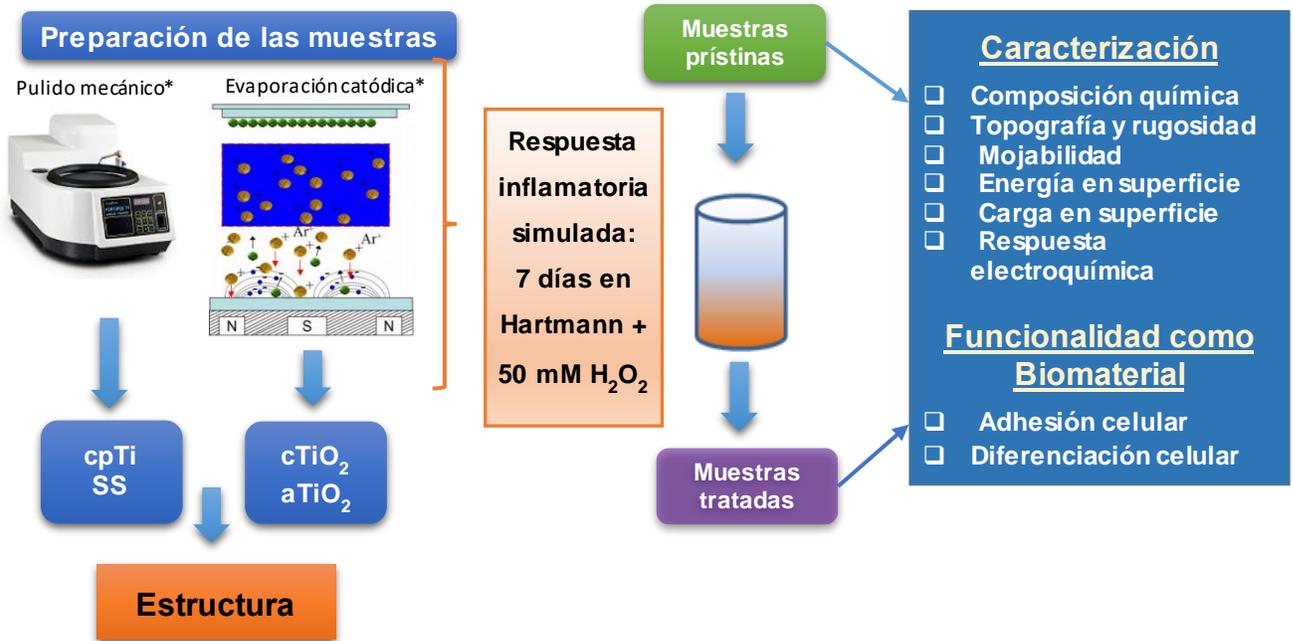


Figura 3. Metodología utilizada en el desarrollo de este trabajo de investigación. Adaptados de*[43, 44].

En la figura 3, se muestra la distribución del trabajo, el cual inició con la preparación de los materiales; pulido de los metales y depósito de las películas de óxido de Ti. Posteriormente, se realizó la caracterización estructural y de las propiedades de superficie. La caracterización de las propiedades de superficie se realizó antes y después de su inmersión en la solución Hartmann/50 mM H₂O₂ por siete días, la cual simula a la respuesta inflamatoria.

La caracterización físico-química incluyó mediciones de composición química mediante espectroscopia de fotoelectrónica de rayos X (XPS, siglas en inglés), topografía mediante microscopia de fuerza atómica (AFM, siglas en inglés), rugosidad mediante AFM y perfilometría, mojabilidad mediante ángulo de contacto, energía de superficie por ángulo de contacto utilizando el modelo de Van Oss Chaudhury Good (VCG), carga en superficie determinando el punto de carga cero

(pzc) y la respuesta electroquímica utilizando potencial a circuito abierto (OCP, siglas en inglés), espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, siglas en inglés) y polarización potenciodinámica (PP). Finalmente, se realizaron los ensayos de adhesión y diferenciación celular, utilizando osteoblastos en ambos ensayos, esto con la finalidad de conocer la funcionalidad de los materiales antes y después de su interacción con solución de Hartmann/50 mM H₂O₂.

5.1 MATERIALES

Los materiales de estudio utilizados en este trabajo de investigación se enlistan a continuación

1. Discos de titanio comercialmente puros o grado 2 (cpTi, siglas en inglés) de la marca Straumann® (15 ϕ mm x 2 mm)
2. Acero Inoxidable 316L (SS) (13.5 ϕ mm x 1.2 mm)
3. Películas delgadas de óxido de titanio cristalino (cTiO₂) crecidas sobre cpTi (15 ϕ mm x 2 mm).
4. Películas delgadas de óxido de titanio amorfas (aTiO₂) crecidas sobre cpTi (15 ϕ mm x 2 mm).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Preparación de las muestras

Los discos de Ti fueron pulidos hasta acabado espejo, se utilizaron consecutivamente las siguientes lijas de carburo de silicio del número 80, 120, 220, 360, 600, 1000, 1500, 2000. Para el acabado espejo se utilizaron dos tamaños de alúmina en suspensión 1 y 0.3 micras, sobre un paño. La pulidora utilizada fue una UNIPOL-810 MTI. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y sonicadas con la finalidad de remover los residuos del pulido mecánico, para lo cual, las muestras se colocaron en un baño de ultrasonido, utilizando tres diferentes disolventes en tiempos específicos como fue acetona por 10 min, 20 min en isopropanol y 20 min en agua destilada. Finalmente, las muestras fueron secadas con nitrógeno.

5.2.2 Crecimiento de las películas de óxido de titanio cristalina y amorfa mediante evaporación catódica en radiofrecuencia

La técnica de **evaporación o pulverización catódica** comúnmente conocida como *magnetron sputtering* (nombre proveniente del inglés) es una técnica física utilizada para el desarrollo de recubrimientos.

El proceso de evaporización catódico se basa en el bombardeo de iones energéticos procedentes de un plasma que inciden sobre un blanco (o cátodo). El plasma se genera debido a una descarga eléctrica que se produce entre el cátodo (blanco) y ánodo (cámara de depósito y sustrato).

El proceso de bombardeo provoca la remoción de átomos del blanco, los cuales pueden ser condensados en un sustrato para así formar una película delgada [45, 46].

Este proceso se lleva a cabo dentro de una cámara, la cual está bajo condiciones específicas de presión (vacío), con flujo de un gas inerte; de ser necesario se inyecta a la cámara un gas reactivo como puede ser oxígeno, nitrógeno o metano. En la figura 4 se observa el sistema de evaporación catódica.

Para la preparación de las películas delgadas de $c\text{TiO}_2$ y $a\text{TiO}_2$ se utilizaron discos de $cp\text{Ti}$ pulidos con acabado espejo; el sistema utilizado fue el de evaporación catódica balanceado con radiofrecuencia (RF) en cámara con alto vacío. Se utilizó un blanco de titanio de alta pureza (99.998%) de 10 cm de diámetro.

Para obtener las películas cristalinas ($c\text{TiO}_2$), fue necesario aplicar un calentamiento al sustrato justo antes de realizar el depósito, la temperatura de calentamiento fue de 250 °C por un periodo de 30 minutos, esto dentro de la cámara de depósito, la presión en la cámara fue de 1×10^{-6} Torr, lo que corresponde a un vacío medio.

El depósito de las películas de $c\text{TiO}_2$ se realizó empleando una potencia de 200 W con una atmosfera reactiva de argón y oxígeno, con flujo de 8 y 3 cm^3/min , respectivamente. El tiempo de depósito fue de 45 min, con este tiempo se alcanza un espesor en la película de $c\text{TiO}_2$ de 62 ± 12 nm, el espesor fue determinado mediante perfilometría de contacto.

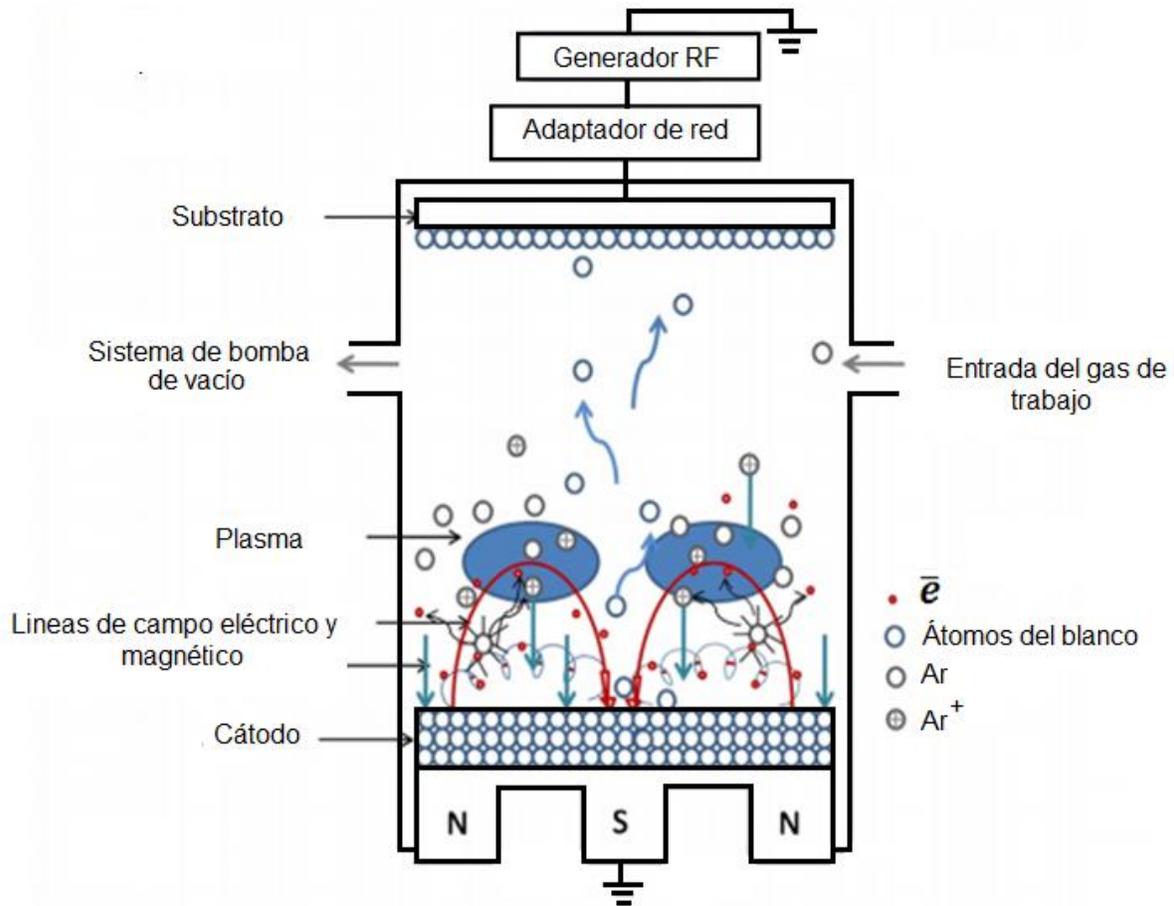


Figura 4. Diagrama típico de un sistema de evaporación catódica con RF. Adaptada de [46].

Para los depósitos de óxido de titanio amorfo ($a\text{TiO}_2$) se utilizaron las mismas condiciones empleadas en el depósito de las películas de $c\text{TiO}_2$, únicamente no se aplica el calentamiento previo al depósito y el tiempo de depósito fue de 30 min, con el cual se alcanzó un espesor de 67 ± 4 nm, fue de igual manera determinado mediante perfilometría de contacto.

5.2.2.1 Determinación de la estructura mediante difracción de rayos X

La difracción de Rayos X es una herramienta poderosa para investigar el arreglo ordenado a largo alcance de los átomos o moléculas de los materiales, entre ellos las películas delgadas. Esta técnica se fundamenta en la Ley de Bragg, brevemente las ondas incidentes (cuya longitud de onda oscila entre 10 nm y 10 picómetros) en un cristal se reflejan especularmente en los planos atómicos paralelos dentro de este material. Cada plano refleja sólo una fracción muy pequeña de las ondas incidentes, cómo se indica en la figura 5.

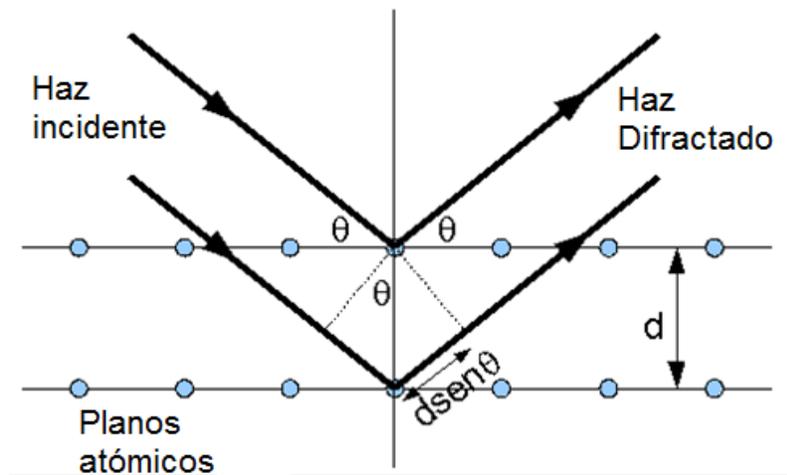


Figura 5. Descripción de W.L Bragg para la difracción de haces de rayos X en un cristal. Adaptada de [47].

De acuerdo a la figura 5, si consideramos los planos paralelos de la red a una distancia d entre sí, la diferencia de trayectorias correspondientes a las ondas reflejadas en planos adyacentes es $2d \sin \theta$, calculando θ a partir del plano. Se produce una interferencia constructiva de la radiación procedente de planos sucesivos cuando la diferencia de trayectoria es un número entero n de la longitud de onda λ , de modo que obtiene la ley de Bragg, como se describe en la ecuación 1

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad 1$$

La reflexión de Bragg puede producirse únicamente para longitudes de $\lambda \leq 2d$. Aunque la reflexión en cada plano es especular, sólo para ciertos valores de θ las reflexiones procedentes de todos los planos paralelos se suman en fase para dar un haz reflejado intenso. Finalmente, algo importante sobre la ley de Bragg es que es una consecuencia de la periodicidad de la red. Por lo tanto, la difracción de rayos X lleva a la determinación de la estructura cristalina de un material [48].

La instrumentación requerida para medir la difracción de rayos X en materiales, la cual nos lleva a la identificación de la estructura cristalina del material, es un difractómetro de rayos X o un sincrotrón.

Para la determinación de la estructura cristalina de cpTi, SS, cTiO₂ y aTiO₂ se utilizó un difractómetro de rayos X de la marca Rigaku, modelo ULTIMA IV en módulo de

películas delgadas, la medición se realizó en la técnica de haz rasante a 1°, con un paso de 0.5°/min, con lámpara de cobre (CuK α = 1.5418 Å).

5.2.3 Reacción a cuerpo extraño o respuesta inflamatoria

Cuando un implante es colocado *in vivo*, se pueden predecir una cascada de procesos celulares, los cuales son ocasionados por la herida generada para la colocación del implante, y la interacción de la sangre con el biomaterial; esto incluye la formación de una matriz inicial provisional, la inflamación aguda e inmediata que podría disminuir con el tiempo o prevalecer como una inflamación crónica, la formación de tejidos de granulación y la formación de un tejido fibroso que encapsula al implante [49].

La respuesta inflamatoria aguda causada por implantación de un biomaterial ocurre a corto tiempo, dura alrededor de una semana, pero, depende de la extensión del daño en el tejido. La respuesta inflamatoria es inducida en la cercanía del biomaterial por leucocitos y células polimorfonucleares y por la adhesión de fagocitos (monocitos/macrófagos) en la superficie del implante [49].

Cuando estas células están adheridas al implante o en su cercanía, activan sus procesos para combatir a los agentes extraños y dentro de sus actividades esta degradarlos y metabolizarlos, esto genera una gran actividad de liberación de productos, donde muchos de ellos generan especies reactivas de oxígeno como superóxidos (O_2^-). Posteriormente el anión radical de superóxido O_2^- espontáneamente dismuta a O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de forma bastante rápida ($\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a pH 7) pero cuando es catalizado por la enzima superóxido dismutasa (DSO) lo hace de forma mucho más rápida y eficiente, ecuación 2 [37, 50].



De acuerdo a la ecuación 2, en la respuesta inflamatoria se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) como son O_2^- , H_2O_2 y grupos hidroxilo (OH^-).

Las ROS son altamente reactivas, incluso pueden ser tóxicas para las células, pero tienen una función muy importante la cual consiste en atacar al agente extraño, es decir el biomaterial [22, 37, 50].

5.2.3.1 Respuesta inflamatoria simulada

El ensayo para simular la respuesta inflamatoria consistió en la inmersión de las muestras por siete días en una solución conformada por solución Hartmann y 50 mM de H₂O₂.

La solución de Hartmann representó el medio biológico y se utilizó porque está estandarizada: contiene concentraciones similares de iones con respecto a los presentes en la sangre humana.

En la tabla 1, se muestran los componentes de la solución de Hartmann comparándolos con los presentes en suero humano [51].

Ion	Concentración Ion (mmol/L)	
	Suero Humano	Solución de Hartmann
[Na ⁺]	135-145	131
[K ⁺]	3.5-5.3	5
[Ca ²⁺]	2.2-2.6	2
[Cl ⁻]	95-105	111
[HCO ₃ ⁻]	24-32	29*
Total Cationes	145-158	138
Total aniones	130-142→	138
Radio [Na ⁺] / [Cl ⁻]	1.28:1-1.45:1	1.18:1
Ph	7.35-7.45	6
*Lactato de sodio C ₃ H ₅ O ₃ .Na		
→Aniones de albumina		

Tabla 1. Componentes de la solución de Hartmann. Adaptada de [51].

La solución de Hartmann fue llevada a un pH ácido de 5.2 por la adición de HCl 1M. Esto con la finalidad de acidificar el ambiente para simular lo que ocurre durante una reacción inflamatoria *in vivo* donde se han reportado pH ácidos. Para simular la presencia de las ROS, se adicionaron 50 mM de H₂O₂. Esta concentración

se seleccionó porque es cercana a las utilizadas por otros autores que van desde 0.01 mM hasta 150 mM [37-42, 52].

Además esta concentración es ligeramente superior a la propuesta por **Tengvall et al.**, los cuales en 1989 supusieron que en la superficie del implante se adhieren 1×10^6 células (macrófagos)/ cm^3 , los cuales generan 1 nmol/min de H_2O_2 , entonces en un tiempo transcurrido de 24 horas, se obtiene una concentración de $20 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{cm}^3$ el cual es equivalente a 20 mM H_2O_2 [37, 50].

El volumen de solución utilizado por muestra se determinó con base en la ecuación propuesta por **Kokubo et al.**, esta ecuación calcula el volumen necesario para cubrir una muestra y con la cual es posible mostrar bioactividad en la misma, ecuación 3 [53]:

$$V_s = S_a/10 \quad 3$$

Donde:

V_s es el volumen de solución precursora de apatitas en ml.

S_a es el área superficial aparente del espécimen en mm^2 , en materiales porosos V_s debe ser mayor al V_s calculado.

Las muestras se colocaron en la solución de respuesta inflamatoria simulada bajo condiciones de oscuridad y dentro de una estufa de incubación con agitación elíptica. La temperatura de incubación fue de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con una agitación elíptica de 30 rpm y durante 7 días. Se hizo por triplicado el tratamiento en cada material de estudio.

La solución de respuesta inflamatoria fue reemplazada cada 24 horas por una solución recién preparada, esto con la finalidad de garantizar la presencia de H_2O_2 en concentraciones casi constantes durante los 7 días. **Pan et al.** [38] habían demostrado que después de 24 horas de interacción de una superficie de Ti con una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS, siglas en inglés) + 100 mM de H_2O_2 , la concentración de H_2O_2 se reduce un 40%.

Finalmente, las muestras fueron retiradas de la solución de respuesta inflamatoria simulada, se lavaron con mucho cuidado con agua desionizada y se secaron con

nitrógeno. Las muestras fueron guardadas en cajas de plástico a condiciones normales, posteriormente se realizó su caracterización y se utilizaron en los ensayos biológicos.

5.2.4 Caracterización de los materiales prístinos y tratados con la respuesta inflamatoria simulada

Las técnicas de caracterización utilizadas para determinar los cambios superficiales inducidos debido a la inmersión en la solución de respuesta inflamatoria simulada fueron las siguientes.

5.2.4.1 Cuantificación de la composición química mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

Esta técnica espectroscópica de superficie es analítica, muy útil para la obtención de la composición elemental de superficie en un material. La emisión de fotoelectrones se puede imaginar como un proceso de tres etapas:

1. Los rayos X interactúan con los electrones de los átomos que conforman la superficie del material, transmitiendo suficiente energía a estos para ser expulsados generando los llamados fotoelectrones (y los electrones Auger).
2. Algunos de estos electrones al viajar a través del sólido hacia la superficie sufren procesos de dispersión y son emitidos sin ninguna energía característica dando lugar al fondo de emisión del espectro.
3. Los electrones que alcanzan la superficie sin sufrir pérdidas de energía son emitidos al vacío (después de superar la función de trabajo) con una energía cinética característica que permite identificar el elemento del cual proviene.

La energía cinética de los fotoelectrones emitidos se deriva de la diferencia entre la energía de los rayos-X incidentes, menos la energía de enlace del electrón en los niveles de energía de los sólidos y la función de trabajo, como se describe en la figura 6.

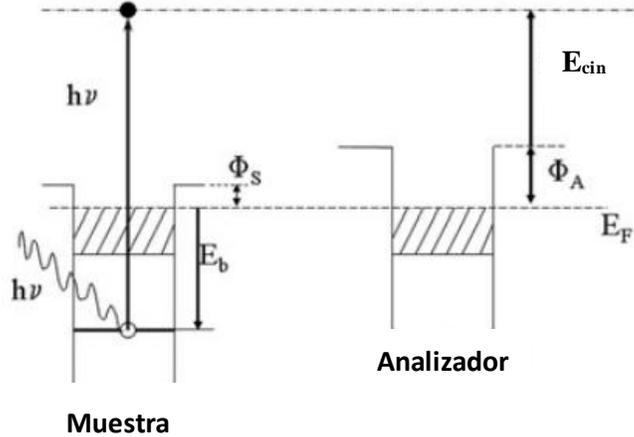


Figura 6. Descripción esquemática de los términos de energía relevantes en XPS de superficies sólidas. Rayos X con energía, $h\nu$, generan una vacante en un nivel interno atómico de electrones con energía de enlace, E_b , los fotoelectrones emitidos tienen que superar la función de trabajo de la muestra, Φ_s , la energía es medida por el analizador con referencia a la energía de Fermi, E_F que es la energía emitida disminuida por la diferencia entre la función trabajo del analizador Φ_A y Φ_s . Adaptada de [54].

Los rayos X incidentes con una energía característica $h\nu$ transfieren esta energía al electrón ligado con una energía de enlace, E_b (con referencia al nivel de Fermi, E_F), entonces, la energía cinética del electrón emitido está dada por $E_b = h\nu - E_{cin} - \Phi_s$, donde Φ_s es la función trabajo de la muestra. Con Φ_A la función trabajo del analizador de acuerdo a la figura 6, la energía cinética E_{cin} medida por un analizador está dada por: $E_{cin} = h\nu - E_b - \Phi_s - (\Phi_A - \Phi_s) = h\nu - E_{kin} - \Phi_A$, de modo que la energía de enlace es [54].

$$E_b = h\nu - E_{cin} - \Phi_A \quad 4$$

La ecuación 4 es fundamental para cuantificar XPS, debido a que la función trabajo de la muestra analizada se cancela y la función de trabajo del analizador es constante, la energía cinética determina la energía de enlace y vice versa.

Usualmente, la función trabajo del analizador está entre 4 y 5 eV y se determina empíricamente mediante una escala energética de cero a la frontera con el nivel de Fermi de una muestra de referencia, por ejemplo Ag o Ni. Como se indica en la ecuación 4 es únicamente válida para muestras conductoras [54].

La caracterización química de las superficies de cpTi, SS, película de cTiO₂ y película aTiO₂, tanto prístinas como tratadas, se realizó en un espectrómetro de fotoelectrones de rayos X de la marca Thermo scientific modelo K-Alpha. Previo a la medición se realizó una limpieza con un haz de argón.

El espectrómetro fue operado con una presión de 8×10^{-7} Pa, se utilizó una radiación de Aluminio K α , ($h\nu = 1486.6$ eV) con una resolución espacial de 500 μm , 200 y 25 eV como paso de energía para la adquisición de espectros de baja y alta resolución, respectivamente.

5.2.4.2 Evaluación de morfología, topografía y rugosidad mediante técnicas microscópicas y perfilometría

La microscopia electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés) es una técnica de microscopia con la cual es posible ver la morfología y la superficie de un material que dependiendo de la sensibilidad del equipo, puede ser desde micrómetros hasta nanómetros.

El principio del funcionamiento de SEM se basa en un haz de electrones acelerados procedentes de un filamento, el haz es focalizado mediante una serie de lentes electromagnéticas hacia una muestra. Debido a la interacción que sufren estos electrones con la muestra se generan una serie de señales que se recogen y amplifican para obtener información de esta tanto de la morfología como de la composición química de la muestra.

Las señales que se generan en el material de análisis dependen del tipo de interacción que tienen lugar entre los electrones incidentes y el material, se distingue la energía elástica de la energía inelástica de acuerdo a la cantidad de energía que el electrón incidente transfiere al átomo [55].

La técnica de SEM puede complementarse con la microscopia de fuerza atómica (AFM, siglas en inglés).

La técnica de AFM es otra técnica de microscopia que nos permite visualizar la topografía de un material de manera muy precisa. Por lo tanto, se puede obtener información sobre la rugosidad de superficies.

En la técnica de AFM, la punta de sondeo, la cual realiza la inspección en forma de mapeo está ligada a un base voladiza conocida como *cantiléver*. En respuesta a la fuerza entre la punta de sondeo y *el cantiléver*, se forma una palanca, que se conoce como desviación o deflexión [56, 57].

Las imágenes se toman mediante la inspección de la muestra con relación a la punta de sondeo que mapea y la digitalización de la dirección de la palanca o el movimiento en dirección del piezoeléctrico (base donde se coloca la muestra) como una función de la posición lateral x , y .

Las constantes típicas del *cantiléver* (k) están entre 0.001 y 100 N/m y el movimiento va desde micrómetros hasta $\approx 0.1 \text{ \AA}$, los cuales se miden por el sensor de deflexión [56, 57].

Típicamente, las fuerzas entre la punta y la muestra van de 10^{-11} hasta 10^{-6} N. Para comparación, la interacción entre dos átomos unidos covalentemente es del orden de 10^{-9} N a una separación cercana a los 10 \AA . Por lo tanto, la formación de imágenes sin dañar la muestra es posible debido a las fuerzas utilizadas al momento del mapeo.

Hay dos tipos de regímenes que son utilizados para realizar los mapeos:

1. Modo contacto
2. Modo no contacto.

Cuando el microscopio es operado en modo de no contacto la punta tiene una separación de la muestra de 10 a 100 nm de distancia, las fuerzas como las de Van de Waals, electrostáticas, fuerzas magnéticas o capilares, se pueden detectar y dar información sobre la topografía superficial, distribución de cargas, la estructura de las paredes de dominio magnético o distribución de películas líquido [56, 57].

A separaciones más pequeñas, del orden de \AA , la punta de sondeo está en contacto con la muestra. En este modo, las fuerzas de repulsión iónicas permiten que la topografía de la superficie sea rastreada con alta resolución. Bajo condiciones óptimas se logra una resolución atómica. Además, las fuerzas de fricción y

deformaciones elásticas o plásticas se pueden detectar en condiciones apropiadas [56, 57].

La perfilometría es una técnica sencilla y muy sensible para el análisis de la topografía con la cual se puede determinar el espesor de una película. El perfilómetro tiene una punta que puede ser móvil o fija, la cual se va desplazando con una fuerza constante con la que va recorriendo la superficie de la muestra. La detección de los desplazamientos verticales que sufre la punta en su recorrido a lo largo de la superficie de la muestra permite determinar su perfil.

La perfilometría es utilizada para determinar la topografía y rugosidad de una muestra sólida. Al igual que en AFM, en perfilometría se utilizan dos modos; en contacto y en no contacto (óptico). Generalmente, la perfilometría de contacto es similar al modo contacto de AFM, excepto que el intervalo de medición es más amplio y la resolución es menor. La perfilometría de contacto es una técnica directa ya que no requiere de modelado.

En un perfilómetro de contacto la punta es estática, mientras el portamuestras se mueve vertical o lateralmente bajo la punta haciendo contacto con ella. La punta está acoplada mecánicamente a un centro LVDT (Siglas en inglés, transformador diferencial lineal variable) el cual digitaliza las señales eléctricas (interacción punta-muestra) a formato digital que provienen de la punta con los cuales se obtiene un perfil de la superficie de la muestra [58].

La punta en perfilometría de contacto puede medir hasta 20 nm y la resolución lateral es mucho mejor que la de la perfilometría de no contacto como la óptica de luz blanca (la resolución de la perfilometría óptica es determinada por la longitud de onda óptica).

La perfilometría de contacto es ampliamente usada para estudios en biomateriales pues determina la rugosidad de la muestra a escalas comparables con las dimensiones celulares [59].

Para evaluar la morfología de las muestras prístinas y tratadas del cpTi, el SS, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂, se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo modelo FE-SEM JEOL 7600.

Para el estudio de la topografía y rugosidad se utilizó un microscopio de fuerza atómica, modelo Jeol JSPM-5200, en modo intermitente o no contacto. El programa utilizado durante la obtención de las imágenes fue WINSPM SYSTEM, para el análisis y procesamiento de las imágenes se utilizó el programa AFM Image Analysis de SPIP, las imágenes adquiridas fueron de un área de 5x5 μm . Este estudio se hizo por triplicado con muestras diferentes, en muestras tanto prístinas como muestras tratadas con H_2O_2 que simuló la respuesta inflamatoria simulada.

Además, la rugosidad también se midió por perfilometría de contacto con el perfilómetro modelo DEKTAK II, se realizaron mapeos lineales de 250 μm . Se utilizaron 3 muestras por cada material, tanto muestras prístinas como muestras tratadas, además en cada muestra se realizaron dos mapeos, es decir se obtuvieron 6 datos por tipo de muestra.

5.2.4.3 Determinación de la mojabilidad de los materiales

La energía libre superficial desde un concepto básico es el exceso de energía presente en la superficie de un material [60] como consecuencia de que los átomos de superficie no tienen todos sus enlaces saturados. También puede considerarse que dicha energía corresponde al trabajo por unidad de área realizado para crear dicha superficie, de modo que sus unidades están dadas en términos de fuerza por unidad de área (mJ/m^2) [61]. La energía superficial es determinante para comprender la interacción de un material con su medio ambiente, incluyendo interacciones entre diferentes fases; sólido, líquido o vapor [60]. La energía libre superficial de un sólido y la tensión superficial de un líquido son equivalentes [61].

Uno de los métodos más comunes para la medición de la energía de superficie considera justamente la interacción de equilibrio que se obtiene entre sólido-líquido-vapor al colocar una gota de líquido sobre la superficie de un sólido. Esta técnica es conocida como medición del ángulo de contacto y la ecuación básica del equilibrio termodinámico entre las tres fases fue propuesta por Young Thomas en 1805, en la ecuación 5 se muestra esta relación. [62, 63]:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_S - \gamma_{LS}}{\gamma_L} \quad 5$$

Donde γ_S y γ_L son las energías libres del sólido y la tensión superficial del líquido, respectivamente; γ_{SL} es la tensión interfacial y θ es el ángulo de contacto formado por una gota sésil en la superficie sólida, la cual se forma una vez alcanzado el equilibrio mecánico de esta gota bajo la acción de las tres energías libres superficiales [64].

En la figura 7 se muestra el esquema del ángulo de contacto y las energías en la línea de contacto [65].

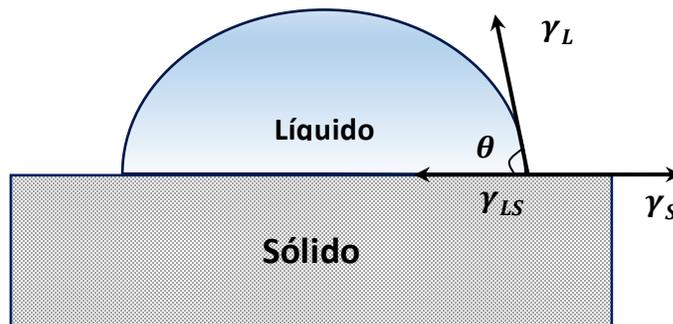


Figura 7. Esquema del ángulo de contacto entre una gota sésil y una superficie, y de las energías libres que actúan en la línea de contacto entre sólido-vapor, líquido-vapor y sólido-líquido. Adaptada de [65].

En una aproximación comúnmente utilizada basada en la propuesta de Dupré, la tensión interfacial puede expresarse en términos del trabajo de adhesión (W_a) o trabajo requerido para separar la gota del sólido, ecuación 6:

$$\gamma_{LS} = \gamma_S + \gamma_L - W_a \quad 6$$

De modo que sustituyendo (6) en (5), se obtiene la expresión de Young-Dupré, ecuación 7:

$$W_a = \gamma_L (1 + \cos\theta) \quad 7$$

A su vez, el ángulo de contacto es indicativo de un fenómeno conocido como humectación de la superficie o **mojabilidad** [64], ya que los materiales pueden clasificarse como hidrofílicos (mojables) o hidrofóbicos (no-mojables) de acuerdo al intervalo de valores en que se encuentre el ángulo de contacto.

Una superficie es hidrofóbica cuando muestra ángulos de contacto en el intervalo de ángulos mayores de 90°[66, 67] llegando hasta los 150°, pues a ángulo

mayores de 150° se considera una superficie superhidrofóbica [68, 69], para superficies hidrofílicas se considera el intervalo de ángulos menores a 90° [67], mientras que una superficie superhidrofílica tendrá ángulos de contacto menores a 5° [69]

De manera más general, la mojabilidad es la habilidad de un solvente de propagarse sobre un sólido, esta propiedad es muy importante para los biomateriales que están interactuando con fluidos fisiológicos. La magnitud de la propagación de la gota en la superficie es indicativo de la energía libre superficial, debido a que se requiere que la energía libre superficial del sólido sea mayor a la energía libre superficial del agua para que la gota se propague en el sólido logrando una mayor interacción superficial [64].

Para biomateriales, donde las interacciones superficie-medio ocurren en soluciones ricas en biomoléculas, **Vogler y Berg** han propuesto que el límite entre hidrofílicidad/hidrofobicidad debe definirse a partir de los 65° [70-72].

Para determinar la mojabilidad en los materiales de estudio, se midió el ángulo de contacto formado por una gota sésil de agua desionizada sobre la superficie del cpTi, el SS, la película αTiO_2 y la película βTiO_2 en condición prístina y tratada con H_2O_2 . Este ensayo se realizó dentro de una cámara a 37°C , con la finalidad de simular la temperatura fisiológica. Se utilizaron 3 muestras por material, en cada muestra se midieron dos gotas sésiles, por lo tanto se obtuvieron 6 mediciones por material, esto con la finalidad de poder realizar un análisis estadístico adecuado.

Para realizar la medición del ángulo de contacto, se utilizó un goniómetro modelo Ramé-Hart Inc. Además, previo a la medición del ángulo de contacto, las muestras tuvieron un tratamiento de limpieza riguroso, iniciando las muestras se sonicaron en baño de alcohol etílico por 10 min, posteriormente, se eliminó el exceso de alcohol con secado con nitrógeno y calentando las superficies a 80°C durante 10 min.

5.2.4.4 Cálculo la energía libre superficial mediante ángulo de contacto

La ecuación de Young (ecuación 5) relaciona el ángulo de contacto medido con las tres energías de superficie, de modo que no permite conocer de forma directa la energía de superficie del sólido. La expresión en términos del trabajo de adhesión dada por Young-Dupré, aunque no válida para todos los sistemas ya que desprecia varias contribuciones, permitió incluir la idea de que W_a es el resultado de contribuciones aditivas provenientes de diferentes fuerzas de adhesión [73-75]

Esta idea fue extendida a la energía superficial, la cual es consecuencia de las interacciones existentes entre los átomos o moléculas que conforman las superficies y puede dividirse en contribuciones de diferentes fuerzas de adhesión siendo las más significativas las interacciones dispersivas y las polares que actúan de forma aditiva ($\gamma_{total} = \gamma_{dispersiva} + \gamma_{polar}$).

Las interacciones dispersivas (no-polares) consideran todas las interacciones causadas por fluctuaciones temporales de la carga en los átomos/moléculas, es decir, son las interacciones dominadas por las fuerzas Van der Waals, que siempre se encuentran presentes y que en general constituyen la principal componente de la energía de superficie.

Las interacciones polares consisten de las interacciones Coulombicas entre dipolos permanentes o entre dipolos permanentes y dipolos inducidos (enlaces de hidrógeno) y no necesariamente se encuentran presentes en todos los materiales. Al colocar una gota de líquido sobre la superficie de un sólido, la interacción entre las dos fases está determinada por la razón entre las componentes dispersivas y polares $[(\gamma_{dispersiva} / \gamma_{polar})_{líquido} \text{ versus } (\gamma_{dispersiva} / \gamma_{polar})_{sólido}]$ de cada fase. Cuando dichas razones son similares, entonces más interacciones son posibles entre ambas fases y se establece una fuerte adhesión. Mientras mayor sea dicha razón, mayor será la interacción entre ambas fases y a su vez, mayor será la tensión interfacial (γ_{Ls}). Con base en esta propuesta se presentaron diferentes modelos, como el de Owens-Wendt con el cual puede estimarse la energía libre del sólido, realizando mediciones del ángulo de contacto con al menos dos líquidos de tensión superficial conocida.

De modo que para determinar la energía de superficie de un sólido se pueden utilizar estos modelos midiendo el ángulo de contacto con líquidos modelos, cuyas tensiones superficiales sean conocidas, incluyendo sus componentes polares y dispersivas.

Más recientemente, **Van Oss-Chaudhury-Good** (VCG) propusieron un modelo diferente basado en la teoría de interacciones ácido-base que utiliza relaciones aditivas y no-aditivas entre la energía libre de superficie y sus componentes. El modelo VCG sobresale de otros modelos utilizados para calcular la energía superficial, pues considera que dentro de la componente polar están contenidas las interacciones ácida y básica, las cuales se relacionan directamente con hidrofiliidad/hidrofobicidad de un material [70, 71, 76].

El modelo de VCG describe a la componente dispersiva en términos de la teoría de Lifshitz para describir las fuerzas Van der Waals (LW) y las otras interacciones polares que ocurren debido a enlaces hidrógeno son incluidas con base en el modelo de las interacciones donador-aceptor o bien interacciones ácido-base de Lewis (AB). La componente ácida, caracteriza la propensión de la superficie a interactuar con líquidos que tengan la capacidad de donar electrones (actúan como bases). La componente básica caracteriza la propensión de la superficie de interactuar con líquidos que tengan la habilidad de aceptar electrones (actúan como ácidos).

El modelo VCG se describe mediante la ecuación de Van Oss-Chaudhury-Good, la cual se describe en la ecuación 8 que se muestra a continuación:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right) \quad 8$$

Donde:

θ es el ángulo de contacto,

γ_L es la energía libre superficial del líquido de prueba. Se obtiene de la componente dispersiva y de la polar, y $\gamma_L = \gamma_L^{LW} + \gamma_L^{AB}$

γ_S^{LW} , γ_L^{LW} son la componente apolar o dispersiva (LW) de la superficie sólida de análisis y del líquido de prueba, respectivamente.

γ_L^{AB} y γ_S^{AB} son la componente polar del líquido de prueba y de la superficie sólida de análisis, respectivamente. Donde $\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-}$

$\gamma_L^+ \gamma_L^-$ y $\gamma_S^+ \gamma_S^-$ son las interacciones ácido y base de la componente polar del líquido de prueba y la superficie sólida de análisis, respectivamente [76-78].

Dentro de la ecuación de VCG, los valores conocidos o medibles son $\cos \theta$, γ_L , γ_L^{LW} , γ_L^+ y γ_L^- , de los cuales $\cos \theta$ depende del ángulo de contacto medido de la superficie y los demás elementos pertenecen al líquido de prueba [70, 71].

Sin embargo, los valores de la energía superficial del sólido de prueba (γ_S^{LW} , γ_S^+ y γ_S^-) son desconocidos, para poder determinar los valores de las tres incógnitas, se requiere resolver un sistema de tres ecuaciones, donde se conozcan los demás valores. Por lo tanto, para resolver el sistema de tres ecuaciones se requieren tres líquidos diferentes de prueba que proveen los valores constantes dentro del sistema de ecuaciones. [78].

En este trabajo de investigación uno de los objetivos es determinar la energía de superficie en los materiales, así como determinar si esta propiedad superficial se modifican por el tratamiento H_2O_2 .

Para el cálculo de la energía libre superficial de los materiales de estudio se utilizó el modelo de VCG, por ende, se utilizaron tres líquidos; dos polares y uno no-polar (el agua desionizada, la formamida y el diyodometano) con los cuales se midió el ángulo de contacto en la superficie de los materiales. Estos líquidos han sido catalogados como una buena opción que produce resultados consistentes [79]. Aunque como todos los métodos de determinación de energía de superficie en sólidos utilizando dos o tres líquidos, las soluciones son muy sensibles a pequeñas modificaciones en la medición o en las propiedades de los líquidos, e incluso, pueden dar resultados no realistas [73]. Además, se ha observado que la medición del ángulo de contacto depende de la historia de la superficie incluyendo esto el procedimiento de limpieza [59]

Al igual que en el ensayo de mojabilidad, se utilizaron 3 muestras por material, y, se midieron 2 gotas sésiles por muestra obteniendo 6 datos para cada líquido en cada

muestra. Se utilizó una temperatura de 37 °C en una cámara que controló la temperatura.

Los valores de energía libre superficial, componentes dispersiva y polar, así como interacciones ácida y básica del agua desionizada, la formamida y el diyodometano se muestran en la tabla 2:

Disolvente	γ_L (mJ/m ²)	γ_L^{LW} (mJ/m ²)	γ_L^{AB} (mJ/m ²)	γ_L^+ (mJ/m ²)	γ_L^- (mJ/m ²)
Agua (A)	72.8	21.8	51	25.5	25.5
Formamida (F)	58	39	19	2.28	39.6
Diyodometano (D)	50.8	50.8	0	0	0

Tabla 2 Energías superficiales, componente dispersiva, componente polar, interacción ácida e interacción básica de los líquidos de prueba. Adaptado de [80].

Con el ángulo de contacto obtenido en el agua, la formamida y el diyodometano, fue posible plantear el sistema de ecuaciones 9-11 que a continuación describen:

$$(1 + \cos \theta_A)(72.8) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} \sqrt{21.8} + \sqrt{\gamma_S^+} \sqrt{25.5} + \sqrt{\gamma_S^-} \sqrt{25.5} \right) \quad 9$$

$$(1 + \cos \theta_F)(58) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} \sqrt{39} + \sqrt{\gamma_S^+} \sqrt{39.6} + \sqrt{\gamma_S^-} \sqrt{2.28} \right) \quad 10$$

$$(1 + \cos \theta_D)(50.8) = 2 \left(\sqrt{\gamma_D^{LW}} + \sqrt{50.8} \right) \quad 11$$

El sistema de ecuaciones se resolvió utilizando LabVIEW.

Se utilizó un goniómetro modelo Ramé-Hart Inc para realizar las mediciones ángulo de contacto. Además, las muestras tuvieron un tratamiento de limpieza riguroso, que consistió en sonicarlas en baño de alcohol etílico por 10 min y posteriormente se eliminó el exceso de alcohol secando con nitrógeno y calentando las superficies a 80 °C durante 10 min.

5.2.4.5 Valoración de la carga en superficie

El punto de carga zero (pzc, siglas en inglés) es el pH en el cual la carga neta en la superficie es cero. Esto es debido a que la mayoría de los sitios (cargas) están neutros [81-83]. Es decir, la densidad de sitios positivos y negativos en la superficie

es la misma. En la figura 8, se muestra de manera descriptiva como las superficies de los materiales A y B pueden ser neutras, negativas y positivas dependiendo de su pzc y pH al que se encuentren inmersos los materiales.

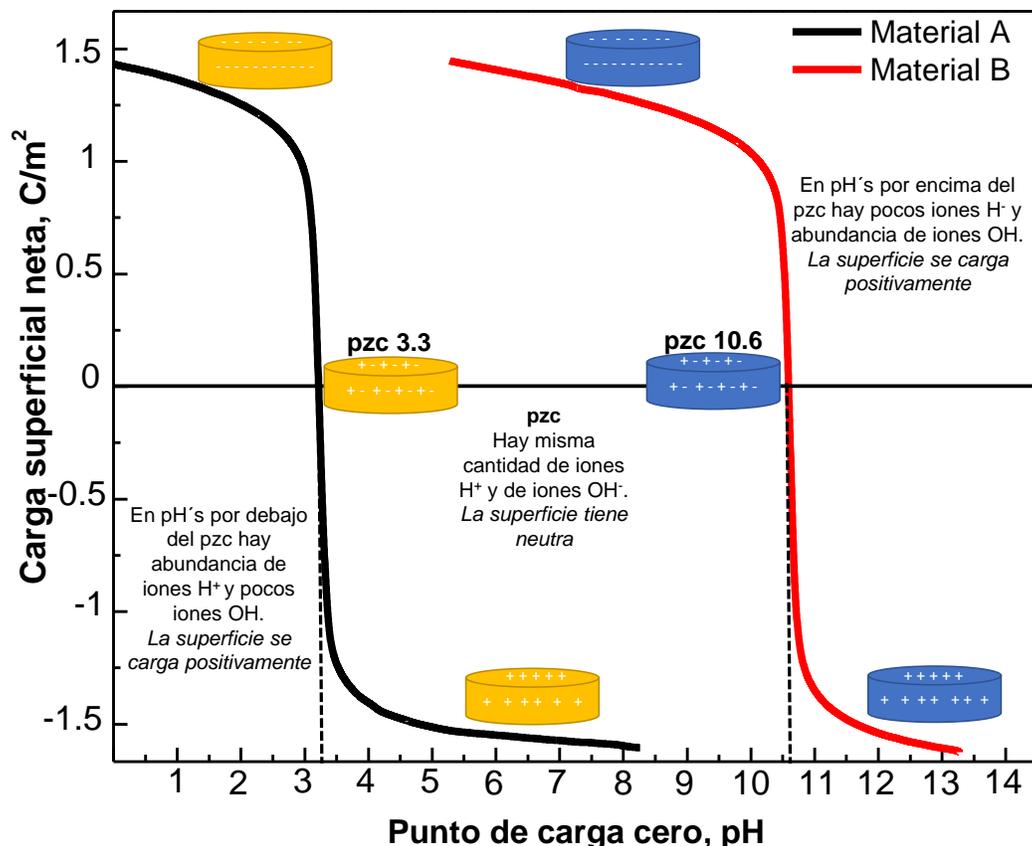


Figura 8. Esquema descriptivo de la importancia del punto de carga cero en un material A y un material B.

Para biomateriales, el pzc es importante pues da una idea sobre la carga que está presente en la superficie en un pH fisiológico y cómo esto puede influir en la interacción del biomaterial con las proteínas, con las células o con bacterias [84-90].

La determinación de la carga en la superficie de las diferentes muestras prístinas y tratadas del cpTi, el SS, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂, se realizó mediante el cálculo de pzc.

El pzc se realizó con la valoración potenciométrica de una sal de fondo, en nuestro caso fue cloruro de potasio 0.01 M (KCl); con burbujeo de nitrógeno. Se ajustó a un pH inicial de 2 con adición de ácido clorhídrico 0.01 M (HCl) y se colocó

la muestra. Se tituló adicionando hidróxido de sodio 0.01 M (NaOH) en volúmenes de 2 ml, se registró el cambio de pH y se obtuvo una curva de pH vs volumen de titulante. El punto en el cual se observa un cambio en la pendiente de la curva obtenida representa el pzc.

La valoración se realizó con un potenciómetro Jeanway modelo 3540. El ensayo de pzc se validó previamente. Por lo tanto, el pzc de cada muestra se realizó una sola vez.

5.2.4.6 Determinación de la respuesta electroquímica

La electroquímica es una disciplina con la que se puede estudiar las relaciones químicas que dan origen a la producción de una corriente eléctrica [91], por lo que puede ser empleada para estudiar procesos de corrosión.

La corrosión es un proceso químico irreversible que involucra una reacción electroquímica. La reacción electroquímica se lleva a cabo en la superficie del material, por lo regular es un metal (M) [92]

Cuando el metal está inmerso en un ambiente corrosivo, este se corroerá, lo que ocasiona la pérdida del material; en este momento se dice que hay disolución del metal [92]

La oxidación del metal, ecuación 12, está acoplada a la reducción del agente oxidante (medio ambiente) el cual toma los electrones de la reacción de oxidación. Las ecuaciones 13 y 14 muestran las reacciones de reducción favorecidas en medios ácidos, mientras que la ecuación 15 y 16 tienen lugar en medios neutros o básicos [92].



En la figura 9 se muestra un esquema de las etapas que ocurren en el proceso de corrosión (anódico y catódico) de metal expuesto a un ambiente líquido oxidante [92].

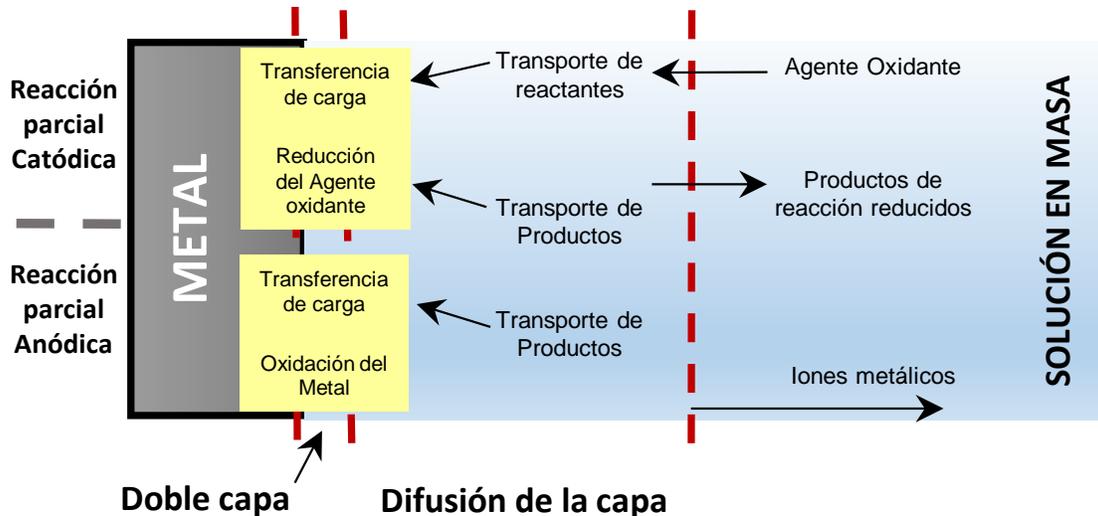


Figura 9. Etapas de la corrosión de un metal en ambientes líquido oxidantes. Adaptada de [92, 93].

Cuando un sistema biológico interactúa con un biomaterial metálico, varios fenómenos de corrosión pueden suceder, como son: la disolución activa, la pasivación, la disolución pasiva, la disolución transpasiva, la corrosión localizada y la adsorción [92].

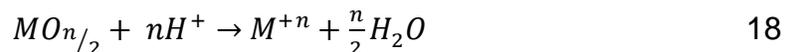
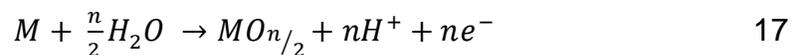
La pasividad de los metales consiste en la formación de una fina capa de óxido en su superficie que protege el metal del ambiente que lo rodea. Los materiales se auto-protegen por la formación espontánea de una película delgada de óxido, la cual controla la cinética de corrosión (velocidad de corrosión) en soluciones acuosas. Obviamente, en un biomaterial metálico, la pasivación es un fenómeno importante que le provee de resistencia a la corrosión en medios biológicos. Por lo tanto, la biocompatibilidad de los biomateriales está estrechamente relacionada con la estabilidad de esta capa de óxido. La película pasiva desempeña dos funciones; la limitación de las reacciones anódica y catódica, y además actúa como una barrera física para cationes (iones con carga positiva) y aniones (iones con carga negativa) transportadas a la superficie del metal, así como una barrera electrónica para los electrones [92].

Por otro lado, los metales libres de película de óxido están en su **estado activo**. La disolución de estos materiales metálicos se denomina **disolución activa** e implica una transferencia de carga en la interfase metal-electrolito [92].

Los iones generados en el proceso de corrosión son disueltos en forma de especies hidratadas o complejas según la ecuación 12. Sin embargo, **la disolución pasiva** tiene lugar cuando los metales pasivos son disueltos. En este caso, los cationes son generados en la interfase metal-película de óxido, mediante la transferencia de carga y la migración de los iones a través de la interfase de película pasiva al electrolito [92].

La ecuación 17 muestra la formación de la película de óxido, como consecuencia de la migración del catión (M^{+n}) hacia el exterior de la superficie y el anión (O^{-2}) migra en la dirección opuesta, mientras que la ecuación 16 representa la disolución pasiva de los cationes de la película pasiva, la cual se disuelve en la solución [92].

La reacción global se compone de las ecuaciones 17 y 18, que es equivalente a la ecuación 10 [92]



La disolución transpasiva ocurre cuando la película protectora pasiva es oxidada en especies con una solubilidad mayor, como por ejemplo de $Cr^{+3} \rightarrow Cr^{+6}$, donde el Cr_2O_3 (Cr^{+3}) no es soluble en agua, mientras que el CrO_3 (Cr^{+6}) sí lo es. Esto puede ocurrir por debajo del potencial de formación de oxígeno (disolución transpasiva uniforme por oxidación de película) o cuando se observa el desprendimiento de oxígeno (disolución transpasiva de alta velocidad) o cuando la evolución del oxígeno es observada (disolución transpasiva de alta velocidad) [92].

La disolución a potenciales transpasivos es relevante para corrosión en medios altamente oxidantes [92].

Otro tipo de corrosión importante es la corrosión localizada, la cual se lleva a cabo en un pequeña área de la superficie, ahí la velocidad de corrosión es mucho más

grande que en el resto de la superficie. Este tipo de corrosión es conocida como **corrosión por picadura** que es común en las aleaciones como el acero inoxidable [92].

Otro fenómeno común en medios biológicos, es la adsorción de proteínas en superficies metálicas; estas proteínas están presentes en los fluidos corporales [92]. La adsorción de proteínas ocurre principalmente debido a las fuerzas de Van der Waals y puede modificar la velocidad de disolución pasiva de los biomateriales [93].

La respuesta electroquímica de las superficies de estudio se determinó a través de cuatro técnicas electroquímicas diferentes que a continuación se mencionan:

1. Voltamperometría cíclica (VC).
2. Potencial a circuito abierto (OCP, siglas en inglés).
3. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, siglas en inglés).
4. Polarización potenciodinámica (PP).

En estos estudios electroquímicos se utilizó una celda electroquímica convencional de tres electrodos, con un volumen de 150 ml. Se utilizó un alambre de platino como contraelectrodo, un electrodo calomel (Hg_2Cl_2) como electrodo de referencia y los electrodos de trabajo fueron las muestras de cpTi, SS, aTiO₂ y cTiO₂ prístinas y tratadas.

La solución utilizada como electrolito fue la solución de Hartmann que anteriormente se mencionó es una solución que simula al medio fisiológico. Las técnicas electroquímicas de OCP, EIS y PP se realizaron en la misma muestra, de manera consecutiva, mientras que la VC se hizo en otras muestras, todos los ensayos se realizaron por triplicado, se utilizó una muestra nueva en cada repetición. El equipo utilizado fue un Gamry PCI4/300 y el software Gamry Echem Analyst.

De las cuatro técnicas mencionadas, la VC se realizó como una técnica de previa a los demás estudios electroquímicos, esto con la finalidad de conocer la información redox de los materiales de estudio, así como saber si los materiales poseen un proceso reversible redox .

En la voltamperometría cíclica, se aplica sobre el sistema un potencial que varía linealmente a partir de un potencial inicial E_1 . En cada momento el potencial aplicado, E , verifica la ecuación 19 [94]:

$$E = E_1 + vt \quad 19$$

Donde la v es la velocidad de variación del potencial con el tiempo, $v = dE/dt$. Esta variación del potencial se aplica hasta un potencial de retorno, E_2 , a partir del cual se vuelve al potencial E_1 , tal como se muestra en la figura 10 [94].

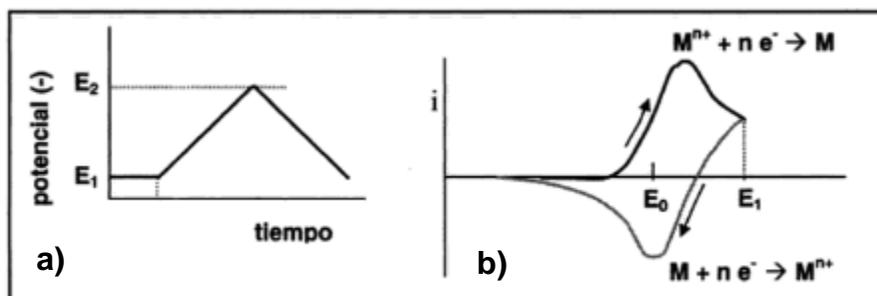


Figura 10. Experimento de voltamperometría cíclica a) variación lineal de potencial. B) Curva voltamperométrica resultante, $i = f(E)$. Adaptada de [94]

La forma de la curva de la figura 10b depende del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo (materiales de estudio). El análisis de las curvas voltamperométricas también permite determinar si se produce un proceso de electrodeposición, es decir el proceso de crecimiento de una nueva fase sobre el electrodo de trabajo, realizando varios barridos a diferente potencial de retorno, próximos al potencial en el que se inicia su proceso de reducción [94].

5.2.4.6.1 Potencial a circuito abierto

OCP o también llamado fuerza electromotriz (fem) es una herramienta útil para estudiar la disolución de un metal o material en un medio dado [95]. Este estudio se puede realizar a tiempos prolongados o tiempos cortos. Además, en tiempos cortos se puede determinar la estabilidad de la muestra en el medio, para las muestras de estudio se realizó un seguimiento del OCP durante un tiempo de 1800 segundos.

5.2.4.6.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica

EIS es una técnica electroquímica relativamente moderna, utilizada ampliamente en diferentes campos científicos.

EIS es una técnica no destructiva que se realiza en corriente alterna (AC, siglas en inglés), la cual se realiza bajo condiciones de equilibrio. Particularmente es sensible a pequeños cambios en el sistema que permiten caracterizar las propiedades del material e incluso sistemas electroquímicos en medios de baja conducción [92, 96].

El método de impedancia consiste en medir la respuesta de un electrodo a la modulación de un potencial sinusoidal de pequeña amplitud, típicamente de entre 5 a 10 mV en diferentes frecuencias [92].

5.2.4.6.2.1 Respuesta del electrodo a un potencial de perturbación sinusoidal

Una señal de excitación sinusoidal $E(t)$ se superpone sobre el potencial de estado estacionario de un electrodo, expresado como una función del tiempo (t), ecuación 20 [92]:

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t) \quad 20$$

Donde E_0 es la amplitud en Volts, ω es la frecuencia angular, que se relaciona con la frecuencia como $\omega = 2\pi f$ (f es la frecuencia expresada en Hertz, Hz) y t el tiempo. A fin de mantener una respuesta lineal del electrodo, la amplitud de modulación no debe exceder de 10 mV [92].

La corriente $I(t)$ asociada al potencial sinusoidal en la mayoría de los casos también es sinusoidal. La señal de respuesta $I(t)$ es desplazada en fase y tiene una amplitud diferente al potencial aplicado, ecuación 21 [92]:

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t - \varphi) \quad 21$$

Donde I_0 es la amplitud en amperes y φ es la diferencia de fase entre la corriente y el voltaje [92].

La impedancia electroquímica (Z) se define de forma similar a la ley de Ohm, como se puede ver en la ecuación 22 [92].

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cos(\omega t)}{I_0 \cos(\omega t - \varphi)} = Z_0 \frac{\cos(\omega t)}{\cos(\omega t - \varphi)} \quad 22$$

La impedancia es un concepto más general que considera las diferencias de fases y de amplitudes (Z_0) de una señal periódica, puede expresarse en el plano complejo como $Z = Z_{Re} + jZ_{Im}$. Por lo tanto, la impedancia (Z) es representada por vector que se compone de una parte la real y una parte imaginaria, caracterizada por el módulo Z_0 y el cambio de fase, respectivamente. Es por ello que la ecuación 23 se puede generalizar con el uso de la ecuación de Euler [92].

$$Z = \frac{E_0 \exp(j\omega t)}{I_0 \exp [j(\omega t - \varphi)]} = Z_0 \exp(j\varphi) = Z_0 (\cos \varphi + j \operatorname{sen} \varphi) \quad 23$$

Debido a que la impedancia es un vector, es posible calcular su módulo, así como el ángulo φ que forma el vector respecto a Z_{Re} (fase), se utilizan las siguientes igualdades, ecuaciones 24 y 25 [92].

$$|Z| = \sqrt{Z_{Re}^2 + Z_{Im}^2} \quad 24$$

$$\theta = \operatorname{arc} \left(\frac{Z_{Im}}{Z_{Re}} \right) \quad 25$$

Gráficamente, la impedancia puede presentarse de varias formas, siendo las más comunes el diagrama de Nyquist y el diagrama Bode [92, 96]. El diagrama de Nyquist consiste en una representación en el plano complejo donde la parte real se coloca en el eje x , y la parte imaginaria en el eje y , figura 11 (a) [92].

En el diagrama de Bode, se grafican el módulo $|Z|$ en escala logarítmica y el cambio de fase φ , ambos en el eje y , en función del logaritmo de la frecuencia, f , figura 11 (b) [92].

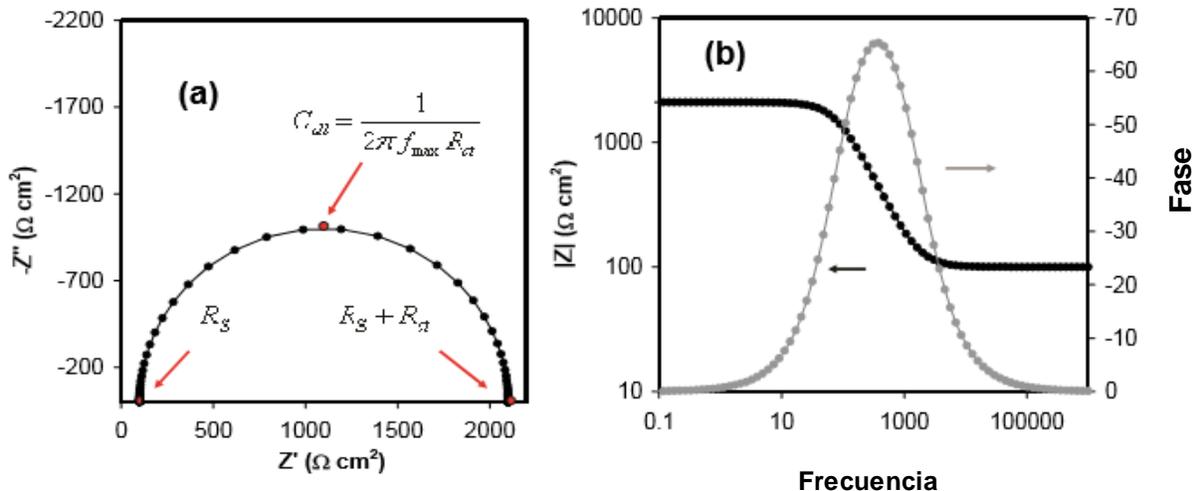


Figura 11. (a) El diagrama de Nyquist y (b) el diagrama de Bode de datos de impedancia de un circuito equivalente sencilla [92].

5.2.4.6.2 Interpretación de los resultados de impedancia

Una de las maneras de interpretar los espectros de impedancia es mediante la selección de un circuito eléctrico que se ajuste adecuadamente a los datos experimentales.

Un circuito equivalente está formado por elementos eléctricos, los cuales describen físicamente al sistema electroquímico estudiado.

Por lo tanto, de acuerdo con el circuito equivalente y sus elementos eléctricos es posible obtener información sobre los mecanismos y las propiedades del sistema electroquímico [92].

Los elementos eléctricos comunes y su significado correspondiente se describen de la siguiente manera [92]:

- Elemento de resistencia eléctrica (**R**): Describe la transferencia de carga a través de una interfase, por ejemplo un metal o un electrolito.
- Elemento de capacitancia eléctrica (**C**): Describe a estructuras cargadas (capas dobles) que son consideradas como un condensador de placas paralelas.

- Elemento de Inductancia eléctrica (**L**): Se asocia con procesos de adsorción-desorción, cuando se forman capas (película pasiva).
- Elemento de impedancia Warburg (**W**): Representa la difusión lineal bajo condiciones semi-infinitas. Esto, además, asume que la capa de difusión es de espesor infinito. La impedancia de Warburg se define a través de la admitancia Y_0 y un parámetro de difusión B [92, 97-99].
- Elemento de fase constante (**CPE**, siglas en inglés): Este elemento corresponde a una capacitancia no ideal, por lo regular, los fenómenos de capacitancia de doble capa o en una celda real, se comportan como un CPE y no como un capacitor. Siendo la CPE descrita como la impedancia de un capacitor en la ecuación 26:

$$\frac{1}{(j\omega)^\alpha Y_0} \quad 26$$

Donde, Y_0 y α son la capacitancia y el exponente, respectivamente. Cuando $\alpha=1$ es un capacitor, cuando $\alpha=0$ es una resistencia, cuando $\alpha=0.5$ es una impedancia Warburg y $\alpha=-1$ es una inductancia [97]. Recientemente el CPE ha sido usado para modelar la dispersión de frecuencia debida a otros fenómenos físicos, como pueden ser la formación de capas porosas [99].

En la Tabla 3 se encuentran resumidos los elementos típicos de un circuito equivalente.

Elemento	Impedancia	Símbolo
Resistencia	R	
Capacitancia	$-\frac{i}{\omega C}$	
Inductor	$i\omega L$	
Warburg (infinita)	$-\frac{1}{Y_0\sqrt{i\omega}}$	
Warburg (finita)	$\frac{\tanh(B\sqrt{i\omega})}{(Y_0\sqrt{i\omega})}$	
Fase Constante	$\frac{1}{(j\omega)^\alpha Y_0}$	

Tabla 3. Elementos típicos de un circuito equivalente. Adaptado de [92, 97].

En las mediciones de EIS, las muestras se llevaron a condiciones de equilibrio, por lo que durante 30 minutos se midió el potencial a circuito abierto para con este tiempo alcanzar el equilibrio. Posteriormente se aplicaron un voltaje AC de 10 mV de amplitud y una frecuencia inicial de 100000 Hz, la cual se fue modificando hasta una frecuencia final de 0.01 Hz, midiendo 10 puntos por década.

5.2.4.6.3 Polarización potenciodinámica

Es una técnica electroquímica que se realiza en corriente directa (**DC**, siglas en inglés), ampliamente utilizada para evaluar el comportamiento de la corrosión de un metal *in vitro* [100]. Típicamente el estudio de PP se realiza en condiciones de equilibrio, con el objetivo de poder estabilizar la muestra con el electrolito o el medio de interacción, para alcanzar un potencial cuasi-estable [101], con lo cual se aplica un barrido de potencial a velocidad constante (por ejemplo 1 mV/s) que inicia por lo usual en un potencial negativo hasta un potencial positivo o menos negativo con respecto al potencial de circuito abierto Este barrido de potencial genera una corriente que se mide entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo [102, 103]

Esta técnica electroquímica proporciona información del potencial de corrosión (E_{corr}), reacciones anódica y catódica en la muestra, información de la cinética de

la corriente de corrosión a un punto dado en el tiempo. Esta técnica se fundamenta en la cinética de los electrodos, en la cual hay una reacción catódica y una reacción anódica, la aplicación de la ecuación de Botler-Volmer y la teoría del potencial mixto dan como resultado la ecuación cinética básica 27 [103]:

$$i = i_{corr} \left\{ \exp \left[\frac{2.303(E-E_{corr})}{\beta_a} \right] - \exp \left[\frac{2.303(E-E_{corr})}{\beta_c} \right] \right\} \quad 27$$

Donde E es el potencial aplicado para polarizar el sistema de corrosión, i es la densidad de corriente externa, E_{corr} y i_{corr} son el potencial de corrosión y la corriente de corrosión, β_a y β_c son las pendientes de Tafel anódica y catódica, respectivamente [103].

Cuando E está lejos de E_{corr} , la ecuación 27 se convierte en la famosa ecuación de Tafel, ecuación 28 [103]:

$$\eta = a \pm b \log|i| \quad 28$$

Donde

η es el sobrepotencial. Es decir, el potencial aplicado (E_{ap}) menos el potencial de equilibrio (E_{eq}), $E_{ap} - E_{eq}$.

a esta relacionado con la velocidad de las reacciones anódicas y catódicas bajo condiciones de equilibrio. Es decir, cuando el sobrepotencial, η , es cero.

b es β_a o β_c , que son las pendientes de Tafel anódica (β_a) y pendiente catódica (β_c) de manera general b se encuentre entre 60 y 120 mV/década.

i es la densidad de corriente neta anódica o catódica [103].

La ecuación 28 indica que el logaritmo de la densidad de corriente externa varía linealmente con el potencial a un sobrepotencial alto. La densidad de corriente puede ser determinada mediante la extrapolación de la línea recta de $E \sim \log|i|$, la cual se corta en el potencial de corrosión [103].

Asimismo, la ecuación 28 considera a la reacción de corrosión como el proveedor mayoritario de la densidad de corriente durante la medición potenciodinámica.

Además, cuando la superficie se carga, esta muestra una capacitancia interfacial similar al comportamiento eléctrico de un capacitor [103]

La curva de polarización potenciodinámica típica de un metal se compone de un dominio catódico, una transición anódica-catódica, un dominio pasivo anódico y un dominio transpasivo anódico, en la figura 12 se muestra la curva potenciodinámica de la aleación cromo-cobalto-molibdeno (CrCoMo) [92, 104].

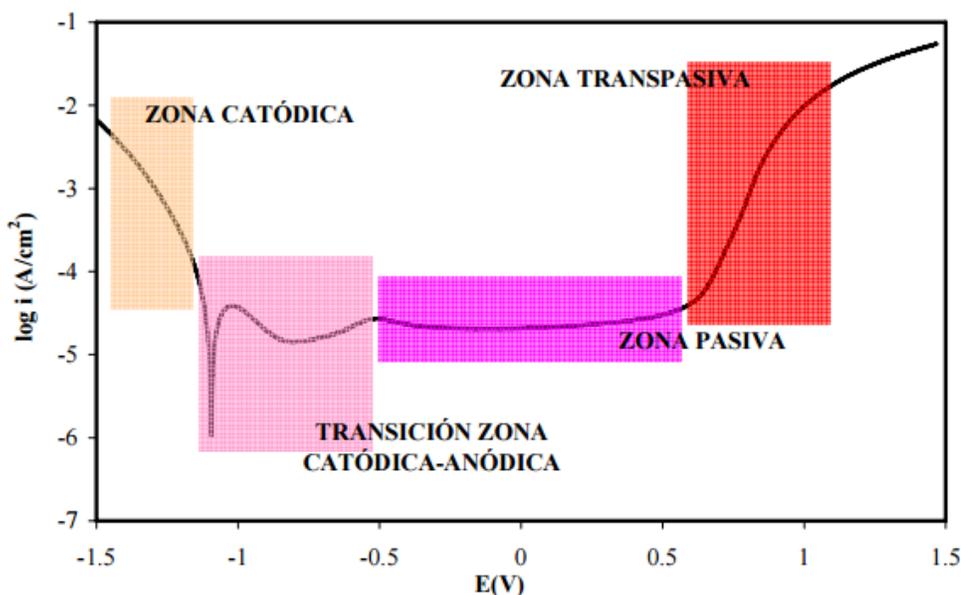


Figura 12. Curva potenciodinámicas de CrCoMo con sus dominios electroquímicos descriptivos. Adaptada de [92, 104].

En este trabajo, el estudio de corrosión se realizó a través de curvas potenciodinámicas. Se utilizó una ventana de potencial de -1.5 a 2 V, a un paso de 0.5 mV/s en el caso de cpTi, aTiO₂ y cTiO₂, para el SS el intervalo utilizado fue de -1 a 1 V a un paso de 0.5 mV/s.

5.2.5 Funcionalidad de los materiales como biomateriales

Para lograr una comprensión sobre la funcionalidad de un biomaterial, en condiciones *in vitro* se realizan ensayos celulares, siendo las interacciones celulares con la superficie de un material los estudios mayormente utilizados [105].

En un biomaterial la química superficial modula la respuesta celular *in vivo* o *in vitro*, incluyendo **adhesión**, supervivencia, ciclo celular así como **la expresión de la diferenciación de fenotipos celulares** [106].

El efecto de las propiedades de superficie del biomaterial está relacionado con la capacidad del biomaterial para adsorber diferentes especies de proteínas, concentración y/o la actividad biológica [106-108].

Por otro lado, en las células existen receptores de origen glicoproteico que provocan que la célula se adhiera a una superficie o entre ellas mismas, los receptores causantes que la célula reconozca una superficie como idónea para anclaje son **las integrinas**, una familia de receptores de transmembrana que están envueltos en la adhesión célula-matriz extracelular (MEC) [105].

Las integrinas son heterodímeros de subunidades α y β unidos no covalentemente, el dímero es una molécula funcional que se une a una secuencia de aminoácidos específicos tales como Arginina-Glicina-Acido aspártico (RGD), los cuales reconocen el arreglo que poseen muchas proteínas de la MEC, incluyendo la fibronectina y la vitronectina, pero pueden reconocer otras secuencias de aminoácidos para otras proteínas de la MEC como las colágenas, lamininas, etc. Así, dependiendo del dímero formado, la integrina dimérica puede reconocer diferentes moléculas de la MEC de forma específica, ya que existen varios tipos de subunidades α y β [105].

Las integrinas regulan las interacciones **célula-biomaterial** a través de la interacción de los ligandos extracelulares adhesivos los cuales pueden generarse a través de [105]:

- (I) La adsorción de las proteínas adsorbidas a partir de sangre, plasma o suero [105].
- (II) Del tratamiento o preparación de la interfase, por ejemplo, bioadhesivos como RGD [105].
- (III) De la interacción entre las mismas células, las cuales producen sus propias proteínas, por ejemplo, fibronectina y colágeno [105].

En la Figura 13, muestra los mecanismos que regulan la interacción célula-biomaterial [105]

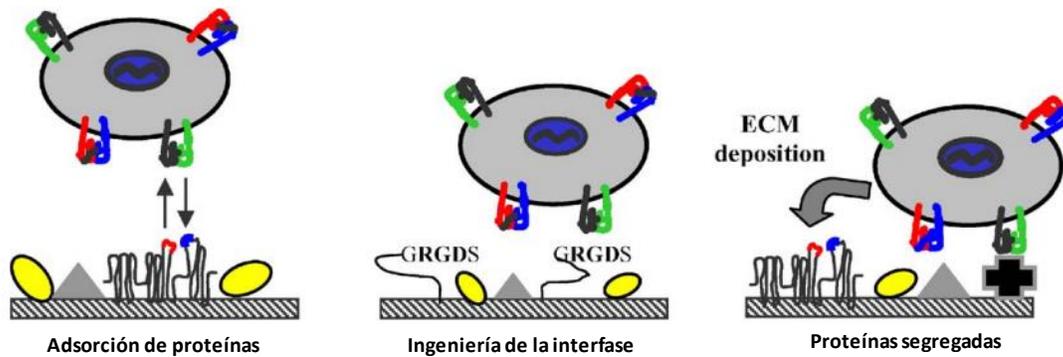


Figura 13. Mecanismos que regulan la interacción célula-biomaterial. Adaptada de [105]

El término de adhesión celular se compone de dos fases [109]:

La primera corresponde a la etapa de anclaje o **attachment phase** en inglés, la cual se da rápidamente aproximadamente los primeros 60 min de interacción [110]. En esta fase son determinantes las propiedades fisicoquímicas del biomaterial, como las interacciones electrostáticas (fuerzas iónicas) y de fuerzas dispersión (Van der Waals y London), las cuales son las involucradas en la interacción biomaterial-célula [109].

La segunda etapa es la fase de proliferación y extensión celular, que en inglés es conocida como **spreading phase**, la cual comprende de los 60 a 90 min siguientes de interacción entre célula-biomaterial. En esta etapa se involucran ya moléculas biológicas como son las proteínas de la matriz extracelular, proteínas de la membrana celular, proteínas del citoesqueleto que interactúan para indicar señales de transducción, que a su vez llevan a la activación de factores de transcripción los cuales originan la regulación de la expresión génica [109].

A la fecha no se tiene claro con precisión el total de proteínas responsables de la adhesión celular, no obstante hasta el momento se encuentran sólo investigadas algunas que a continuación se nombran: la fibronectina, la vitronectina, la osteopontina, los colágenos, el trombospodin, el fibrinógeno, y el factor von Willebrand, [111]

Cómo se mencionó anteriormente, las propiedades de superficie de un material modifican la diferenciación celular, pero en sí, ¿Qué es la diferenciación celular?

La diferenciación celular es el proceso por el que las células multipotentes de los organismos en desarrollo adquieren características que las distinguen de las demás células. Este complejo mecanismo se divide en: la determinación, la diferenciación y la maduración [112] .

La determinación propiamente dicha, es la responsable que las células de un determinado tipo celular expresen sus primeras características específicas, correspondientes a su tipo celular. Una vez que la célula se ha diferenciado y expresa sus genes celulares específicos, estos se transmiten a las células hijas y se mantienen constantes; en esta situación la célula ya no cambiara nunca a otro tipo celular [113]

La diferenciación propiamente dicha, es la responsable que las células de un determinado tipo celular expresen sus primeras características específicas, correspondientes a su tipo celular. Una vez que la célula se ha diferenciado y expresa sus genes celulares específicos, estos se transmiten a las células hijas y se mantienen constantes; en esta situación la célula ya no cambiara nunca a otro tipo celular [112].

La maduración se refiere a las últimas etapas de la diferenciación. Se caracteriza por la adquisición de otras propiedades específicas del tipo celular que, en última instancia, dan como resultado la aparición de las características fenotípicas propias de los organismos maduros [112].

La diferenciación celular es, por tanto, un problema de regulación génica y la estabilidad general del estado “determinado” de las células depende de las interacciones núcleo-citoplasma [112].

Control de la diferenciación

Los mecanismos y factores implicados en los procesos de diferenciación celular son muy variables. Los estudios realizados en diferentes tipos celulares han demostrado que la diferenciación implica una regulación génica constante más que la activación o inactivación continúa de genes. Por otro lado, algunos factores reguladores de la diferenciación actúan amplificando las diferencias entre los tipos celulares pero son

incapaces *per se* de producir diferenciación celular; tal es el caso de la muerte celular y la proliferación selectiva [112].

Hay dos grupos de procesos responsables de las primeras diferencias entre las células. El primero es la **división celular asimétrica** basado en la segregación desigual del potencial de división. La tabla 4 muestra los factores reguladores de la diferenciación celular [112].

Factores extracelulares	Factores intracelulares
1. Moléculas solubles de señal	1. Genotipo
2. Interacciones intercelulares	2. Línea o tipo celular
3. Interacciones con sustratos	3. Estado de desarrollo
	4. Estado del ciclo celular
	5. Estado nutricional
	6. Daños en el ADN
	7. Genes moduladores
	- Facilitadores: <i>myc</i> , <i>ras</i> , p53, APO-1/Fas.
	- Inhibidores: <i>bcl-2</i> , <i>bcl-x</i> , <i>bax</i> , <i>T24-ras</i>

Tabla 4. Factores reguladores de la diferenciación celular. Adaptado de [112]

El segundo es la interacción entre dos células e incluyen la inducción embrionaria. Las células inductoras influyen a una o más células recién nacidas para cambiar su destino y, en consecuencia, dar origen a un tercer tipo celular. Este mecanismo requiere la preexistencia de dos tipos de células: uno productor de sustancias inductoras o inhibitoras y otro capaz de recibir y responder a ellas [112].

Esta división, sin embargo, es puramente conceptual ya que el proceso de diferenciación celular es continuo y sin saltos [112].

La formación de estructuras óseas en vertebrados está comprendida por la diferenciación de condrocitos y osteoblastos [114]; esta diferenciación celular es regulada a través muchos factores de diferenciación secretados que incluyen TGF β s [115], proteínas morfogénicas óseas [116], factores de crecimiento insulínico tipo I (IGFs), FGFs [117], la hormona paratiroidea (PTH) [118], PTH-pectido relacionado, hormona tiroidea, proteína Indian hedgehog y ácido retinoico [119]. Además, los

factores de transcripción juegan un papel importante en la diferenciación de los condrocitos y osteoblastos como SOX-9 [120] y RUNX-2 , respectivamente [121].

Como se mencionó **RUNX-2** es un factor de transcripción, está relacionado con Runt-2/Cbfa1 (factor de enlace nuclear $\alpha 1$)/Pebp2 α A (polioma promotor de la proteína de enlace 2 α A). RUNX-2 determina el linaje de los osteoblastos a partir de células mesénquimales pluripotentes, induce la diferenciación de los osteoblastos en la primera etapa y en la etapa tardía se inhibe [121].

5.2.5.1 Ensayos de adhesión celular y de diferenciación celular

El motivo de realizar los ensayos de adhesión y de diferenciación celular en este trabajo de investigación fue encontrar una relación entre las propiedades de superficie y la capacidad de adhesión y diferenciación celular que poseen los materiales de estudio (cpTi, SS, cTiO₂ y aTiO₂). Así como los cambios generados debido a su interacción con el H₂O₂ contenido en la respuesta inflamatoria simulada. Para llevar a cabo el desarrollo de los ensayos de adhesión y diferenciación celular se realizó una colaboración científica entre el grupo de investigación PlasNamat del IIM-UNAM e investigadores del INR.

Los ensayos de adhesión y de diferenciación celular se realizaron en el INR, en la unidad de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa.

En los ensayos de adhesión celular y de diferenciación celular se utilizaron osteoblastos humanos, los cuales fueron obtenidos a partir de un cultivo primario de mandíbula humana. Las células se encontraban en un segundo pase, siendo este pase muy temprano el cual avala la expresión fenotípica de los osteoblastos. Tanto el ensayo de adhesión como el de diferenciación celular se realizaron por triplicado, para muestras prístinas como muestras tratadas.

La adhesión celular se cuantificó a través de un ensayo indirecto de colorimetría, donde las células adheridas a la superficie de los diferentes materiales de estudio fueron teñidas con azul de toluidina. Posteriormente, las células adheridas liberaron el color adquirido, a través del rompimiento de sus membranas, con esto fue posible medir la cantidad de color en cada material, la intensidad del

color (absorbancia a 620 nm) en cada muestra se relacionó con la cantidad de células adheridas. Es decir, a mayor absorbancia mayor número de células adheridas.

Para cuantificar la adhesión celular, se usó como control positivo a la colágena tipo I, pues esta proteína es una de las responsables de la adhesión celular, la colágena tipo I representó el 100% de la adhesión, con esta proporción se determinó el porcentaje de adhesión que mostraron el cpTi, el SS, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂ en sus versiones prístinas y tratadas.

Para determinar si es posible mantener la diferenciación de los osteoblastos, se midió la expresión de RUNX-2 mediante un ensayo de **inmunofluorescencia**, una inmunohistoquímica con fluorocromo en los anticuerpos para la detección de la proteína en cuestión, para determinar su expresión en las células sembradas sobre el cpTi, el SS, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂ en sus versiones prístinas y tratadas.

6. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la investigación, desde caracterización de los materiales, los cambios inducidos en las propiedades físico-químicas de los materiales en respuesta a la inmersión en la solución de inflamatoria simulada, así como la determinación de la adhesión y diferenciación celular.

6.1 Estudio estructural de los materiales

Con la intención de conocer la estructura de los materiales, se realizó análisis por difracción de rayos X, el patrón de difracción de rayos X del titanio comercialmente puro se muestra en la figura 14.

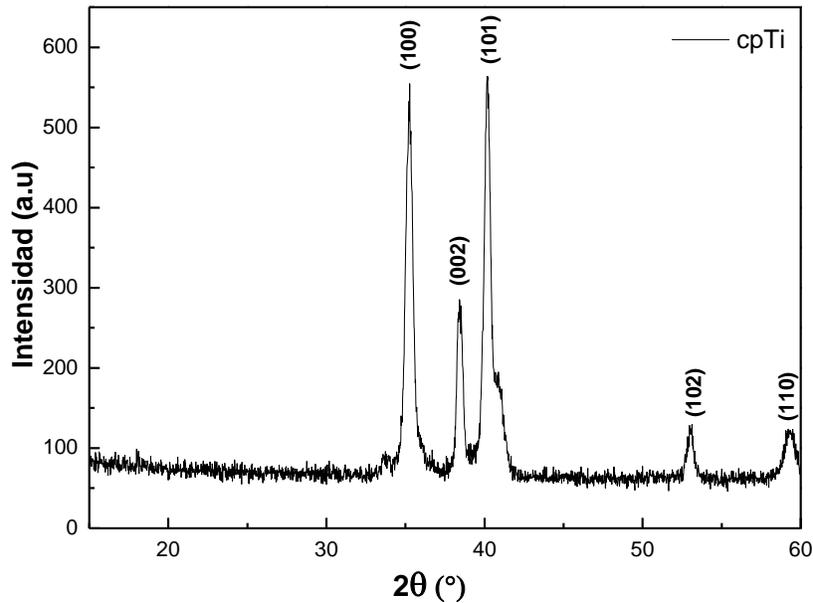


Figura 14. Patrón de difracción de rayos X del cpTi de la marca Straumann.

Los picos del difractograma del cpTi se indexaron utilizando la carta cristalográfica 00-044-1294. El grupo espacial que describe esta carta es el (194) P63/mmc, estos resultados corresponden a lo esperado para la estructura cristalina del cpTi, la cual corresponde a una estructura hexagonal compacta [84, 122].

En el caso del acero inoxidable 316L se muestra su difractograma en la figura 15, donde se puede apreciar que no fue posible obtener una mejor medición, debido a la fluorescencia que se produce en el SS (cuando los rayos X inciden en el SS se

generan choques inelásticos que arrancan un electrón de las capas internas de un átomo en la muestra, cuando este átomo regresa a su estado de mínima energía emite un fotón con una longitud de onda específica, pues cada elemento posee una energía característica de emisión, a este fenómeno se le conoce como fluorescencia). Sin embargo, a pesar de la fluorescencia se identificaron cuatro picos, los cuales fue posible indexar haciendo uso de la carta cristalográfica 00-052-0512, esta carta indica que la estructura cristalina del SS es cúbica centrada en las caras, el grupo espacial es Fm3m (225), este grupo corresponde a un acero austenítico.

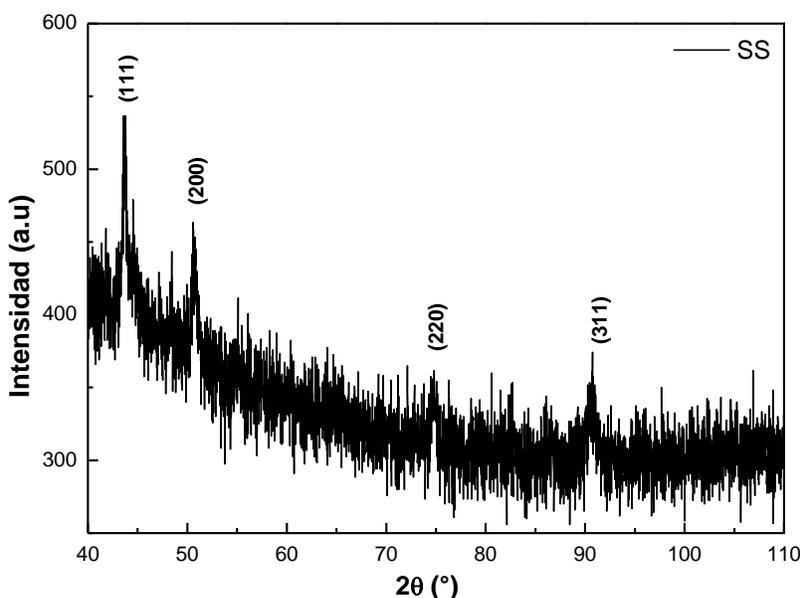


Figura 15. Patrón de difracción de rayos X de acero inoxidable 316L.

Respecto a la película de $c\text{TiO}_2$, el difractograma de rayos X se muestra en la figura 16. El difractograma se indexó con el uso de dos cartas cristalográficas, ICCD-01-075-1537 y ICCD-01-083-2242 las cuales corresponden a dos de las fases cristalinas conocidas del TiO_2 ; anatasa y rutilo, respectivamente.

Por lo tanto, la película delgada de $c\text{TiO}_2$ obtenida fue una mezcla de fases de anatasa y rutilo. De acuerdo al software utilizado para la indexación, PDXL2, la proporción de las fases cristalinas fue de 60% para rutilo y 40% para anatasa. Los resultados obtenidos son semejantes a los obtenidos por Argelia Almaguer Flores

et al [84], miembros del grupo de investigación PlasNaMat donde ya se había investigado esta película delgada [84].

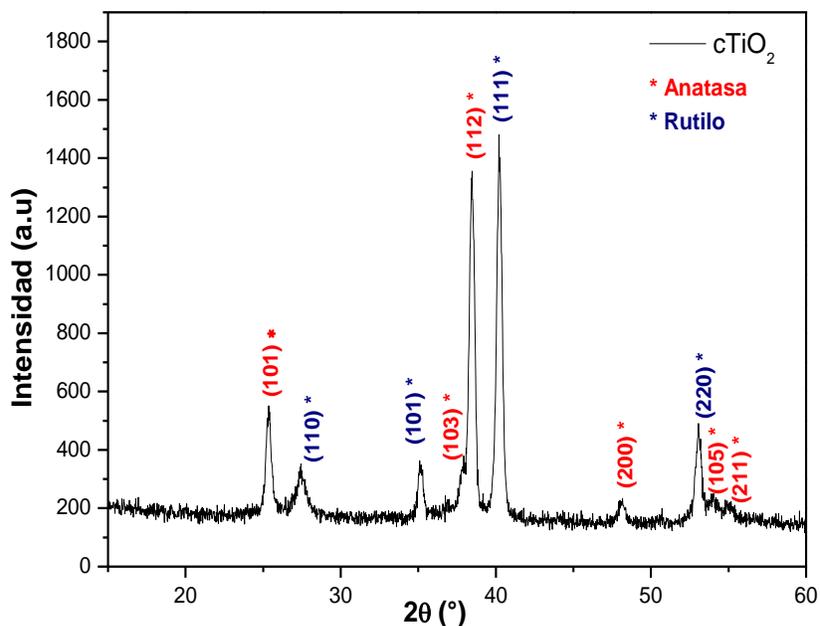


Figura 16. Patrón de difracción de rayos X de película delgada de cTiO₂.

Respecto a la película de aTiO₂, su patrón de difracción de rayos X demuestra que la película es amorfa, lo cual fue lo deseado. En la figura 17 se muestra el patrón de difracción de rayos X de la película de aTiO₂.

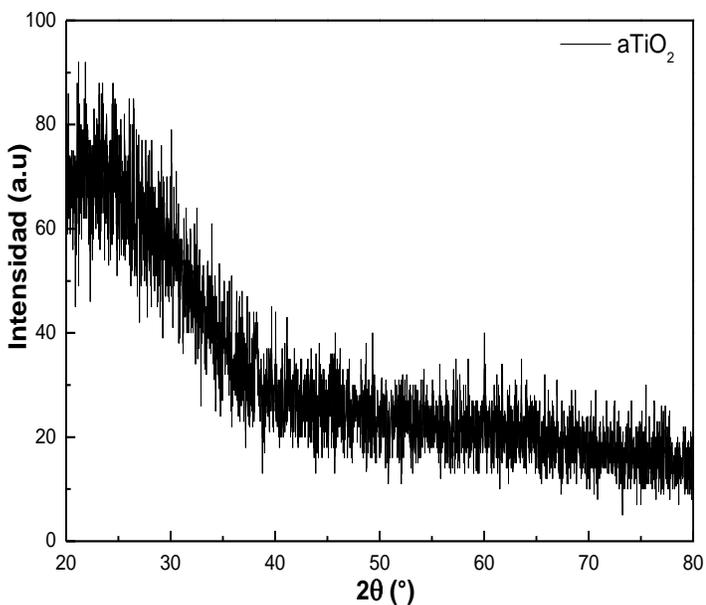


Figura 17. Patrón de difracción de rayos-X de película delgada de aTiO₂.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de las muestras antes (prístinas, P) y después (tratadas, T) del tratamiento con H₂O₂ que simula a la respuesta inflamatoria.

6.2 Cuantificación de la composición química en superficies

La composición química en la superficie de los diferentes materiales se obtuvo mediante espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS, siglas en inglés).

En la figura 18 se muestra los espectros de XPS de alta resolución del cpTi prístino (cpTi-P) y del cpTi tratado (cpTi-T).

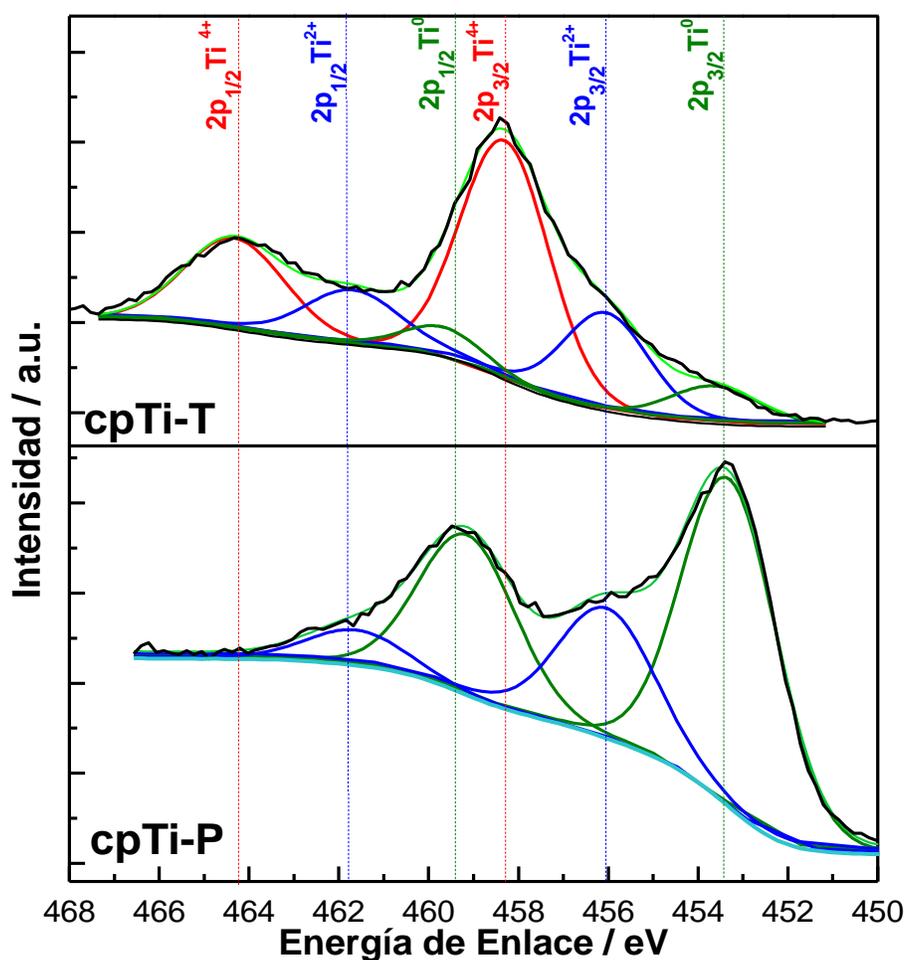


Figura 18. Espectros de alta resolución de XPS del cpTi-P y del cpTi-T.

De manera general, se observan cambios importantes en la composición química después del tratamiento con H₂O₂. En el cpTi-P se observan picos correspondientes a fotoelectrones de Ti⁰ 2p_{1/2} y Ti⁰ 2p_{3/2} (75% del total del área del

espectro comprendido de 468 a 450 eV). Además se observan otros picos correspondientes a fotoelectrones de $Ti^{2+} 2p_{1/2}$ y $Ti^{2+} 2p_{3/2}$ (25% restante del área del espectro analizado). De acuerdo a los resultados mostrados en el espectro de XPS de alta resolución, es claro que en el cpTi-P la película de óxido nativa formada es muy delgada, inferior a 10 nm (considerando la sensibilidad del equipo de XPS) que permitió el paso de fotoelectrones del Ti metálico. Por lo tanto, dado que el estado de oxidación observado para el Ti es el +2 se puede establecer que la capa de óxido de Ti nativa que creció espontáneamente en el cpTi corresponde a un óxido de Ti no estequiométrico, TiO_x , no al TiO_2 .

En la figura 19 se observa la conformación propuesta para el óxido nativo en la superficie de cpTi-P cuando se realizó su medición con XPS.

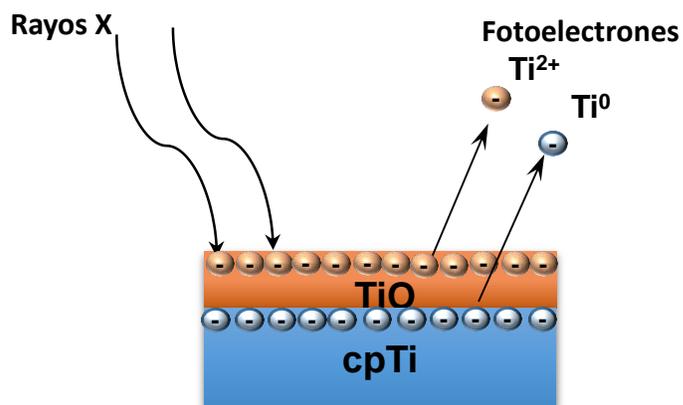


Figura 19. Esquema de la conformación propuesta para el óxido nativo en la superficie de cpTi-P durante la medición con XPS en el cpTi-P.

Un resultado similar ha sido encontrado por McCafferty et al. el cpTi expuesto a condiciones atmosféricas estándar genera una capa de óxido estequiométrico (TiO_2) de 8.0 nm de espesor. Sin embargo, cuando este metal se coloca en condiciones de ultra alto vacío (cámara de un equipo de XPS) y es bombardeado por 3 keV de iones de argón su capa de TiO_2 se modifica siendo reducida de TiO_2 a Ti_2O_3 que a su vez es reducido a TiO [123].

De acuerdo al espectro de alta resolución de XPS del cpTi-T, se observan tres picos diferentes, los cuales corresponden a fotoelectrones de $Ti^0 2p_{1/2}$ y $Ti^0 2p_{3/2}$ (11% del área del espectro de 468-453 eV), a fotoelectrones de $Ti^{4+}2p_{1/2}$ y $Ti^{4+}2p_{3/2}$

(63% del área del espectro de 468 a 453 eV) y a fotoelectrones $Ti^{2+} 2p_{1/2}$ y $Ti^{2+} 2p_{3/2}$ (24% del área del espectro de 468 a 453 eV).

La aparición de Ti^{4+} en el cpTi-T, indica que la capa de óxido de Ti creció y además, corresponde a un óxido de Ti estequiométrico, TiO_2 . De modo que se propone este óxido estequiométrico creció encima de la capa del óxido nativo, TiO . En la figura 20 se propone la conformación de la película del óxido de Ti en el cpTi-T durante su medición con XPS.

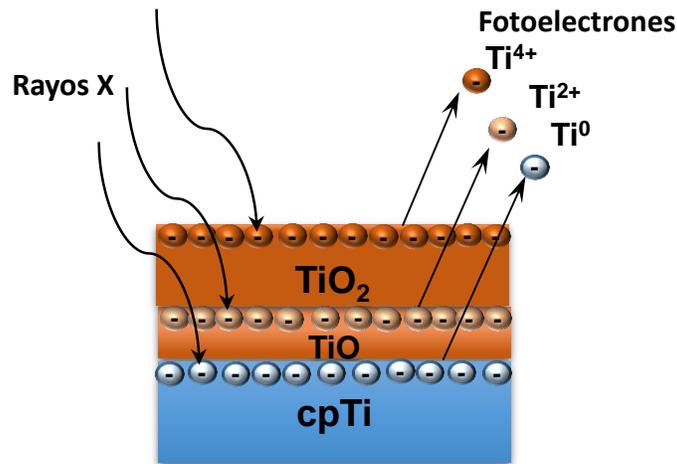


Figura 20. Esquema propuesto para la conformación de la película del óxido de Ti en el cpTi-T durante su medición con XPS.

En el caso del acero inoxidable 316L (SS, siglas en inglés), se realizó un estudio de composición química superficial en el SS prístino (SS-P) y el SS tratado (SS-T) con H_2O_2 , se mostró que la interacción del SS con el H_2O_2 modificó el espesor de la capa de óxido de cromo (III), Cr_2O_3 . Este resultado se obtuvo analizando el espectro de alta resolución de XPS correspondiente a las energías de enlace del cromo, pues este metal es el responsable de proporcionar la capa de óxido que protege la superficie de la aleación del SS. En la figura 21 se muestran los espectros de alta resolución de XPS de las energías de enlace del cromo de las muestra SS-P y de SS-T.

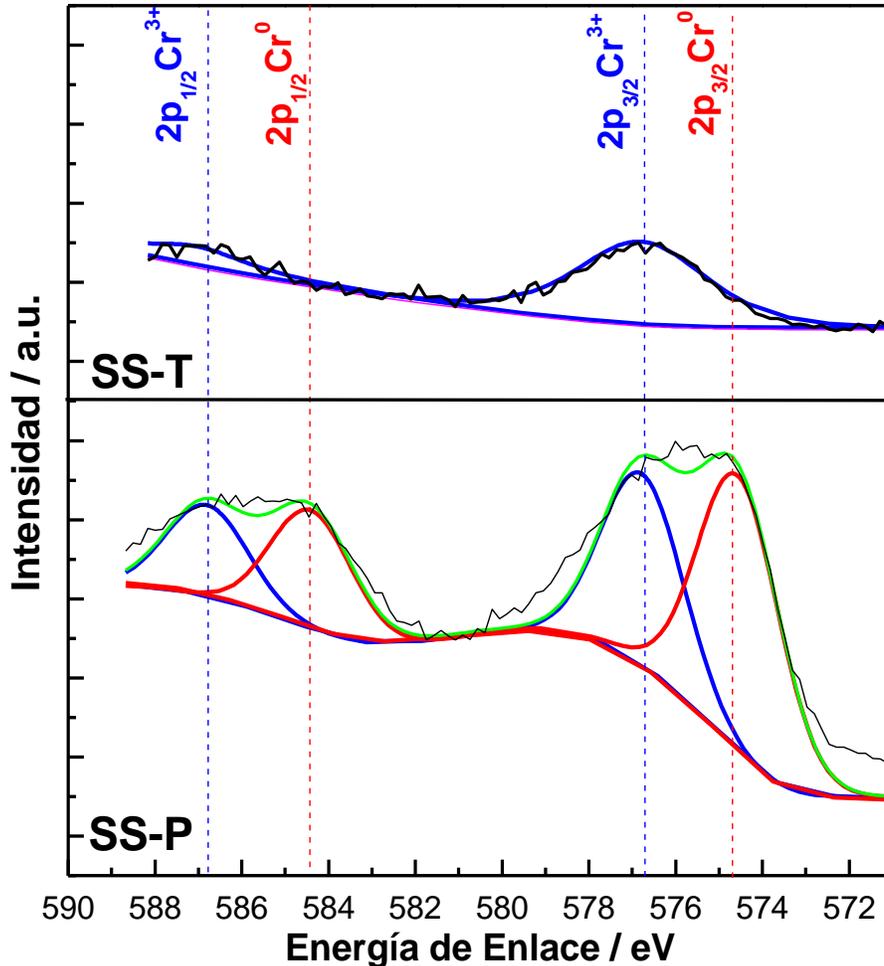


Figura 21. Espectros de XPS de alta resolución del SS-P y del SS-T.

En el espectro de alta resolución del cromo correspondiente al SS-P, se observan dos estados de oxidación el Cr^0 y el Cr^{3+} . Para el Cr^0 se detectaron fotoelectrones de $\text{Cr}^0 2p_{1/2}$ y de $\text{Cr}^0 2p_{3/2}$ (58% del área total del espectro de alta resolución comprendido de 570 a 590 eV). Para el Cr^{3+} se detectaron fotoelectrones de $\text{Cr}^{3+} 2p_{1/2}$ y de $\text{Cr}^{3+} 2p_{3/2}$ (comprenden 42% restante del área del espectro).

De acuerdo a los estados de oxidación detectados, Cr^0 y Cr^{3+} , en el SS-P hay una película de óxido de cromo estequiométrico, Cr_2O_3 , cuyo espesor es no mayor a los 10 nm (considerando la sensibilidad del equipo de XPS). El espesor propuesto para SS-P concuerda con lo investigado para un óxido de cromo crecido en un SS sometido a pulido mecánicamente [124].

En la figura 22 se muestra el esquema donde se propone la conformación de la superficie del SS-P al instante de su medición de XPS.

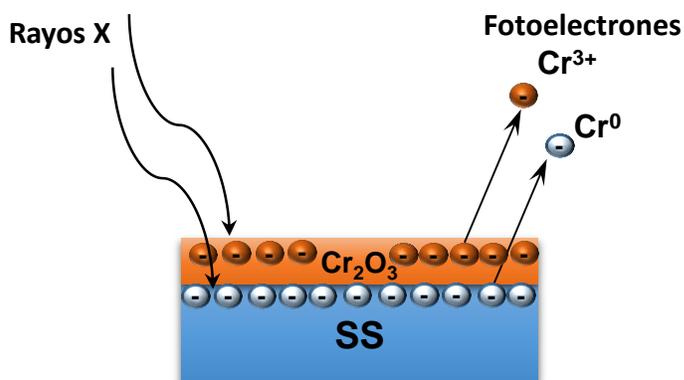


Figura 22. Esquema de la conformación de la superficie del SS-P al instante de su medición en XPS.

Respecto al espectro de XPS de alta resolución del SS-T que corresponde a las energías de enlace del cromo, se observan picos correspondientes únicamente a $Cr^{3+}2p_{1/2}$ y $Cr^{3+} 2p_{3/2}$, lo cual nos indica que la capa de Cr_2O_3 creció, ya no fue detectado el cromo metálico (Cr^0). En la figura 23 se muestra el esquema propuesto para la conformación de la superficie del SS-T al instante de su medición de XPS.

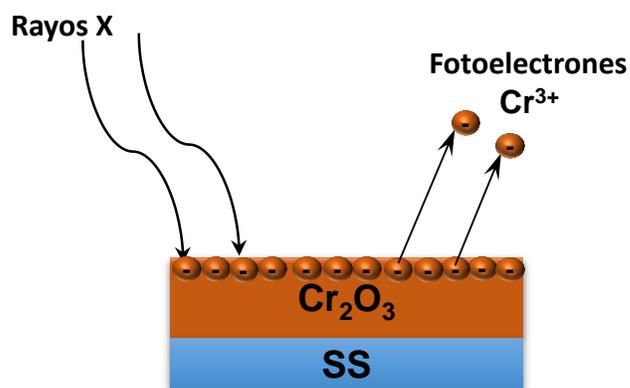


Figura 23. Esquema propuesto para la conformación de la superficie del SS-T al instante de su medición en XPS.

En las películas de $cTiO_2$ y de $aTiO_2$ no se observan cambios en la composición química debidos al tratamiento con la solución de respuesta inflamatoria simulada.

En la figura 24 se muestran los espectros de XPS de alta resolución de la película de $\text{cTiO}_2\text{-P}$ y de la película de $\text{cTiO}_2\text{-T}$. En el caso de la película cTiO_2 , se muestra que en ambos espectros, antes y después del tratamiento con H_2O_2 , hay dos estados de oxidación en Ti, el Ti^{2+} y Ti^{4+} , los cuales corresponden a picos de fotoelectrones de $\text{Ti}^{2+} 2p_{1/2}$ y $\text{Ti}^{2+} 2p_{3/2}$ (representan el 77% del área total del espectro de alta resolución comprendido de 468 a 453 eV), y fotoelectrones de $\text{Ti}^{4+} 2p_{1/2}$ y $\text{Ti}^{4+} 2p_{3/2}$ (representan el 23% del área total del espectro de alta resolución comprendido de 468 a 453 eV).

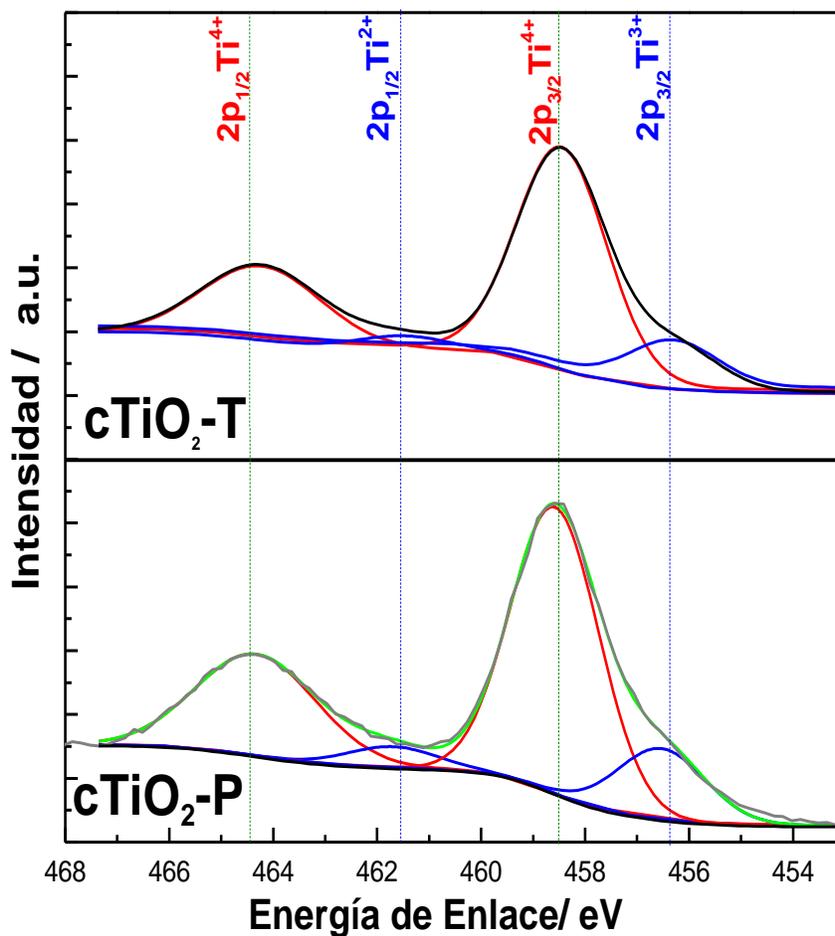


Figura 24. Espectros de XPS de alta resolución de la película de $\text{cTiO}_2\text{-P}$ y la película de $\text{cTiO}_2\text{-T}$.

Los estados de oxidación detectados en la película de $cTiO_2$ -P y de $cTiO_2$ -T corresponden a dos óxidos de Ti, los cuales son un óxido de Ti no estequiométrico, TiO , y un óxido de Ti estequiométrico TiO_2 que es el más abundante dentro de la película. En la figura 25 se muestra la propuesta de la medición de XPS en la película de $cTiO_2$ -P y de $cTiO_2$ -T.

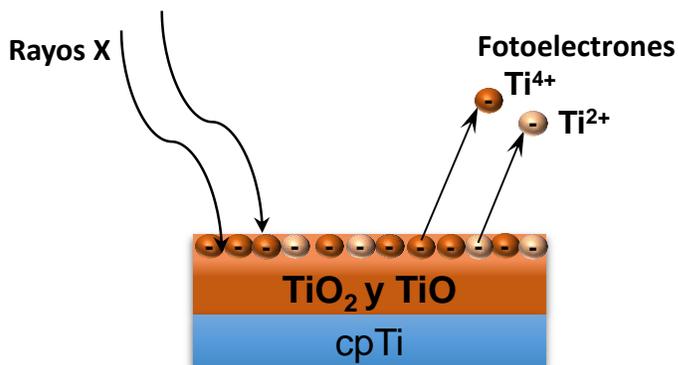


Figura 25. Esquema de la medición de XPS en la película $cTiO_2$ -P y película $cTiO_2$ -T.

En la figura 26 se muestran los espectros de XPS de alta resolución de la película de $aTiO_2$ -P y de $aTiO_2$ -T. En esos espectros se observa como en $aTiO_2$ -P y $aTiO_2$ -T se identifican picos característicos de fotoelectrones de un solo estado de oxidación correspondiente a $Ti^{4+} 2p_{1/2}$ y $Ti^{4+} 2p_{3/2}$ los cuales corresponden a una película de óxido de titanio estequiométrico, TiO_2 .

En la figura 27 se muestran la propuesta de las capas superficiales obtenidas de acuerdo a la medición de XPS en las películas de $aTiO_2$ -P y de $aTiO_2$ -T.

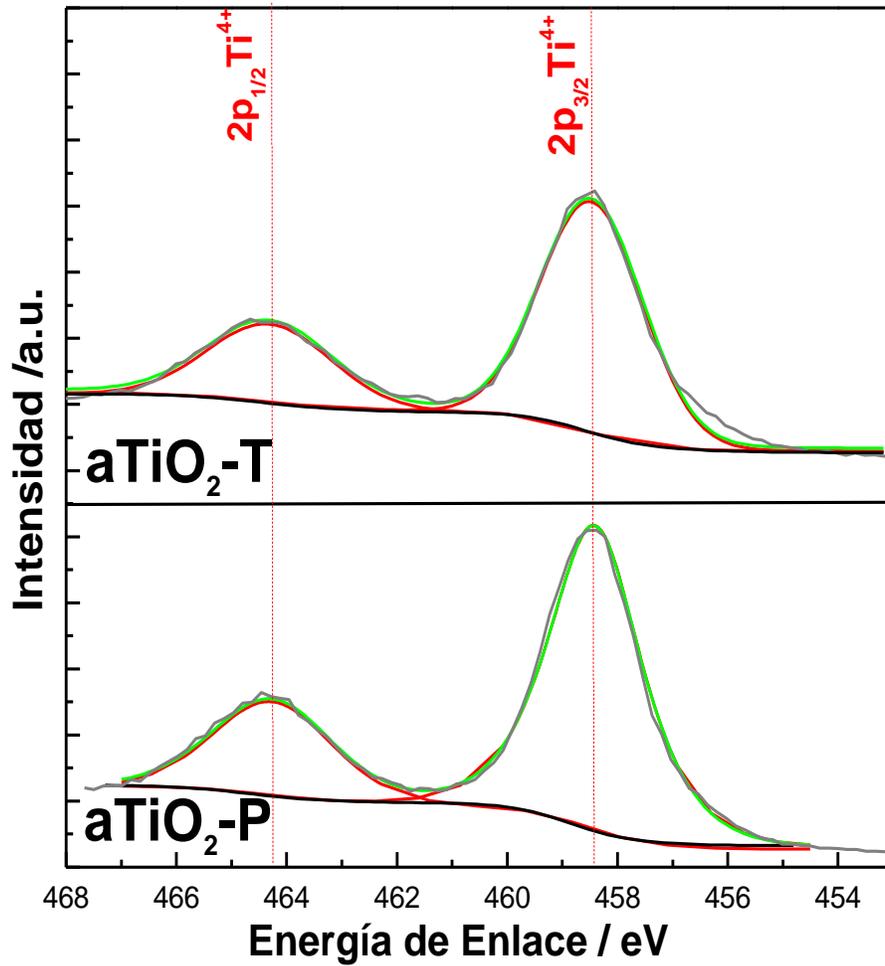


Figura 26. Espectros de XPS de alta resolución de la película de aTiO₂-P y la película de aTiO₂-T.

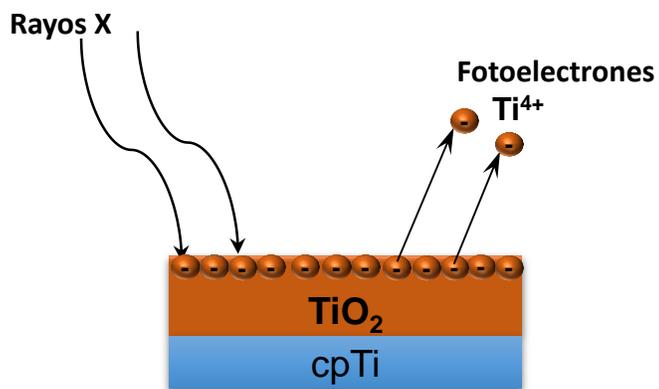


Figura 27. Esquema de la medición de XPS en las películas de aTiO₂-P y de aTiO₂-T

6.3 Análisis de la morfología, topografía

Cómo se mostró en el estudio de composición química de las superficies del cpTi y del SS hay un incremento en la capa de óxido en su superficie, esto ocasionado por su tratamiento con H₂O₂. Sin embargo, en las películas delgadas de cTiO₂ y de aTiO₂ no se encontraron cambios en la composición química.

La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para realizar un análisis de morfología. El análisis de topografía se realizó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y para análisis de rugosidad se utilizaron AFM y perfilometría.

La morfología en las superficies metálicas de cpTi y de SS se modificó como efecto del tratamiento, mientras que para las películas cTiO₂ y de aTiO₂ no se detectan cambios visibles.

La superficie prístina de cpTi se muestra en la figura 28(a). En ella se observa que este material tiene una topografía homogénea sin protuberancias o picos que sobresalgan de la superficie, pero, después del tratamiento, figura 28 (b), se observa un cambio en la topografía, pues la superficie muestra regiones en forma de prominencias o domos. Este cambio coincide con lo investigado por Jean **P. Beringer et al.** pues ellos mencionan que el cpTi desarrolló domos tras estar en la inmersión y estos domos son asociados a la formación del óxido en la superficie [40].

En relación al SS se observan pocas modificaciones en la superficie, antes del tratamiento, figura 28(c), se observa una superficie muy lisa donde se aprecian líneas asociadas al pulido mecánico al que se sometió la muestra. El SS-T, se observa en la figura 28(d) en esta superficie difícilmente se observa la formación de granos que sobresalen en la superficie.

El cambio logrado en la morfología del cpTi y del SS se asocia al crecimiento de la capa de óxido en ambas superficies, en el cpTi-T los domos tienen un radio de 20-40 nm, mientras que para SS-T son domos con radios más pequeños que van de los 10-20 nm.

Para las películas del $c\text{TiO}_2$ se observa un cambio ligero en la morfología de la película antes y después figuras 28(e) y (f), en ambos casos se observan granos en el intervalo entre 30 a 70 nm, estos granos se distribuyen homogéneamente a lo largo de la película, aunque su orientación parece diferente. Sin embargo, no es del todo claro si la diferente orientación es un cambio originado por el tratamiento con la respuesta inflamatoria simulada, o más bien es una diferencia entre las muestras evaluadas, ya que en este caso no se utilizó la misma muestra antes y después de observarla en SEM.

De forma similar, en las películas de $a\text{TiO}_2$ no observaron cambios sustanciales en la morfología que puedan ser asociados a su interacción con H_2O_2 , esto se puede verificar en las figuras 28(g) y 28(h). La morfología en estas películas es granulada pero, la distribución de los granos no es homogénea, el tamaño de los granos varía y va desde los 10 nm hasta los 80 nm.

La morfología que muestran las películas de $c\text{TiO}_2$ y de $a\text{TiO}_2$ coincide con lo investigado anteriormente por Argelia Almaguer Flores et al donde se puede observar que en la película de $c\text{TiO}_2$ hay un menor tamaño de grano con respecto a la película de $a\text{TiO}_2$ [84].

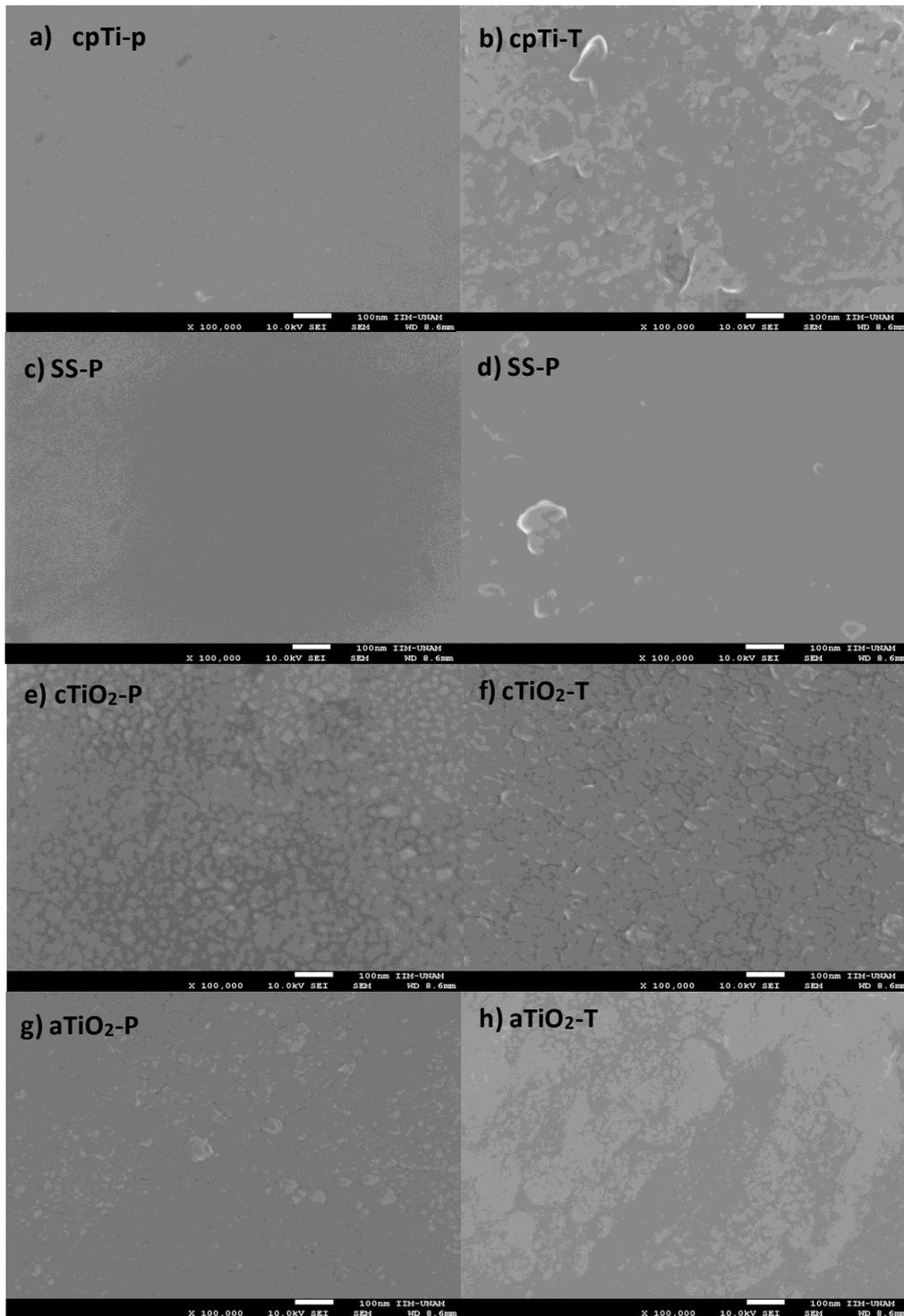


Figura 28. Micrografía de SEM, (a) cpTi-P (b) cpTi-T, (c) SS-P, (d) SS-T, (e) cTiO₂-P, (f) cTiO₂-T, (g) aTiO₂-P y (h) aTiO₂-T.

La técnica de AFM aporta un mejor contraste topográfico de la superficie de una muestra, pues oscurece las partes más bajas de la superficie mientras que las partes más altas las aclara y además se obtiene una medida directa de la altura. Por lo tanto, con esta técnica es posible obtener características de la superficie relacionadas con la topografía.

Como resultado, la técnica de AFM puede enriquecer la información proporcionada por SEM. En la figura 29 se muestran las micrografías 3D obtenidas mediante AFM, en un área de $5 \times 5 \mu\text{m}$.

En el cpTi muestra modificación de la topografía después del tratamiento con la respuesta inflamatoria simulada. En la figura 29(b) cpTi-T se observan elevaciones o picos que ya se habían observado en SEM, mientras que en el cpTi antes del tratamiento, figura 29(a) cpTi-P, se observa una topografía homogénea, la cual es muy lisa, aunque muestra algunas líneas o rayones que relacionamos con el pulido mecánico. Sin embargo, en el cpTi-T desaparecen las líneas, lo cual se relaciona al crecimiento del óxido en la superficie del cpTi-T.

En el caso del SS, se observan pocos cambios en la topografía después del tratamiento con la respuesta inflamatoria simulada, en el SS sin tratamiento, figura 29(c) SS-P, se observan picos que también están en el SS tratado, figura 29(d) SS-T, estos picos son relacionados al pulido de la superficie y la presencia del Cr_2O_3 .

Para las películas de cTiO_2 y de aTiO_2 , no se observan cambios en la topografía, tras el tratamiento. Además, no es clara la diferencia entre la topografía de la película cTiO_2 y la película aTiO_2 , en las figuras 29 (e) cTiO_2 -T, (f) cTiO_2 -T, (g) cTiO_2 -T y (h) cTiO_2 -T.

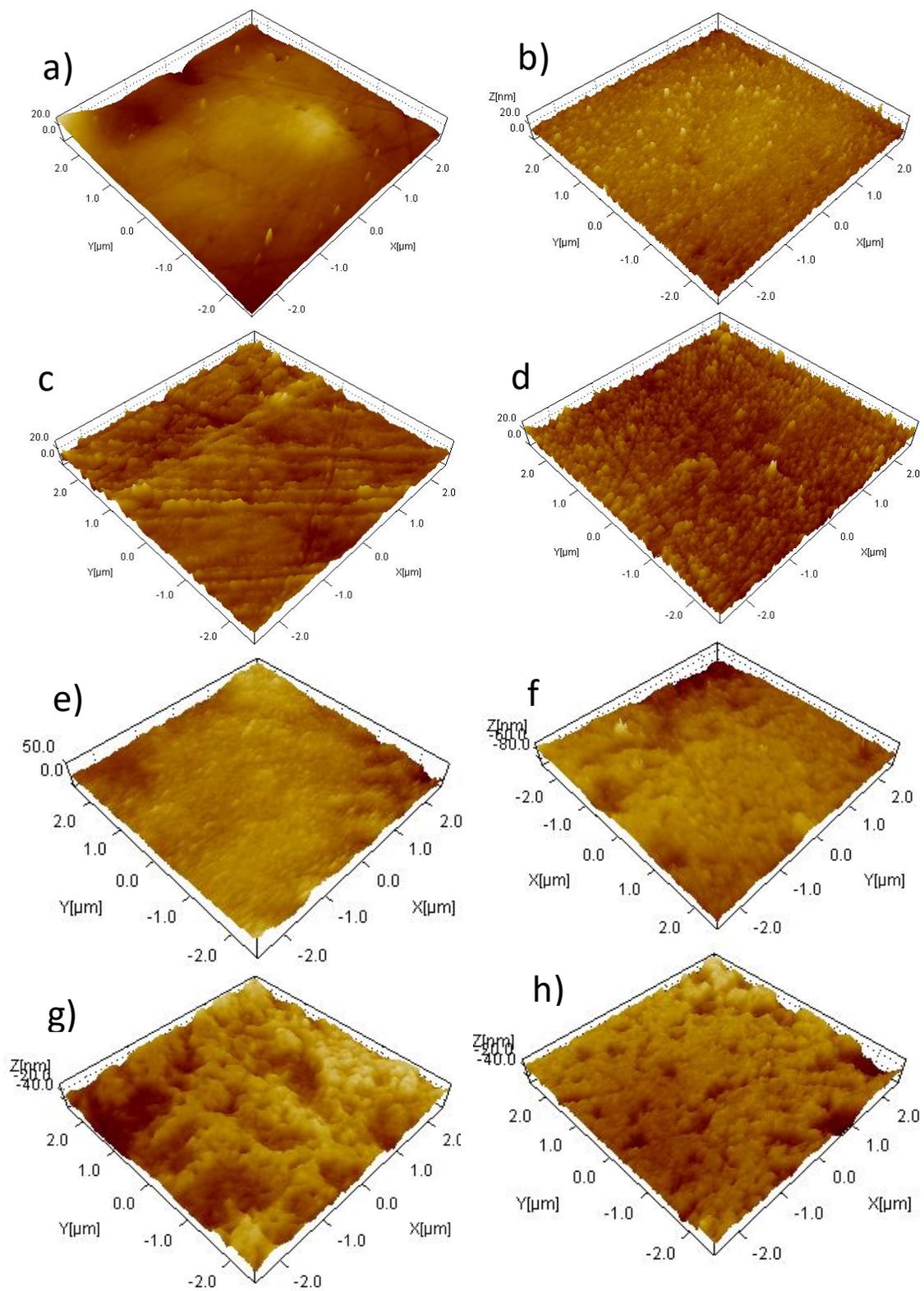


Figura 29. Imágenes 3D de AFM, a) cpTi-P, b) cpTi-T, c) SS-P, d) SS-T, e) cTiO₂-P, f) cTiO₂-T, g) aTiO₂-P y h) aTiO₂-T.

6.4 Análisis de rugosidad

El análisis de rugosidad se realizó mediante dos técnicas de caracterización. Esto con la finalidad de obtener una visión más amplia de la rugosidad en diferentes dimensiones. En AFM se hicieron mapeos de 5 x 5 μm y con perfilometría de contacto se realizaron barridos lineales de 250 μm . Las rugosidades obtenidas se muestran en la tabla 4. El análisis de rugosidad se hizo de manera cuantitativa; se evaluó la rugosidad media (**Ra**) y la rugosidad cuadrática media (**Rq**), esta rugosidad es usualmente la más utilizada. En este estudio de rugosidad se realizó un análisis estadístico donde se utilizó una significancia de $p < 0.05$.

La tabla 5 presenta los valores de las rugosidades, Ra y Rq en los distintos materiales de estudio.

Material	AFM (5 x 5 μm)		Perfilometría (250 μm)	
	Ra (nm)	Rq (nm)	Ra (nm)	Rq (nm)
cpTi-p	1.47 \pm 0.21	1.90 \pm 0.29	35.74 \pm 1.31	44.98 \pm 1.59
cpTi-T	3.43 \pm 0.02	4.60 \pm 0.11	63.22 \pm 2.93	83.43 \pm 3.68
SS-P	1.55 \pm 0.59	2.19 \pm 0.79	4.11 \pm 0.36	4.96 \pm 0.637
SS-T	2.62 \pm 0.42	2.91 \pm 0.32	7.2 \pm 0.85	10.33 \pm 1.53
cTiO ₂ -P	7.44 \pm 0.63	9.44 \pm 1.94	47.59 \pm 1.72	57.26 \pm 1.96
cTiO ₂ -T	9.57 \pm 1.77	13.55 \pm 0.65	53.82 \pm 3.29	65.11 \pm 2.84
aTiO ₂ -P	8.34 \pm 3.09	10.43 \pm 3.3	37.48 \pm 1.42	47.86 \pm 1.76
aTiO ₂ -T	7.38 \pm 1.08	9.45 \pm 1.09	41.39 \pm 1.61	55.63 \pm 2.52

Tabla 5. Rugosidades Ra y Rq medidas mediante AFM y perfilometría, $p < 0.05$.

Las rugosidades de las muestras prístinas obtenidas en AFM y perfilometría de contacto son pequeñas. Esto es consecuencia del pulido hasta acabado espejo que tuvieron las muestras del cpTi, del SS y los substratos de las películas de cTiO₂ y de aTiO₂.

El acabado espejo en las superficies era necesario debido a que los cambios que se generan en la superficie de los materiales a causa del tratamiento con la

respuesta inflamatoria simulada eran muy sutiles, de modo que era más fácil observar los cambios de topografía en una superficie pulida que en una rugosa.

En el caso del cpTi, la rugosidad se incrementó al doble después del tratamiento y este resultado es estadísticamente significativo. Este cambio de rugosidad es resultado del cambio de topografía. En la figura 28 se muestra gráficamente los cambios en las rugosidades Ra y Rq medidas por perfilometría de contacto para el cpTi-P y el cpTi-T.

Para el SS, la rugosidad no tiene cambios estadísticamente significativos después del tratamiento con la respuesta inflamatoria simulada. Esto es congruente con sus pocos cambios en la topografía, visto en AFM. En la figura 30 se muestran las gráficas de las rugosidades Ra y Rq determinadas por perfilometría de contacto para el SS-P y el SS-T. Puede observarse que hay una tendencia a aumentar, pero que los cambios no son significativos.

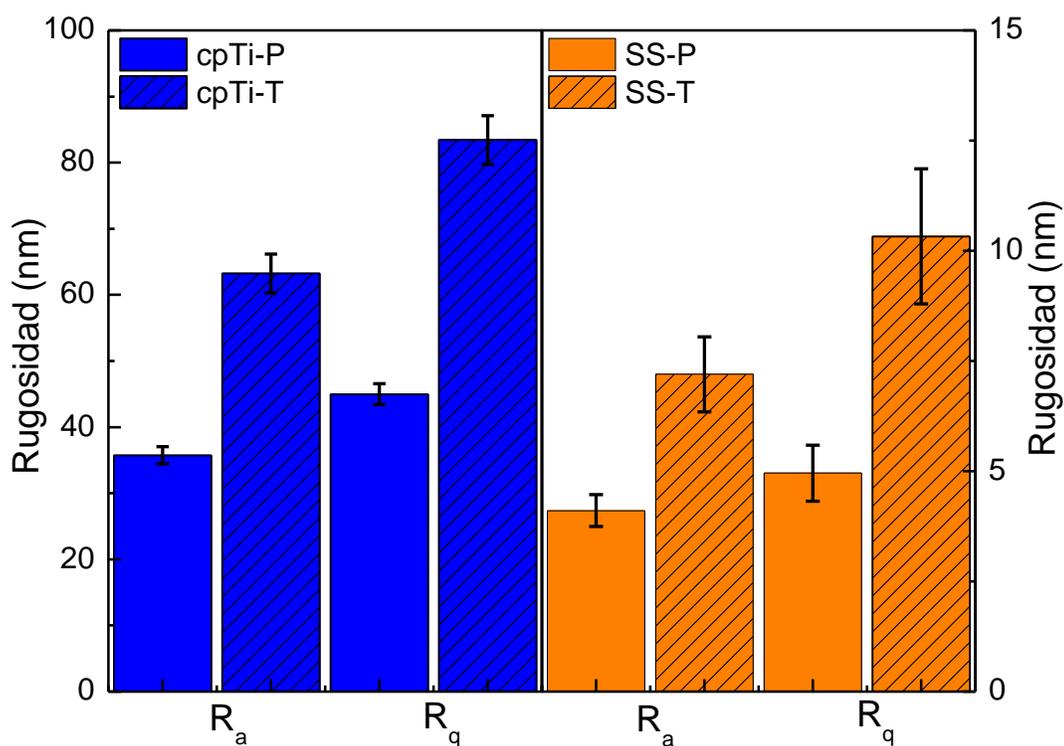


Figura 30. Rugosidades Ra y Rq determinadas por perfilometría de contacto para el cpTi-P, el cpTi-T, el SS-P y el SS-T, $p < 0.05$.

Para las películas delgadas de cTiO₂ y de aTiO₂ no hay cambios estadísticamente significativos en la rugosidad. Sin embargo, en comparación con los metales ambas películas tienen una mayor rugosidad. Esto es debido a que la película aporta rugosidad al material. En la figura 31 se muestran las gráficas de las rugosidades Ra y Rq determinadas por perfilometría de contacto para las películas de cTiO₂-P, de cTiO₂-T, de aTiO₂-P y de aTiO₂-T. Nuevamente se observa una tendencia a aumentar, pero dicho cambio no fue estadísticamente significativo.

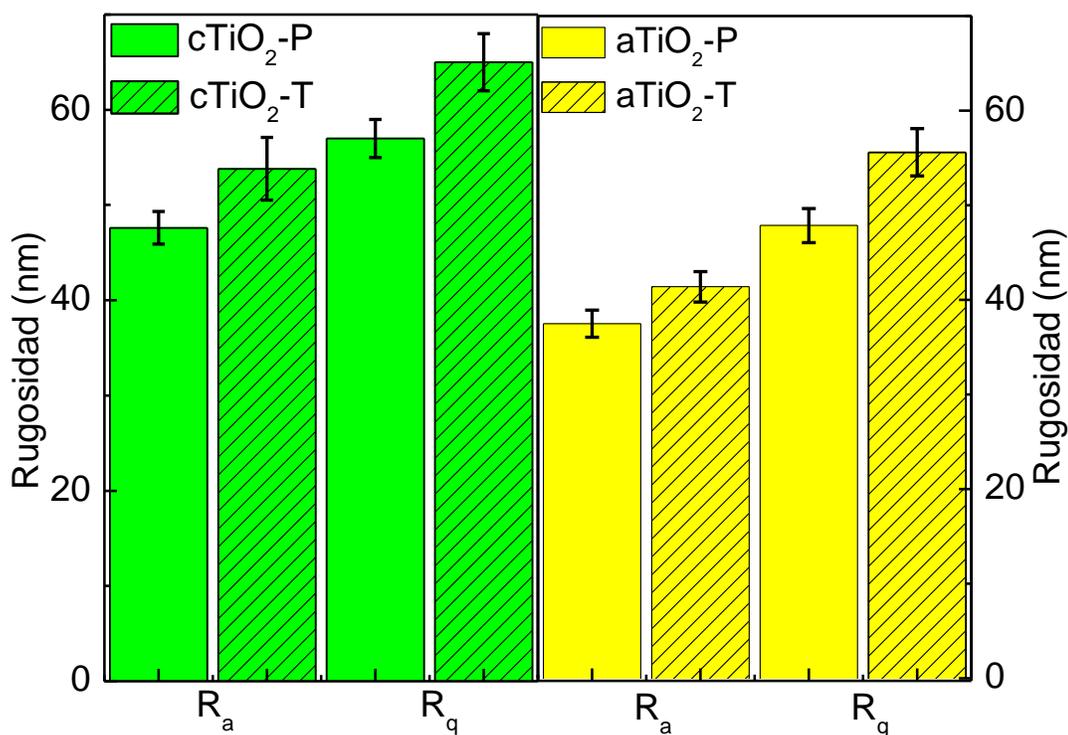


Figura 31. Rugosidades Ra, Ra determinadas por perfilometría de contacto para las películas de cTiO₂-P, de cTiO₂-T, de aTiO₂-P y de aTiO₂-T, p<0.05.

6.5 Ángulo de contacto con agua

Cómo se muestra en la figura 32, las superficies del cpTi, del SS, película de cTiO₂ y película de aTiO₂ tienen una disminución en el ángulo de contacto después del tratamiento con la respuesta inflamatoria. Este resultado indica que después del tratamiento se incrementó la mojabilidad de los materiales.

En el cpTi su ángulo de contacto pasó de 61.5° ± 1.5° a 36.2° ± 2.5°. En el SS, la modificación fue menor, de 62.2° ± 0.7 a 50.5° ± 0.5°. En la película de cTiO₂ el

ángulo paso de $64.3 \pm 1.5^\circ$ a $33.1^\circ \pm 0.9^\circ$, finalmente en la película de aTiO₂ disminuyó de $62.1^\circ \pm 3.3^\circ$ a $43.75^\circ \pm 0.6^\circ$.

En todos los materiales se observó un ángulo de contacto inferior a los 65°, por lo tanto, su mojabilidad fue alta, es decir se consideran como superficies hidrofílicas. Incluso, después del tratamiento con H₂O₂; la mojabilidad fue mayor, lo que ocasiona que los materiales aumenten su hidrofiliidad.

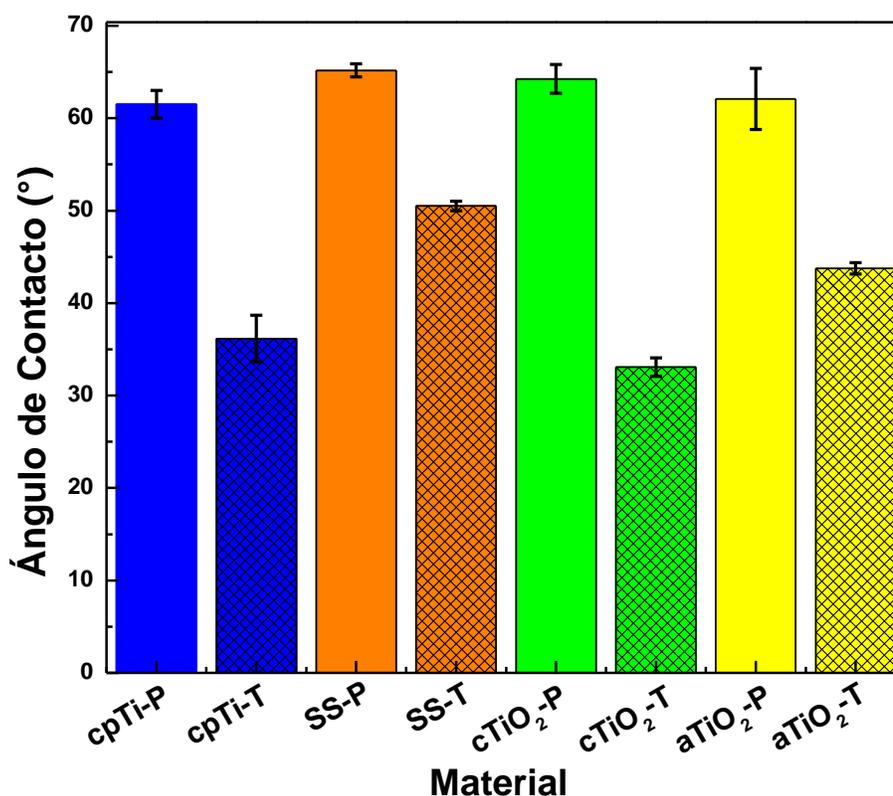


Figura 32. Ángulo de contacto para determinación de la mojabilidad en las diferentes superficies, $p < 0.05$.

6.6 Determinación de la energía de superficie

La ecuación de Van Oss Chaudhury Good (VCG) se utilizó para determinar los componentes de la energía total de superficie. Esta ecuación se basa en la teoría ácido/base de Lewis, donde hay transferencia de un protón entre la superficie y la solución.

El comportamiento hidrofóbico o hidrofílico de un material está determinado por su componente ácida/básica. Es decir, el material es hidrofílico cuando tiene una componente básica grande [70].

Respecto a la energía libre superficial, en la tabla 6 se muestran los valores de los materiales. Después del tratamiento con H₂O₂ la mayoría de los materiales mostraron un aumento en su energía libre superficial total. Sin embargo, en el SS la energía total disminuyó.

El incremento o disminución en la energía de superficie total, para el caso de las superficies aquí estudiadas, va de la mano con el incremento o disminución en la energía dispersiva, ya que esta componente es la que aporta la mayor porción a la energía total como se muestra en la ecuación 29:

$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad 29$$

Material	γ_s mJ/m ²	γ_s^{LW} mJ/m ²	γ_s^{AB} mJ/m ²	γ_s^+ mJ/m ²	γ_s^- mJ/m ²
cpTi-P	43.72 ± 0.021	37.01 ± 0.021	6.54 ± 0.025	0.59 ± 0.005	18.34 ± 0.049
cpTi-T	46.34 ± 0.035	41.56 ± 0.009	4.78 ± 0.036	0.13 ± 0.002	44.78 ± 0.083
SS-P	43.19 ± 0.010	38.07 ± 0.014	5.34 ± 0.012	0.48 ± 0.003	14.84 ± 0.022
SS-T	40.84 ± 0.023	33.15 ± 0.030	7.74 ± 0.039	0.44 ± 0.004	33.47 ± 0.031
cTiO ₂ -P	50.22 ± 0.020	42.03 ± 0.011	8.15 ± 0.020	1.44 ± 0.011	12.11 ± 0.061
cTiO ₂ -T	53.08 ± 0.018	45.60 ± 0.018	7.67 ± 0.026	0.36 ± 0.003	41.31 ± 0.033
aTiO ₂ -P	41.07 ± 0.023	38.07 ± 0.020	3.42 ± 0.028	0.14 ± 0.003	20.67 ± 0.103
aTiO ₂ -T	43.80 ± 0.027	36.20 ± 0.019	7.06 ± 0.034	0.31 ± 0.003	39.32 ± 0.036

Tabla 6. Energía de superficie total (γ_s), componente dispersiva (γ_s^{LW}), componente Polar (γ_s^{AB}), interacción ácido (γ_s^+) que es el acepta al electrón- e interacción básico (γ_s^-) que es el dona al electrón, calculada por Van Oss Chaudhury, de los diferentes materiales de estudio, p<0.05.

Sin embargo, no hay que descartar que la componente polar, aunque es menor en magnitud, es quien describe la interacción de la superficie con los líquidos como agua y proteínas.

La componente polar está integrada por la interacción básica que es γ_s^- y la interacción ácida γ_s^+ , siendo éstas componentes las que determinan el comportamiento ácido o básico de la superficie.

En todos los materiales después del tratamiento con H_2O_2 se incrementa la interacción básica, lo cual coincide con el incremento de la mojabilidad que presentaron las superficies. Un material con carácter ácido en su superficie tiene un comportamiento hidrofóbico [70]. Por lo tanto, una superficie con carácter básico tiene un comportamiento hidrofílico.

Los materiales con mayor incremento en su interacción básica son el cpTi-T y la película de cTiO₂-T, de los cuales también mostraron un menor ángulo de contacto y, por ende, mayor comportamiento hidrofílico. En la figura 33 se muestran las gráficas de la componente dispersiva (a), componente polar (b), interacción ácida (c) e interacción básica (d).

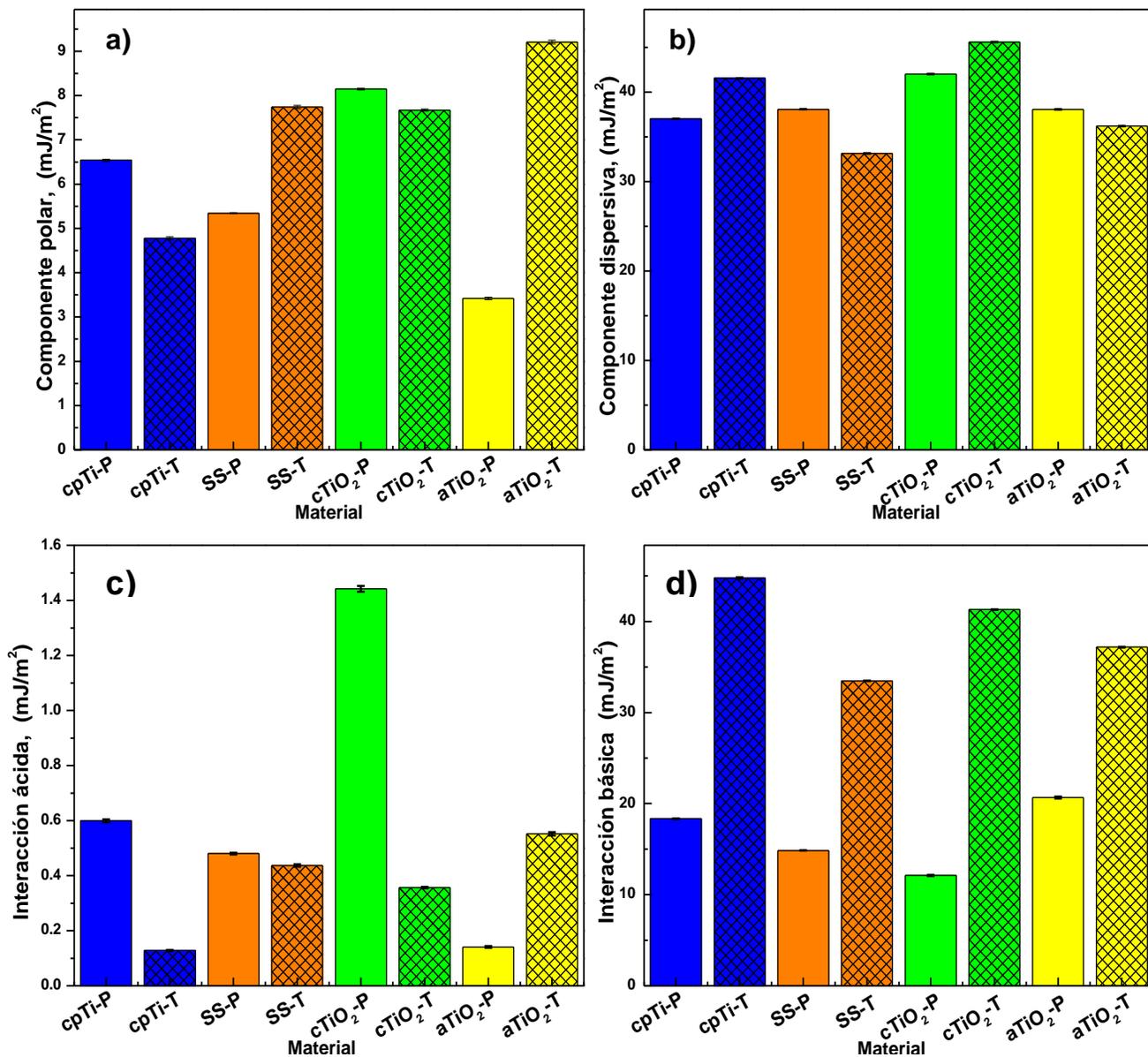


Figura 33. (a) Interacción dispersiva (γ_S^{LW}), (b) interacción polar (γ_S^{LW}), (c) componente ácido (γ_S^+) y (d) componente básico (γ_S^-) de las superficies de cpTi, de SS, de película de cTiO₂ y de película de aTiO₂ que fueron calculadas con la ecuación de Van Oss Chaudhury, $p < 0.05$.

6.7 Análisis de la carga en superficie

El punto de carga zero (pzc) es el pH al cual se tiene una carga total en superficie igual a cero. Conociendo el pzc es posible identificar la carga superficial que hay en un material a un pH dado, como lo es el pH fisiológico [83].

La importancia del análisis de pzc en biomateriales radica en comprender cómo estará cargado el biomaterial cuando es colocado *in vivo*, donde de manera general el pH fisiológico es neutro, va de 7~7.4.

Como se puede ver en la gráfica 34, todos los materiales el cpTi, el SS, película de cTiO₂ y película de aTiO₂ después del tratamiento con la respuesta inflamatoria tienen un pzc mayor. El pzc del cpTi va de pH 6.24 a 6.86, en el SS de 7.30 a 7.61, para la película de cTiO₂ de 5.59 a 6.79 y para la película de aTiO₂ de 4.44 a 6.84.

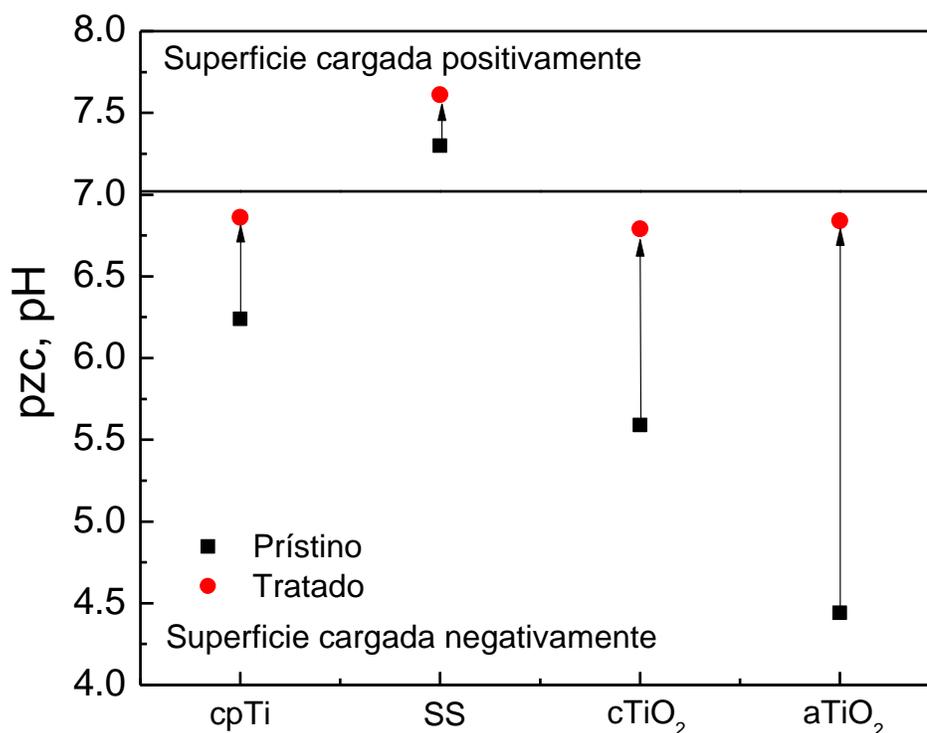


Figura 34. Gráfica ilustrativa del cambio de pzc en las superficies de cpTi, de SS, película de cTiO₂ y película de aTiO₂, antes y después del tratamiento *in vitro* de la condición inflamatoria.

El incremento del pzc en todos los materiales después de su tratamiento con el H₂O₂, concuerda con el incremento de su carácter básico, después de su tratamiento con el H₂O₂. Esto quiere decir, a un mayor carácter básico (donador de electrón) en el material, hay una carga superficial más positiva. Por lo tanto, cuando el material se coloca en un ambiente acuoso, para compensar el incremento de carga positiva se requiere de mayor adsorción de carga negativa, la cual está

contenida en grupos hidroxilo (OH^-), esto involucra que haya un incremento en el pH al cual la superficie alcance su pzc.

En pH fisiológico (7.0-7.4) el cpTi, la película de cTiO_2 y la película de aTiO_2 sin tratamiento tienen una carga negativa en su superficie, mientras que el SS tiene carga casi neutra. Después del tratamiento, la situación cambia, ya que el cpTi y las películas están muy cerca de la neutralidad, mientras que la carga positiva en el SS se incrementa. Esta diferencia en la carga de superficie entre el SS y el cpTi, la película de cTiO_2 y la película de aTiO_2 sugiere que habrá una interacción diferente de la superficie con el agua, las proteínas y las células.

De acuerdo con Silverthorn, una célula en reposo tiene un potencial de -70 mV [125], de modo que al acercarse la célula a la superficie del SS tratado, la interacción electrostática es atractiva, mientras que para el cpTi-T, la película de cTiO_2 -T y la película de aTiO_2 -T la interacción electrostática es casi nula.

6.8 Análisis de la respuesta electroquímica de los materiales

6.8.1 Potencial a circuito abierto

El potencial a circuito abierto se registró a lo largo de 1800 segundos con la finalidad de comprender dos fenómenos:

1. Determinar la estabilización de la muestra en un intervalo específico de tiempo.
2. Determinar si el potencial crece o disminuye después del tratamiento, esto es asociado a la liberación de iones del material, lo cual va directamente relacionado con la corrosión del mismo.

En las figuras 35 y 36, se pueden observar los OCP de las muestras antes y después del tratamiento, todas las muestras a los 300 segundos ya se encontraban estables, esto indica que las superficies son homogéneas lo cual concuerda con lo visto en SEM y AFM, donde se observó que las superficies tienen una topografía homogénea y la rugosidad promedio no es muy alta, se encuentra en escala nanométrica.

Por otro lado, todas las muestras tuvieron un incremento en su OCP después del tratamiento con H_2O_2 , al tiempo de 1800 segundos, en el caso del cpTi este incrementó de -57 mV a +51 mV, el SS incrementó de -24 mV a +63 mV.

De manera general, en la figura 35 se observa que tanto en el cpTi como para el SS se presentó un comportamiento más pasivo después del tratamiento con H_2O_2 . Lo cual se relaciona con el crecimiento de la capa de óxido en la superficie de ambos.

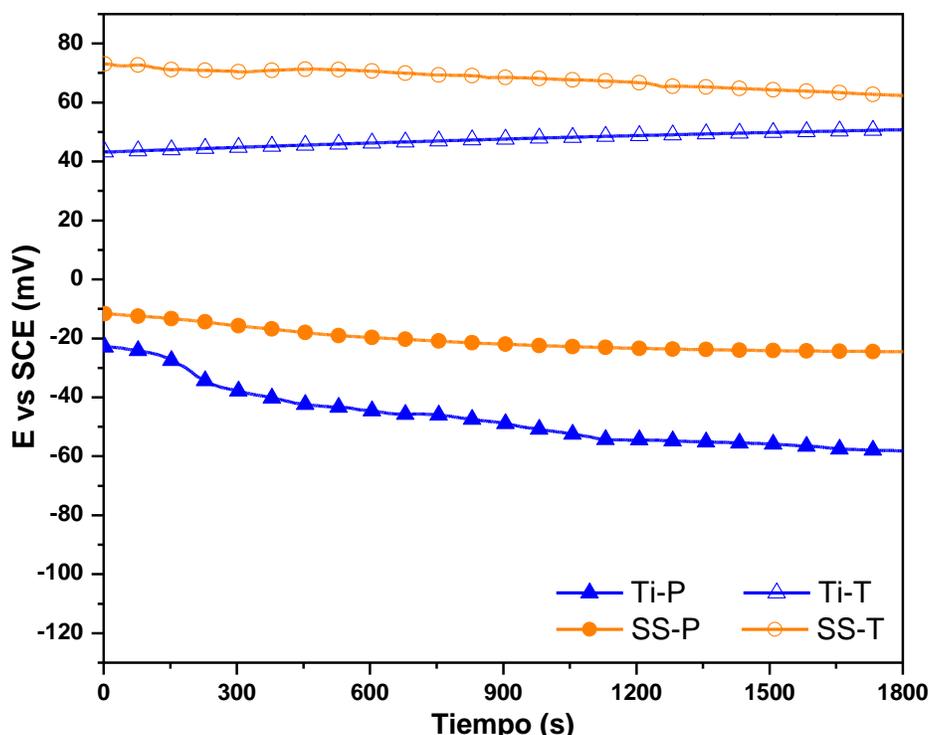


Figura 35. Gráfica de potencial a circuito abierto de las muestras de estudio

En la figura 36 se observa la película de $cTiO_2$ mostró un pequeño incremento en su OCP debido a su interacción con el H_2O_2 , sin embargo, la película de $aTiO_2$ no lo mostró, a pesar de ello, esta película es la que posee un OCP más similar a cpTi después de su tratamiento con el H_2O_2 , tal como lo muestra la figura 34. En la $cTiO_2$, el OCP en los 1800 segundos incrementó de -39 mV a -22 mV, mientras en $aTiO_2$ el OCP se mantuvo constante en los 61 mV.

Por otro lado, el OCP que mostraron ambas películas se puede interpretar como crecidas de manera homogénea, por lo tanto, recubren exitosamente al sustrato.

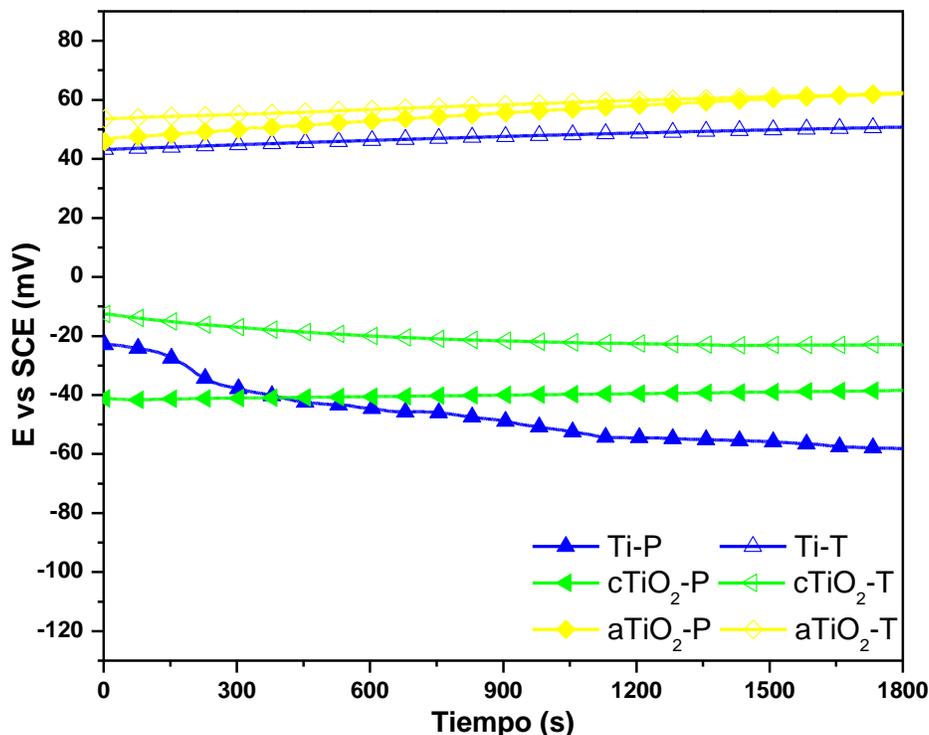


Figura 36. Gráfica de potencial a circuito abierto de las muestras de estudio.

6.8.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica

EIS es una técnica no destructiva que se realiza en condiciones de equilibrio. Por lo tanto, para lograr condiciones de equilibrio, inicialmente se registró el potencial a circuito abierto en un tiempo de 1800 segundos. Posteriormente se realizó la medición de la EIS, obteniéndose los diagramas de Bode y Nyquist de los materiales prístinos y tratados.

Para la interpretación de los resultados se utilizó el circuito eléctrico equivalente que en este trabajo de investigación se denominó CE, el cual se muestra en la figura 37. Este CE proporciona una interpretación física afín a la descripción de un material con un recubrimiento y metales que desarrollan una capa de óxido porosa [38, 126]. Además, con este CE se logró un buen ajuste a los espectros Bode y Nyquist obtenidos.

El circuito eléctrico equivalente CE, está compuesto por una resistencia a la solución R_{sol} la cual está en paralelo con una constante de fase C_C y una resistencia de poro R_{po} que a su vez se encuentra en paralelo con un nuevo sistema el cual está integrado por una constante de fase C_{cor} y una resistencia de corrosión R_{cor} .

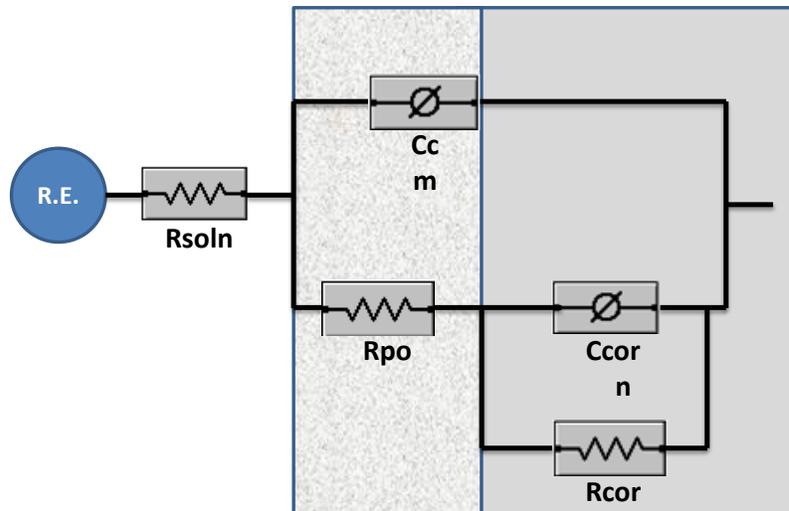


Figura 37. Circuito equivalente para un recubrimiento

Cada elemento del circuito representa una parte física del material, R_{soln} , representa la resistencia que tiene la solución, en la cual están contenida la migración de los iones del material de estudio. C_c representa la capacitancia del recubrimiento y la resistencia de poro R_{po} determina la porosidad o agrietamiento de la película. Este elemento, en el caso de los materiales de estudio, es de vital importancia, ya que nos habla de las condiciones de la película. C_{cor} es una constante de fase que representa a la doble capa formada entre el material y el electrolito. Finalmente se encuentra R_{cor} , la cual es directamente el elemento que indica la resistencia a la corrosión: para metales muestra la resistencia del metal y para recubrimientos muestra la resistencia a la corrosión del sustrato. R_{cor} es otro de los elementos de gran importancia para esta investigación.

Hay otros circuitos eléctricos equivalentes que pueden utilizarse para la interpretación de los diagramas de Bode y Nyquist. Uno de ellos es el circuito eléctrico *Randles*, el cual *González, et al.* [126-128] proponen como un modelo que describe a metales que forman una capa de óxido compacta. Sin embargo, para los materiales aquí estudiados, este circuito no mostró un buen ajuste a los diagramas de Bode y Nyquist aquí obtenidos.

6.7.2.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en cpTi

De acuerdo al diagrama de Bode del cpTi-P y del cpTi-T, que se muestra en la figura 38(a), se observa en el cpTi-T una disminución del módulo de la impedancia

a frecuencias bajas respecto al cpTi-P, lo cual indica que en la superficie hay liberación de iones de titanio.

Por otro lado, tanto en el cpTi-P como en el cpTi-T sus fases decaen a frecuencias bajas, esto es indicativo del comportamiento capacitivo del cpTi. Sin embargo, el cpTi-P es quien tiene el mayor comportamiento capacitivo. Puesto que en el cpTi-P la fase comenzó a decaer en 6400 Hz y se estabilizó en los 10 Hz y alcanzó un ángulo fase de $\sim -80^\circ$, mientras que en el cpTi-T la fase comenzó a decaer en 2500 Hz y llegó hasta los 6 Hz donde alcanzó su mínimo valor de ángulo de fase de -73° , de ahí subió a $\sim -43^\circ$. Este comportamiento capacitivo es mayor en el cpTi-P debido a que en el cpTi-T, es decir, la capa de óxido que creció es más porosa que el óxido nativo del cpTi-P.

Además, en la figura 38 (b) se observa el diagrama de Nyquist del cpTi-P y del cpTi-T. Se observa que el semicírculo (apenas va a formarse) es más pequeño en el cpTi-T que en el cpTi-P, lo cual indica que la resistencia es menor en el cpTi-T. Esto nuevamente se puede relacionar con una mayor disolución del cpTi después del tratamiento con la condición inflamatoria simulada.

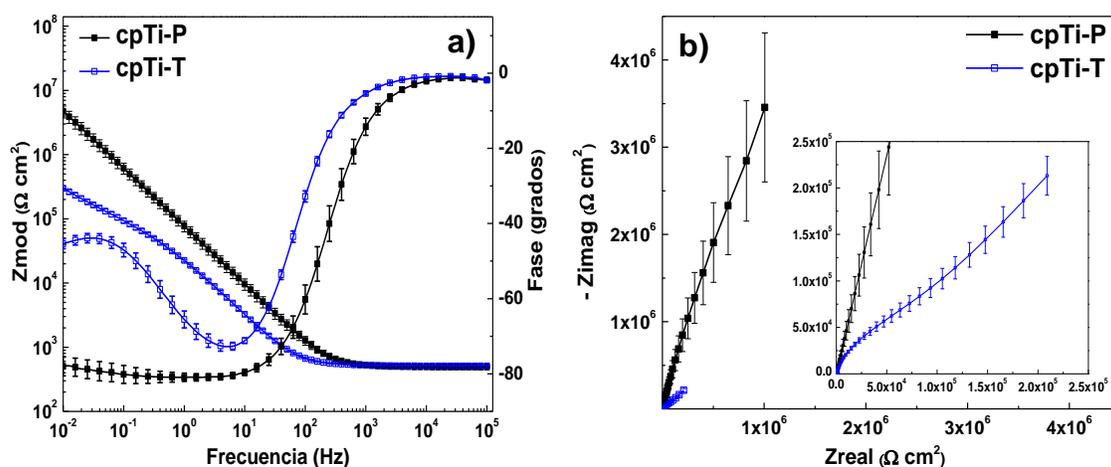


Figura 38. (a) Diagrama de Bode dle cpTi-P y del cpTi-T y (b) Diagrama de Nyquist del cpTi-P y del cpTi T.

En la tabla 7 se muestran los resultados del ajuste de los datos del cpTi-P y del cpTi-T al circuito eléctrico equivalente CE. Los resultados de la tabla 8 coinciden completamente con la interpretación gráfica de los diagramas Bode y Nyquist del cpTi-P y del cpTi-T. Comenzando con R_{s01} que aumenta en cpTi-T, esto debido a la

migración de los iones del cpTi a la solución, lo cual indica la disolución del titanio. En R_{cor} se observa que después del tratamiento, el cpTi resiste menos la corrosión. Eso debido a la liberación de iones de Ti que demuestran la superficie está reactiva. En relación a R_{po} esta se reduce en el cpTi-T, debido a que la película de óxido formada es más porosa que la formada en el cpTi-P, lo cual nos confirma que la película de óxido que crece debido al tratamiento con la repuesta inflamatoria simulada es más porosa que la capa de óxido nativa que tiene el cpTi-P.

De manera general, se observa que la superficie del cpTi es reactiva a causa del tratamiento con H_2O_2 , por lo que se liberan iones de Ti los cuales son utilizados para el crecimiento de una capa de óxido de titanio porosa.

Parámetro	cpTi-P	cpTi-T	Unidades
R_{soln}	490.9 ± 5	513.83 ± 4	$\Omega \text{ cm}^2$
R_{cor}	$1.03E8 \pm 1.4E7$	$2.08E6 \pm 4.9E5$	$\Omega \text{ cm}^2$
R_{po}	$8.7E5 \pm 3.8E5$	$6.7E4 \pm 1.6E4$	$\Omega \text{ cm}^2$
C_{cor}	$4.4E-4 \pm 1.9E-7$	$1.47E-5 \pm 1.2E-6$	$S^*s^{\wedge}m$
N	$808E-3 \pm 42E-3$	$626E-3 \pm 42E-3$	
C_c	$2.39E-6 \pm 5.02E-7$	$7.09e-6 \pm 3.4E-7$	$S^*s^{\wedge}m$
M	$932E-3 \pm 10.9E-3$	$920E-3 \pm 3.7E-3$	

Tabla 7. Resultados del ajuste de datos del cpTi-P y del cpTi-T al circuito equivalente.

6.7.2.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en SS

Los diagramas de Bode y Nyquist del SS-P y del SS-T se observan en la figura 39 (a) y (b), respectivamente. En ambos diagramas se observa que el tratamiento no modifica significativamente al SS, pues en el diagrama de Bode se observan que el módulo de la impedancia es similar en ambas muestras del SS. Para el ángulo de fase, se observa un comportamiento similar en ambas muestras: se alcanza un ángulo mínimo ($\sim -71^\circ$) en 5 Hz, y a frecuencias menores la fase cambia a ángulos más positivos de $\sim -70^\circ$ a $\sim -40^\circ$. Esto nos indica que en ambas muestras se tiene el mismo comportamiento capacitivo. El diagrama de Nyquist

muestra que el SS-P y el SS-T tienen una magnitud similar porque lo que es indicativo de la resistencia es la misma en ambos materiales.

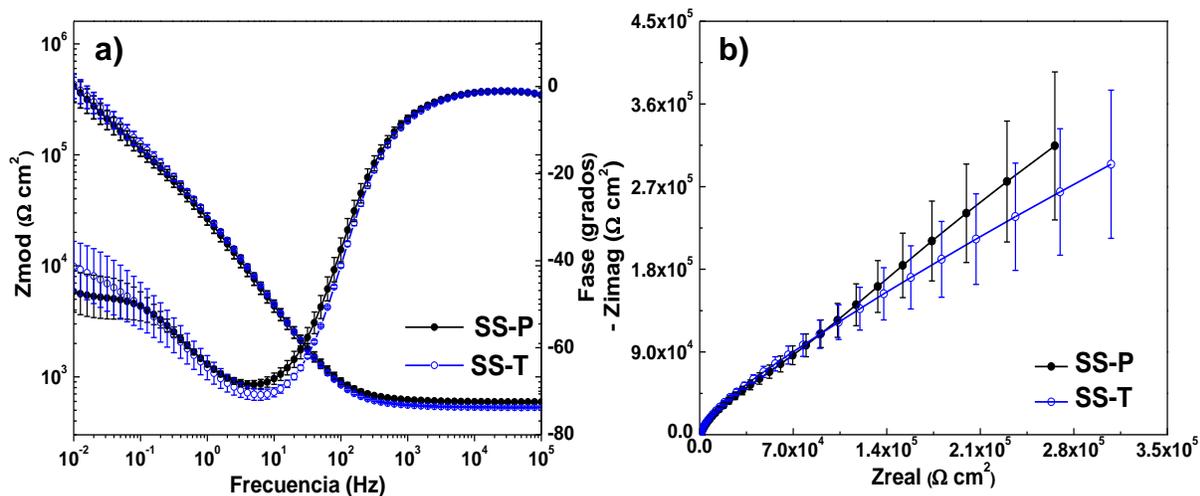


Figura 39. (a) Diagrama de Bode del SS-P y del SS-T, (b) Diagrama de Nyquist del SS-P y del SS-T.

En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos en el ajuste de los diagramas de Bode y Nyquist del SS-P y del SS-T al circuito eléctrico equivalente CE. Los elementos del circuito R_{cor} , C_{cor} y C_c no tienen una diferencia significativa entre el SS-P y el SS-T. La R_{sol} disminuye después del tratamiento, lo cual indica que la superficie de SS-T se pasiva y R_{po} incrementa un poco. Eso se asocia a que la película de óxido de cromo que crece en el SS-T es más compacta que la existente en el SS-P.

Parámetro	SS-P	SS-T	Unidades
R_{soln}	593.6 ± 14	532.66 ± 6	$\Omega \text{ cm}^2$
R_{cor}	$3.9E6 \pm 1.3E6$	$2.2E6 \pm 5.5E5$	$\Omega \text{ cm}^2$
R_{po}	$7.2E5 \pm 6.2E5$	$2.2E6 \pm 5.4E5$	$\Omega \text{ cm}^2$
C_{cor}	$1.2E-5 \pm 2.2E-6$	$9.2E-6 \pm 2.9E-6$	$S*s/\eta$
N	$585E-3 \pm 55E-3$	$520E-3 \pm 65E-3$	
C_c	$7.09E-6 \pm 1.1E-6$	$5.71E-6 \pm 2.2E-7$	$S*s/\eta$
M	$861E-3 \pm 14.2E-3$	$888E-3 \pm 8.5E-3$	

Tabla 8. Resultados del ajuste de datos del SS-P y del SS-T al circuito equivalente.

6.7.2.3 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en cTiO₂

Con respecto a la película de cTiO₂-P y la película de cTiO₂-T, los diagramas de Bode y Nyquist se muestran en la figura 40(a) y (b), respectivamente, en estos diagramas se observa que la película de cTiO₂ tiene un comportamiento similar al cpTi. El diagrama de Bode de la película de cTiO₂-P y la película de cTiO₂-T muestra que el tratamiento con la respuesta inflamatoria simulada provoca una reducción en el módulo de la impedancia a frecuencias bajas (193 Hz a 0.01 Hz). El ángulo de fase muestra a la película de cTiO₂-P como un recubrimiento más capacitivo que a la película de cTiO₂-T, esto debido a que a frecuencias bajas (17 Hz a 0.01 Hz) la película de cTiO₂-P alcanza un ángulo de fase menor ($\sim -80^\circ$) que la película cTiO₂-T ($\sim -56^\circ$ a $\sim -48^\circ$).

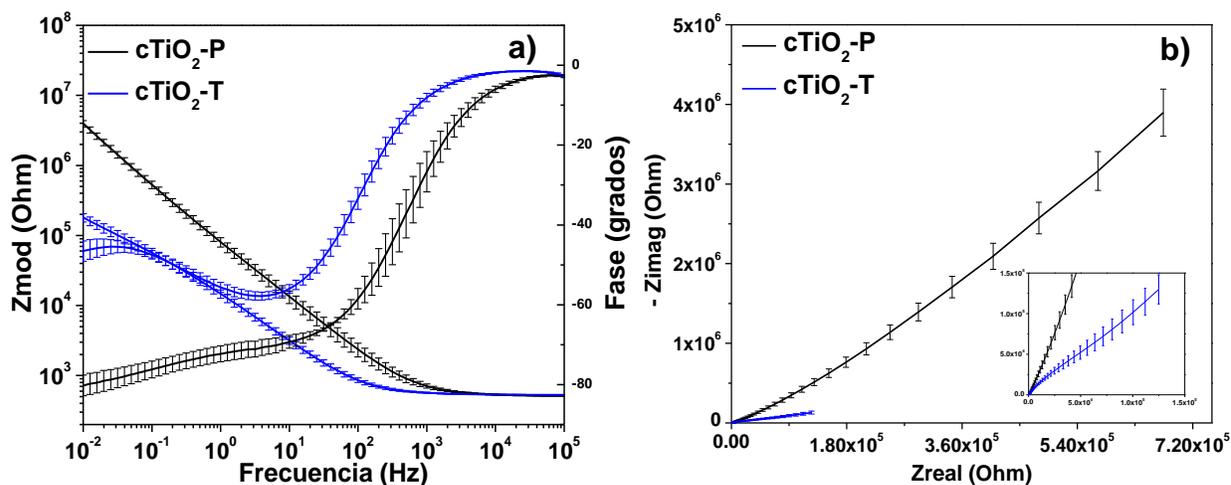


Figura 40. (a) Diagrama de Bode de la película de cTiO₂-P y película de cTiO₂-T y (b) Diagrama de Nyquist de la película de cTiO₂-P y la película de cTiO₂-T.

En la tabla 9 se muestran los valores obtenidos en el ajuste de los diagramas de Bode y Nyquist de la película de cTiO₂-P y de la película de cTiO₂-T al circuito equivalente CE. La disminución de R_{po} (de 1.98E5 Ω cm² a 9.1E4 Ω cm²) indica que, tras el tratamiento con el H₂O₂, la película de cTiO₂ incrementa la porosidad o hay agrietamiento en la película, por otro lado R_{cor} disminuye (de 6.365E7 Ω cm² a 1.74E6 Ω cm²), lo cual indica que el sustrato está interactuando más con el electrolito, debido al agrietamiento en la película y con ello empieza un proceso de corrosión en el sustrato.

Parámetro	cTiO ₂ -P	cTiO ₂ -T	Unidades
R _{soln}	500.97 ± 23.21	526.4 ± 4.5	Ω cm ²
R _{cor}	6.365E7 ± 2.12E7	1.74E6 ± 4.3E5	Ω cm ²
R _{po}	1.98E5 ± 8.9e3	9.1E4 ± 2.8E4	Ω cm ²
C _{cor}	9.82E-7 ± 3.41e-7	1.8E- ± 5.1E-6	S*s^m
n	821E-3 ± 0.085	630E-3 ± 61E-3	
C _c	1.78E-6 ± 1.18e-7	1.29E-5 ± 4.03E-6	S*s^m
m	832E-3 ± 0.017	801E-3 ± 52E-3	

Tabla 9. Resultados del ajuste de datos de la película de cTiO₂-P y la película de cTiO₂-T al circuito equivalente.

6.7.2.4 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en aTiO₂

Para los diagramas de Bode y de Nyquist de la película de aTiO₂-P y de la película de aTiO₂-T se muestran en la figura 41(a) y (b), respectivamente. De la misma manera que en el cpTi y en la película de cTiO₂ el tratamiento con H₂O₂ modifica a la película de aTiO₂, pues en el diagrama de Bode se observa la disminución del módulo de la impedancia después el tratamiento, además, el cambio en el ángulo de fase a frecuencias medias y bajas d con H₂O₂ e la película de aTiO₂-P (-85°) a la película de aTiO₂-T (-75° a -54°) indica que el material prístino tiene un comportamiento más capacitivo que el tratado, esto se relaciona con un daño en la película después del tratamiento.

Por otro lado, el diagrama de Nyquist muestra que después de tratamiento la resistencia también disminuye, esto es asociado a la disolución del substrato.

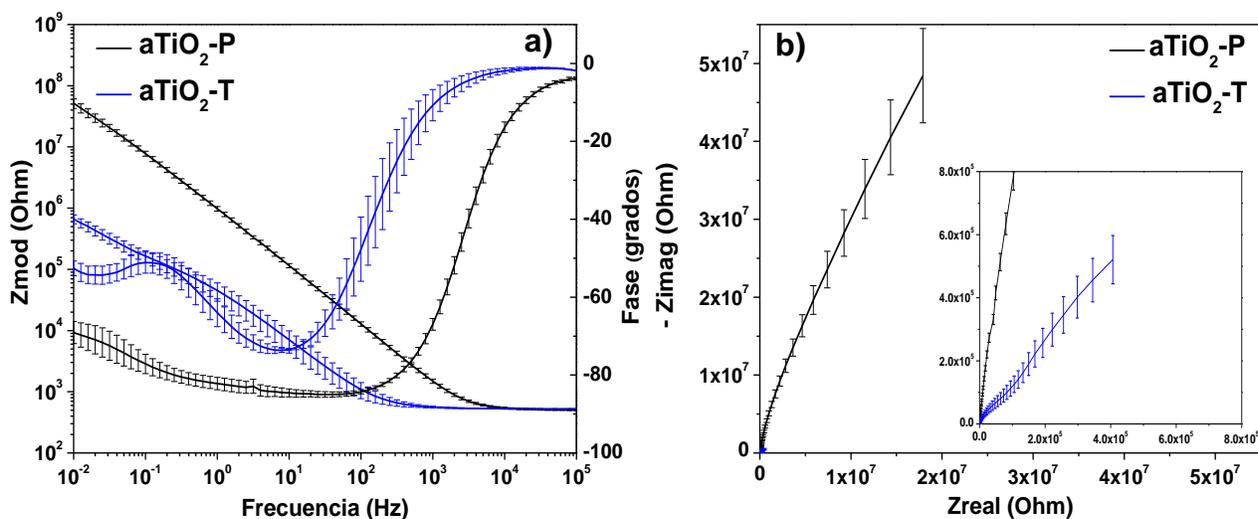


Figura 41. (a) Diagrama de Bode de aTiO₂-P y aTiO₂-T y (b) Diagrama de Nyquist de aTiO₂-P y aTiO₂-T.

Los resultados obtenidos en el ajuste del circuito equivalente CE a los diagramas de Bode y Nyquist de la película de aTiO₂-P y la película de aTiO₂-T se muestran en la tabla 10, de manera general lo que se puede describir aquí es que al igual en la película de cTiO₂ la formación de poros o agrietamientos en la película aparecen después del tratamiento, esto se observa en la reducción de R_{po} (2.13E6 Ω cm² a 1.2E5 Ω cm²). Además, el incremento de R_{sol} (de 507.33 Ω cm² a 527 Ω cm²) indica que existe mayor migración de iones del sustrato hacia el electrolito lo cual mayor porosidad o agrietamiento en la película, esto conlleva que el electrolito interacciona con el sustrato, esto se logró debido al daño en la película.

Parámetro	aTiO ₂ -P	aTiO ₂ -T	Unidades
R _{soln}	507.33 ± 10.09	527.5 ± 2.6	Ω cm ²
R _{cor}	4.12E8 ± 8.11e7	3.8E6 ± 8.5E5	Ω cm ²
R _{po}	2.13E6 ± 1.58e6	1.2E5 ± 1.3E4	Ω cm ²
C _{cor}	5.59E-08 ± 1.55e-8	9.2E-6 ± 1.5E-6	S*s ^{1/2} m
n	663E-3 ± 0.051	704E-3 ± 28E-3	
C _c	1.53E-07 ± 1.94e-8	4.2E-6 ± 1.2E-6	S*s ^{1/2} m
m	968E-3 ± 0.014	913E-3 ± 7E-3	

Tabla 10. Resultados del ajuste de datos de la película de aTiO₂-P y la película de aTiO₂-T al circuito equivalente.

6.8.3 Polarización potenciodinámica

La polarización potenciodinámica es una técnica que nos muestra una aproximación sobre el comportamiento corrosivo de un material en un ambiente específico. En este trabajo de investigación se realizó este tipo de estudio electroquímico con la finalidad de tener una visión más clara de su comportamiento corrosivo en un ambiente biológico simulado antes y después de ser sometidos los materiales a su interacción con H_2O_2 .

La respuesta a la polarización potenciodinámica del cpTi, el SS, película de cTiO₂ y película de aTiO₂, antes y después del tratamiento con H_2O_2 , se muestra en la figura 42, las curvas se realizaron en una ventana de -1.5 V a 2 V, a excepción del SS que tuvo una ventana de -1 V a 1 V. además cada curva se realizó por triplicado en distintas muestras.

De manera general, se observa que en las curvas de polarización potenciodinámica del cpTi, la película cTiO₂ y la película de aTiO₂, tanto prístina como tratada, se encuentran los dominios electroquímicos que corresponden al dominio catódico, la transición catódica-anódica y dominio pasivo. Esto indica que las muestras antes y después del tratamiento en el intervalo de -1.5 a 2 V se encuentran pasivas.

Sin embargo, en las tres muestras se observa que posterior al tratamiento con H_2O_2 , el potencial de corrosión se recorre a potenciales más positivos, lo cual indica un comportamiento más noble, con esto se entiende, las superficies son más resistentes al proceso de corrosión en una solución fisiológica simulada.

Respecto a las curvas de polarización potenciodinámica del SS-P y del SS-T se muestra su ventana de potencial fue de -1 V a 1 V, en esta ventana se encuentran los dominios electroquímicos que corresponden al dominio catódico, la transición catódica-anódica, dominio pasivo y dominio transpasivo, lo cual indica que para el SS-P a partir de 0.8 V la película protectora pasiva y otros componentes del SS son oxidadas en especies con una solubilidad mayor, por ejemplo el caso del cromo: $Cr^{+3} \rightarrow Cr^{+6}$, donde el Cr_2O_3 (Cr^{+3}) no es soluble en agua mientras que el CrO_3 (Cr^{+6}) sí lo es, para el SS-T a partir de 0.75 V comienza la disolución del SS-T. Finalmente,

se observa que después del tratamiento con la respuesta inflamatoria en el SS, el potencial de corrosión en el SS al igual que en los demás materiales se recorre a un potencial de corrosión mayor, lo cual indica que la superficie se pasiva.

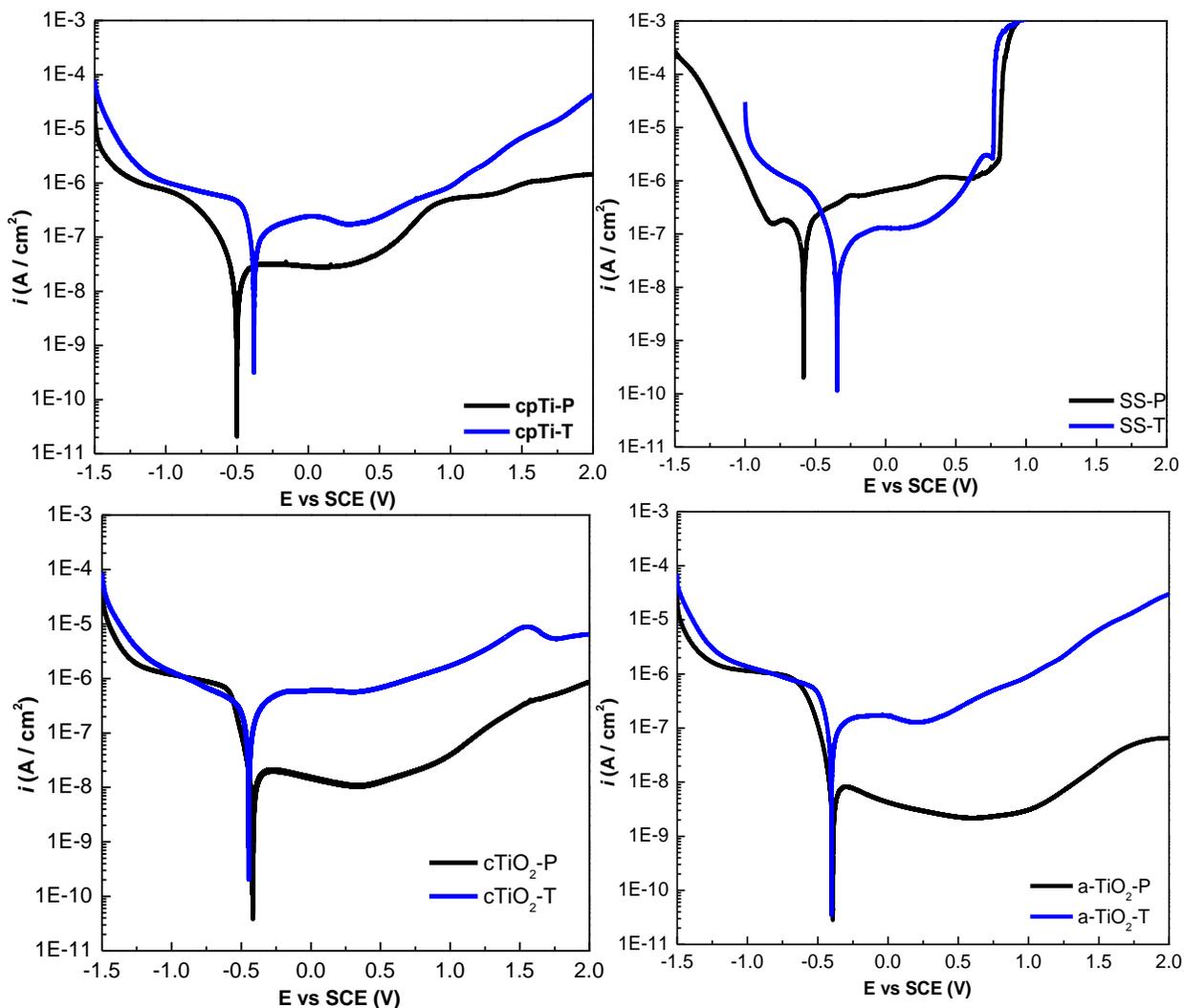


Figura 42. Curvas de polarización potenciodinámica del a) cpTi-P y del cpTi-T, del b) SS-P y del SS-T, de las películas de c) cTiO₂-P y cTiO₂-T y películas de d) aTiO₂-P y aTiO₂-T.

Para corroborar el cambio del potencial de corrosión, así como la corriente de corrosión, se calcularon las pendientes de Tafel. Sin embargo, las curvas de polarización potenciodinámica no tienen un comportamiento tafeliano (las pendientes anódica no están entre 60 y 120 V/décadas.) esto debido a que las superficies tienen una transición anódica-catódica grande por lo que es difícil calcular la pendiente anódica, por lo que para la determinación del potencial de

corrosión al igual que la corriente de corrosión se utilizó únicamente la pendiente catódica (β_c).

En la tabla 11 se muestran los resultados de pendiente catódica, potencial y corriente de corrosión. La corriente de corrosión es proporcional a la velocidad de corrosión. Como se observa en todos los materiales después del tratamiento, la corriente de corrosión aumenta, en especial para el cpTi (7.1 a 47.2 nA), y para la película de cTiO₂ (10 a 51 nA) donde el cambio es grande en comparación del SS (29.6 a 31.1 nA) y la película de aTiO₂ (6.45 a 21.4 nA). Estos cambios se pueden relacionar con el hecho que las superficies después del tratamiento tienen tendencia a sufrir corrosión. Sin embargo, es importante mencionar que la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂ son recubrimientos que al ser óxidos deben ser “pasivos” pero, el resultado muestra lo contrario. Esto se asocia con el agrietamiento en la película y/o comienza a mostrarse el sustrato, en este caso es el cpTi.

Material	β_c mV/década	E_{cor} Mv	I_{cor} nA/cm ²
cpTi-P	90 ± 10	-451.7 ± 26.4	7.1 ± 0.3
cpTi-T	100 ± 10	-374.5 ± 8.5	47.2 ± 8.3
SS-P	90 ± 10	-544.6 ± 98.5	29.6 ± 5.5
SS-T	80 ± 10	-447.7 ± 88.6	31.1 ± 18.0
cTiO ₂ -P	86 ± 3	-425.57 ± 5.35	10.09 ± 0.72
cTiO ₂ -T	79 ± 11	-416.8 ± 31.51	51.11 ± 8.43
aTiO ₂ -P	75 ± 4.7	-408 ± 18.31	6.45 ± 0.54
aTiO ₂ -T	74.6 ± 7.3	-358.97 ± 32.66	21.4 ± 5.4

Tabla 11. Resultados del ajuste de la pendiente de Tafel catódica (β_c) para determinar potencial de corrosión (E_{cor}) y corriente de corrosión (I_{cor}), en los diferentes materiales de estudio.

6.9 Funcionalidad de los materiales como biomateriales

En las secciones anteriores se mostraron los resultados de la caracterización del cpTi, el SS, película de cTiO₂ y película de aTiO₂ así como sus resultados generados en la modificación de su superficie, debidos al tratamiento *in vitro* de la condición inflamatoria. Sin embargo, en esta sección se muestran, cómo la modificación de las superficies puede influir en la funcionalidad de los biomateriales, esto determinado con el ensayo respuesta de la adhesión y el ensayo de diferenciación celular.

6.9.1 Estudio de la adhesión celular

En la adhesión celular se realizó en dos modalidades:

1. Adhesión celular “proliferación o extensión” sin suero fetal bovino.
2. Adhesión celular “proliferación o extensión” con suero fetal bovino.

La razón de realizar el estudio en dos modalidades fue con fin de comprender si los materiales poseen *per se* una buena adhesión celular, debido a que en presencia de proteínas (suero fetal bovino) la adhesión celular se modifica, pues previamente hay adsorción de las proteínas (SFB) en la superficie que no dejan ver realmente la interacción entre la superficie y la célula.

Cuando una célula se adhiere a una superficie, en este caso pozo de cultivo, presentan una morfología específica en la membrana, como se observa en la figura 43, las células en su circunferencia tienen una deformación y aro más oscuro. Esta morfología en la circunferencia sugiere la fuerte interacción (adhesión) de la célula con el biomaterial, adheridas en etapa de expansión.



Figura 43. Adhesión Celular en fase de expansión o proliferación en caja de cultivo.

Cuando las células no se encuentran adheridas presentan una morfología un tanto diferente a la célula adherida, pues las células no adheridas son redondas y no muestran la circunferencia deformada como las adheridas. Además, poseen una circunferencia brillante. En la figura 44 se muestra una imagen de células no adheridas a una caja de cultivo

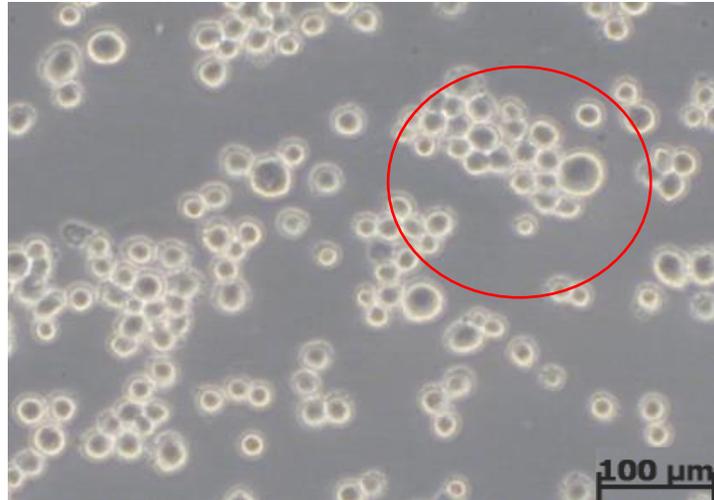


Figura 44. Adhesión Celular en fase de expansión o proliferación en caja de cultivo.

Para los ensayos de adhesión se utilizó un control positivo, que fue la colágena tipo I, una proteína presente en matriz extracelular del hueso [109]. El ensayo de adhesión libre de SFB se observa en la figura 42. En esta gráfica se puede observar que los materiales que presenta una buena adhesión son las películas $cTiO_2$ y $aTiO_2$.

Como se muestra en la figura 45 el $cpTi$ **per se** no presenta una buena adhesión celular, incluso después del tratamiento con la respuesta inflamatoria simulada no se observa una mejoría en la adhesión, ya que en el $cpTi$ -P la adhesión fue de $39\% \pm 4\%$ y en el $cpTi$ -T de $41\% \pm 5\%$, lo cual indica que el crecimiento de la capa de óxido de titanio (IV) no ayuda a mejorar la adhesión celular que posee el Ti.

En el SS al igual que en el $cpTi$ se observa que **per se** el SS no presentan buena adhesión celular, incluso es menor que en $cpTi$. En la figura 45 se muestra que para el SS el crecimiento de su capa de óxido de cromo (III) debido a su interacción con H_2O_2 , ayuda a mejorar ligeramente la adhesión celular. Ya que la adhesión en SS-T fue significativamente mayor que en SS-P. La adhesión celular en SS-P fue $12\% \pm 0.3\%$ mientras que para SS-T fue de $18\% \pm 2\%$.

Los metales **per se** no mostraron una buena adhesión celular, sin embargo, en las películas $cTiO_2$ y de $aTiO_2$ hubo una alta adhesión celular, tal como se observa en la figura 45.

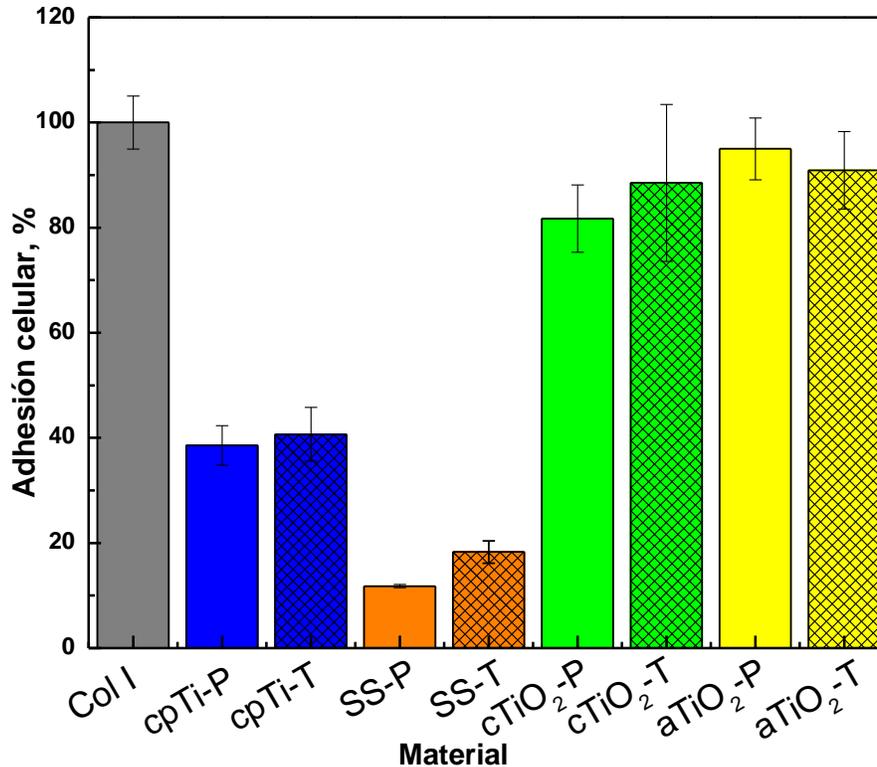


Figura 45. Ensayo de adhesión celular promedio de los materiales de estudio, el cpTi-P, el cpTi-T, SS-P, SS-T, cTiO₂-P, cTiO₂-T y aTiO₂-T sin SFB, sin suero fetal bovino, $p < 0.05$.

En la película de cTiO₂-P la adhesión fue del 82% ± 6 y para la película de cTiO₂-T fue del 86 % ± 15, mientras que para la película de aTiO₂ -P la adhesión fue del 95% ± 6 y en la película de aTiO₂-T fue de 91% ± 7%. Además, se observa que tanto para la película de cTiO₂ como para la película de aTiO₂ no hay una modificación en la adhesión celular a causa del tratamiento con la respuesta inflamatoria ya que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la adhesión celular antes y después del tratamiento.

El ensayo de adhesión celular con SFB se muestra en la figura 46, se observa un incremento en la adhesión celular en todas las superficies, esto como consecuencia de la presencia de las proteínas contenidas en el SFB. Estas proteínas son quienes favorecen el incremento de la adhesión [105, 106, 108, 110, 111, 129-131].

Por otro lado, se observa que la adhesión celular fue significativamente mayor en el cpTi-T a comparación con el cpTi-P, pues la adhesión en el cpTi-P fue

de $81\% \pm 9\%$ mientras que en el cpTi-T fue de $95\% \pm 1\%$, lo cual indica que el crecimiento de la capa de óxido de titanio (IV) ayuda a la superficie del cpTi-T a tener una mejor adhesión celular que en el cpTi-P.

Sin embargo, en el SS se observa que el crecimiento de la capa de óxido de cromo (III) no mejora la adhesión celular, pues en el SS-P la adhesión fue de $50\% \pm 15\%$ y mientras en SS-T fue de $46\% \pm 10\%$.

En cuanto a las películas delgadas de $cTiO_2$ y de $aTiO_2$ no se observa un incremento estadísticamente significativo en la adhesión después de su tratamiento. Además, al igual que en el ensayo libre de suero, no hay diferencia en la adhesión entre la película amorfa y la cristalina. En la película de $cTiO_2$ -P la adhesión fue de $102\% \pm 11\%$ y para $cTiO_2$ -T fue de $83\% \pm 8\%$ mientras que para la película de $aTiO_2$ -P la adhesión fue de $90\% \pm 1\%$ y para la película de $aTiO_2$ -T fue de $85\% \pm 5\%$.

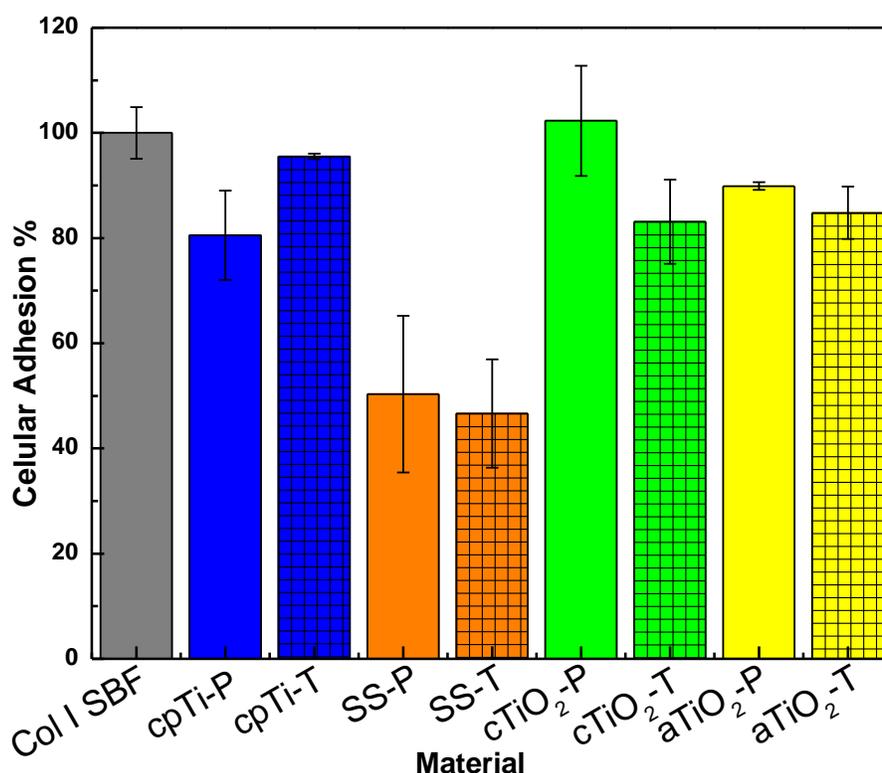


Figura 46. Ensayo de adhesión celular promedio de los materiales de estudio, el cpTi-P, el cpTi-T, SS-P, SS-T, $cTiO_2$ -P, $cTiO_2$ -T y $aTiO_2$ -T sin SFB, con suero fetal bovino, $p < 0.05$.

De manera general, se observa que cpTi, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂ muestran mayor adhesión en comparación al SS, independientemente si la adhesión fuera o no determinada por el SBF, esto lo relacionamos con la carga en superficie y el comportamiento hidrofílico de las superficies. Es decir, las superficies con carga superficial negativa y alta hidrofiliicidad que es el caso de que cpTi, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂ mostraron una mayor adhesión celular mientras que la superficie de SS con carga positiva y un comportamiento hidrofílico mostró una baja adhesión.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son un tanto diferentes a lo investigado por Shanshan *et al.* [132], ellos proponen que una superficie con una carga positiva y un comportamiento hidrofílico tiene una alta adhesión celular mientras que una superficie con carga negativa y comportamiento hidrofóbico tiene una baja adhesión [132].

Sin embargo, los resultados de **Shanshan et al.** [132] no son del todo comparables con los obtenidos en este trabajo de investigación, el ensayo de adhesión que ellos realizaron fue hecho por 24 horas, en este tiempo de incubación se involucra el efecto de las proteínas de la membrana celular, mientras que en el ensayo de adhesión que se hizo en este trabajo de investigación va directamente relacionado al reconocimiento de la célula a la superficie o proteínas que se encuentren presentes.

6.9.2 Estudio de diferenciación celular

El ensayo de diferenciación celular en los diferentes materiales se realizó con el fin de comprender si es posible mantener la diferenciación de los osteoblastos en los materiales. Para evaluar la diferenciación celular en los materiales se midió la expresión de RUNX-2 en núcleos.

6.9.2.1 Expresión de RUNX-2 en núcleos

RUNX-2 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en el fenotipo óseo. Determinar la presencia de RUNX-2 en el núcleo

aporta información sobre su posible actividad reguladora en la expresión génica, por lo tanto, como medida indirecta de la actividad de RUNX-2.

En este trabajo se midió la presencia de RUNX-2 en los núcleos de osteoblastos aislados de mandíbula humana que fueron sembrados y cultivados sobre las superficies de cpTi-P, cpTi-T, SS-P, SS-T, cTiO₂-P, cTiO₂-T, aTiO₂-P y aTiO₂-T. Los cultivos de los osteoblastos se realizaron 1 y 7 días, posteriormente se realizó la inmunohistoquímica con la cual se logró observar la expresión de RUNX-2 a través de fluorescencia en color verde localizada en los núcleos celulares.

En la figura 47 se muestra el ensayo de diferenciación celular, donde se observa la expresión de RUNX-2 en el cpTi antes y después del tratamiento con H₂O₂ y el control (pozo de cultivo), el ensayo se realizó a 1 y 7 días.

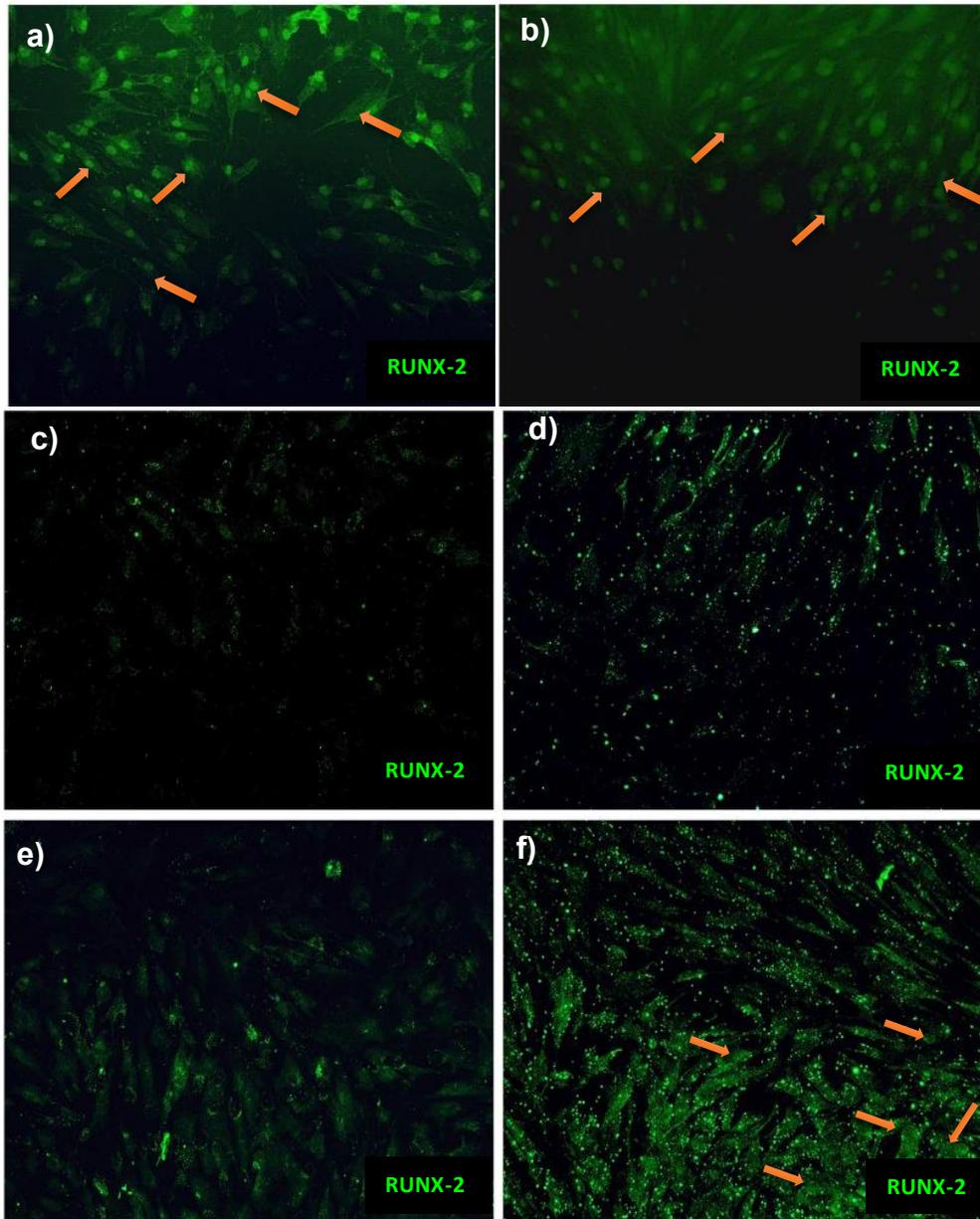


Figura 47. Expresión de RUNX-2, a) Control día 1, b) Control día 7, c) cpTi-P día 1, d) cpTi-P día 7, e) cpTi-T día 1 y f) cpTi-T día 7.

Como se observa en la figura 47 el cpTi-P y el cpTi-T no expresan RUNX-2 en el 1 día del cultivo, mientras que en el día 7, cpTi-P sigue sin expresar RUNX-2 y en el cpTi-T comienza a aparecer la expresión de RUNX-2 en el núcleo,

En el caso del SS, el ensayo de diferenciación celular se muestra en la figura 48, donde se observa que tanto para el SS-P y para el SS-T a 1 y 7 días no hay expresión de RUNX-2. Se colocaron flechas naranjas en los controles los cuales indican la expresión de RUNX-2.

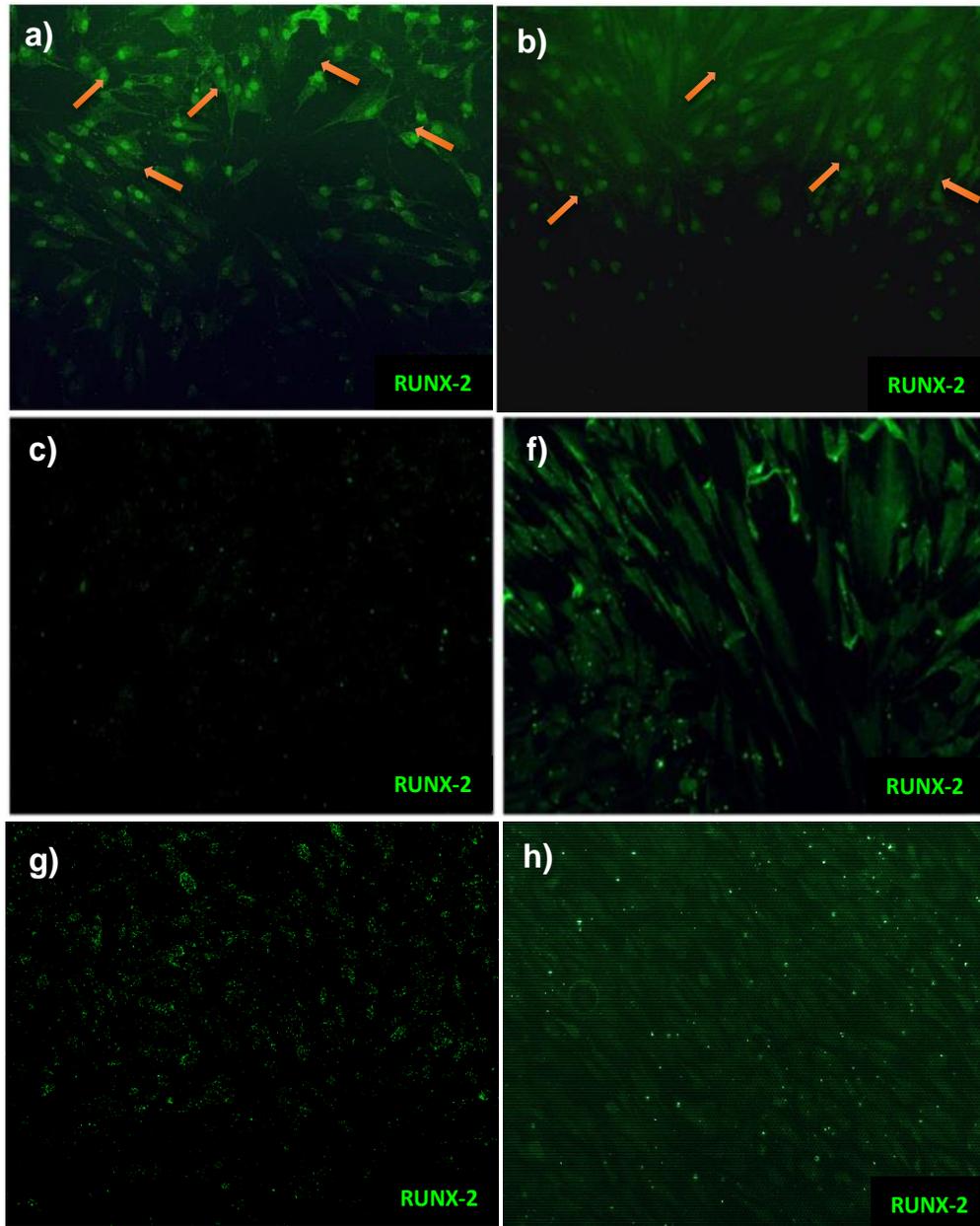


Figura 48. Expresión de RUNX-2, a) Control día 1, b) Control día 7, c) SS-P día 1, d) SS-P día 7, e) SS-T día 1 y f) SS-T día 7.

En referencia a la expresión de RUNX-2 en la película delgada de cTiO_2 , figura 49, se observa que en ambas películas de $\text{cTiO}_2\text{-P}$ y de $\text{cTiO}_2\text{-T}$, hay expresión de RUNX-2 desde el día 1 hasta el día 7 de cultivo. Tal como lo muestran las flechas naranjas que señalan la expresión de RUNX-2.

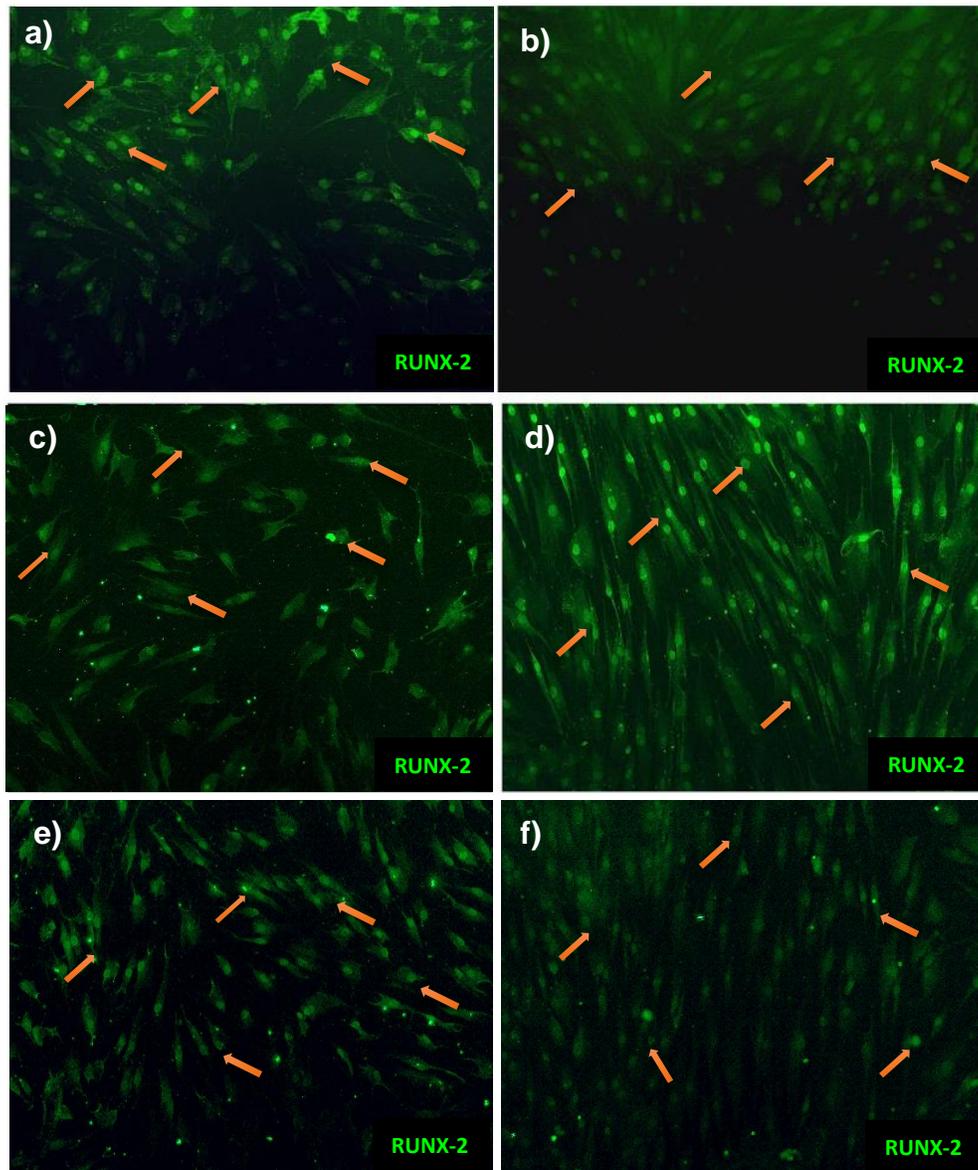


Figura 49. Expresión de RUNX-2, a) Control día 1, b) Control día 7, c) $\text{cTiO}_2\text{-P}$ día 1, d) $\text{cTiO}_2\text{-P}$ día 7, e) $\text{cTiO}_2\text{-T}$ día 1 y f) $\text{cTiO}_2\text{-T}$ día 7.

De igual manera que en la película de cTiO_2 , para la película de aTiO_2 tanto prístina como tratada se observa expresión de RUNX-2 desde el día 1. En la Figura 50, se muestra la expresión de RUNX-2 en la película de aTiO_2 , las flechas naranjas señalan expresión de RUNX-2.

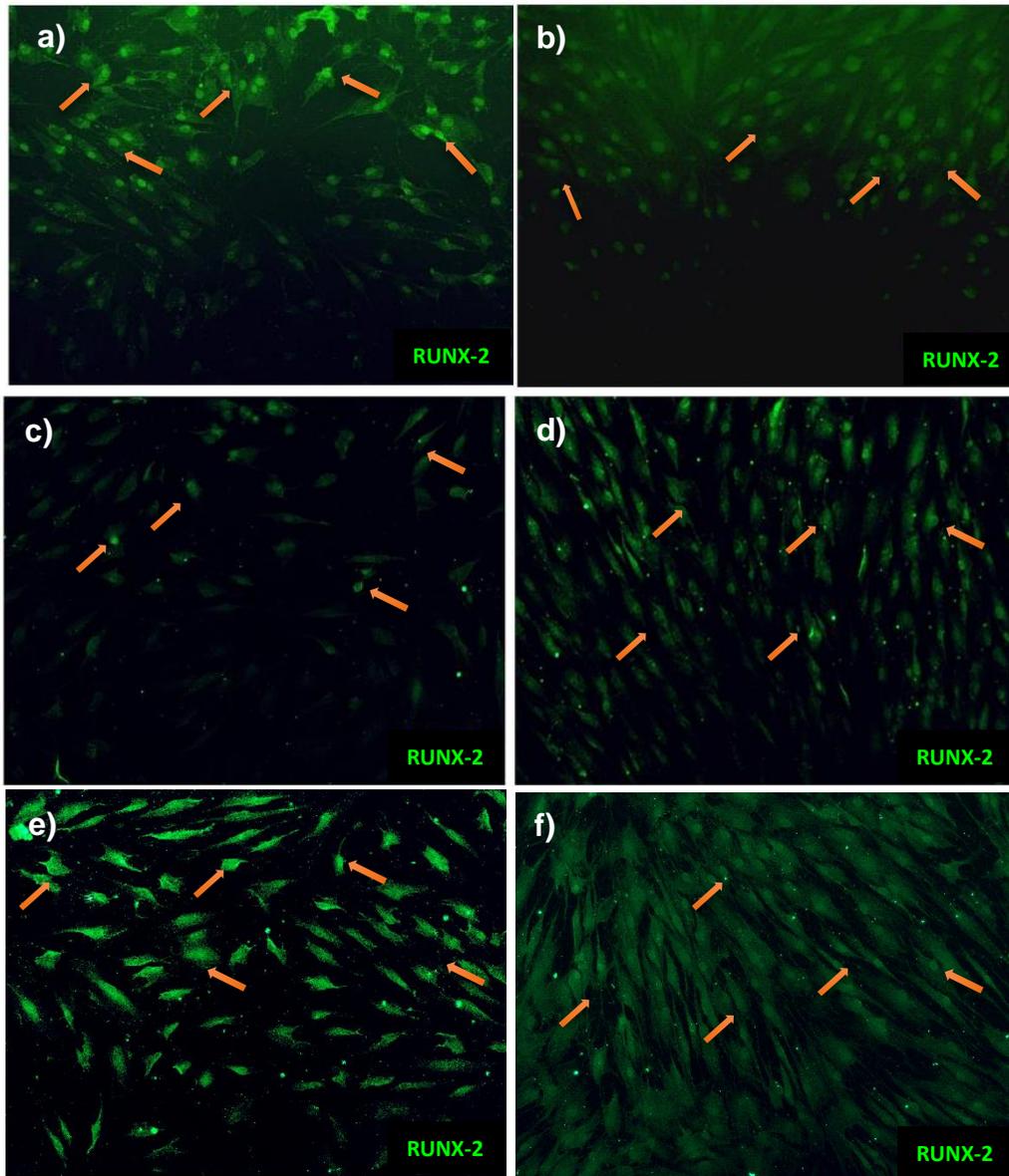


Figura 50. Expresión de RUNX-2, a) Control día 1, b) Control día 7, c) $\text{aTiO}_2\text{-P}$ día 1, d) $\text{aTiO}_2\text{-P}$ día 7, e) $\text{aTiO}_2\text{-T}$ día 1 y f) $\text{aTiO}_2\text{-T}$ día 7.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo de investigación se buscó evaluar y analizar las modificaciones generadas en el cpTi, el SS, la película de cTiO₂ y la película de aTiO₂, debido a su inmersión en una solución rica en H₂O₂. La finalidad de la solución rica en H₂O₂ fue para simular especies reactivas de oxígeno presentes en la respuesta inflamatoria y/o de reacción a cuerpo extraño.

Uno de los modelos para explicar la biocompatibilidad y, sobre todo, la osteointegración en el Ti [25, 31], considera que, bajo condiciones de la respuesta inflamatoria, la capa de óxido de Ti crece en espesor pero con una estructura porosa que permite la integración de iones Ca y P del fluido fisiológico [133-137]. En este sentido, el comparar las modificaciones que se generan en cpTi debido a su interacción con un ambiente rico en H₂O₂ con otra superficie metálica como lo fue el SS, tuvo por objetivo poder determinar y corroborar que el crecimiento de la capa de óxido en Ti es una cualidad característica en este metal.

Además, considerando que la capa de óxido en cpTi es la responsable de la osteointegración del metal [22, 23, 25, 31, 37] resulta importante comparar al cpTi con películas de óxido de Ti crecidas experimentalmente. El Ti es un metal que comenzó a utilizarse en aplicaciones biomédicas a finales de la segunda guerra mundial, esto como consecuencia de las exigencias que se marcaron en las industrias aeroespacial y militar [23]. Sin embargo, fue hasta 1956 cuando Bränemark descubre que el Ti se osteointegra. Desde entonces ha crecido el interés por el uso del Ti [24] hasta nuestros días. Pero, a pesar de esto, la comprensión de los fenómenos que ocurren en titanio *in vivo* no son comprendidos del todo, aquí es donde recae el interés de este trabajo de investigación.

Con la finalidad de lograr comunicar de forma más clara la respuesta a las preguntas de investigación planteadas, esta parte de la discusión se ha dividido en dos secciones básicas. Primero se compara el cpTi con el acero inoxidable para identificar si los cambios inducidos en el Ti debido a la inmersión en la solución de respuesta inflamatoria simulada son exclusivos de este metal. Posteriormente, se compara el cpTi con las películas de óxido de titanio crecidas físicamente, lo que

nos permite evaluar si en efecto es el óxido de titanio el que brinda una mejor respuesta de biocompatibilidad y osteoinducción.

7.1 cpTi versus SS

Para ambos metales se observó que hay modificaciones en sus propiedades superficiales y respuesta electroquímica debido a la interacción con H₂O₂. Uno de los cambios más significativos fue el crecimiento de la capa de óxido en ambos metales lo cual se corroboró mediante los estudios por XPS. En el caso del cpTi, el óxido que creció fue un óxido estequiométrico de Ti⁴⁺, mientras que inicialmente poseía una capa nativa de óxido pobre en oxígeno, Ti²⁺ [138].

Para el caso del SS, la capa del óxido de cromo de Cr³⁺ ya se encontraba presente desde el inicio y se observó que después de la inmersión en la solución de H₂O₂ incrementó su espesor.

En trabajos previos de **Tengvall et al.** [36, 37], **Pan et al.** [38] y **Fonseca et al.** [39] propusieron que bajo la acción del H₂O₂, se formaba una doble capa de óxido de Ti. La primera capa o interna la describieron como compacta, mientras que la segunda o externa la clasificaron como una capa altamente porosa y que en proporción era de mayor espesor que la interna. Además, estos autores proponen que la capa de óxido externa permite la migración de iones de Ti, facilitando el continuo crecimiento de la capa de óxido hasta que la capa se llena de iones de calcio y otros minerales. Ciertamente, los resultados descritos anteriormente fueron obtenidos por evaluaciones *in situ* del Ti [36-38, 40-42], en los que la respuesta electroquímica era evaluada cuando el peróxido era parte del electrolito. Sin embargo, en este trabajo de investigación se utilizó una metodología de estudio en condiciones *ex situ*, es decir, las muestras eran expuestas al peróxido y analizadas posteriormente en electrolitos neutros (solución Hartmann). La razón principal de proceder de esta forma fue tener la capacidad de medir el cambio de otras propiedades, además de la respuesta electroquímica. Al comparar los cambios del cpTi con el acero inoxidable 316L, los resultados mostraron que el cpTi definitivamente es muy diferente al acero inoxidable 316L.

En nuestros resultados, observamos que el óxido de Ti que creció a causa del H_2O_2 proporcionó al cpTi una pasividad, tal como lo indicó el potencial de corrosión que pasó de -451.7 ± 26.4 mV a -374.5 ± 8.5 mV lo cual corresponde a un material más noble. Además, esta capa de óxido de Ti es más porosa que la capa de óxido de Ti inicial, lo cual fue posible medirlo mediante EIS; técnica en la cual se midió una disminución de la resistencia de poro que fue directamente interpretada como aumento en la porosidad de la película del óxido crecido en cpTi, contrariamente al resultado en cpTi para SS la resistencia del poro aumentó, lo cual asociamos a una compactación en la película del óxido de cromo en SS, en la figura 51 pueden observarse las resistencias de poro que mostraron las superficies de cpTi y SS antes y después del tratamiento con H_2O_2 .

Por lo tanto, hay una cierta disolución activa en la superficie tratada de Ti, mientras que para el SS la capa de óxido creció, pero se mantuvo compacta, esta capa de óxido constituye una barrera que no interacciona con el medio. Estas diferencias de reactividad entre el cpTi y el SS son notables, como se observa en los valores de la resistencia a la corrosión indicados en figura 52; allí puede verse que la R_{cor} en el cpTi disminuyó casi 5 veces, mientras que en SS la disminución es muy pequeña. La disminución en la resistencia a la corrosión en el cpTi se asocia a un cambio en las propiedades de la superficie después del contacto prolongado con el H_2O_2 nos indica que el cpTi continua siendo reactivo aun después de retirar y enjuagar el H_2O_2 .

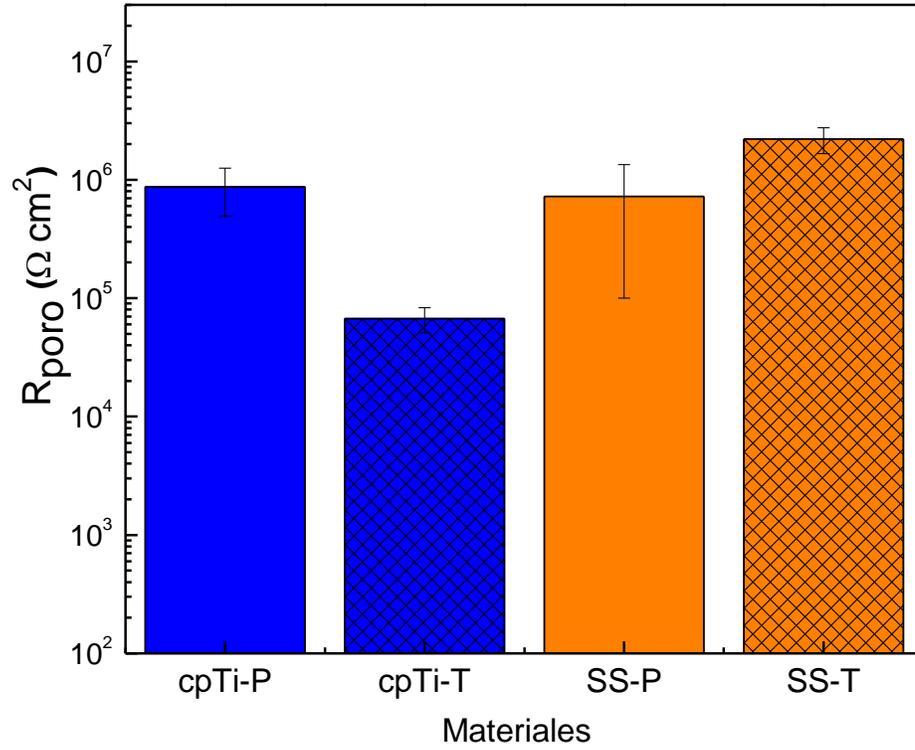


Figura 51. Resistencia de poro en cpTi y SS antes y después del tratamiento con un ambiente rico en H₂O₂.

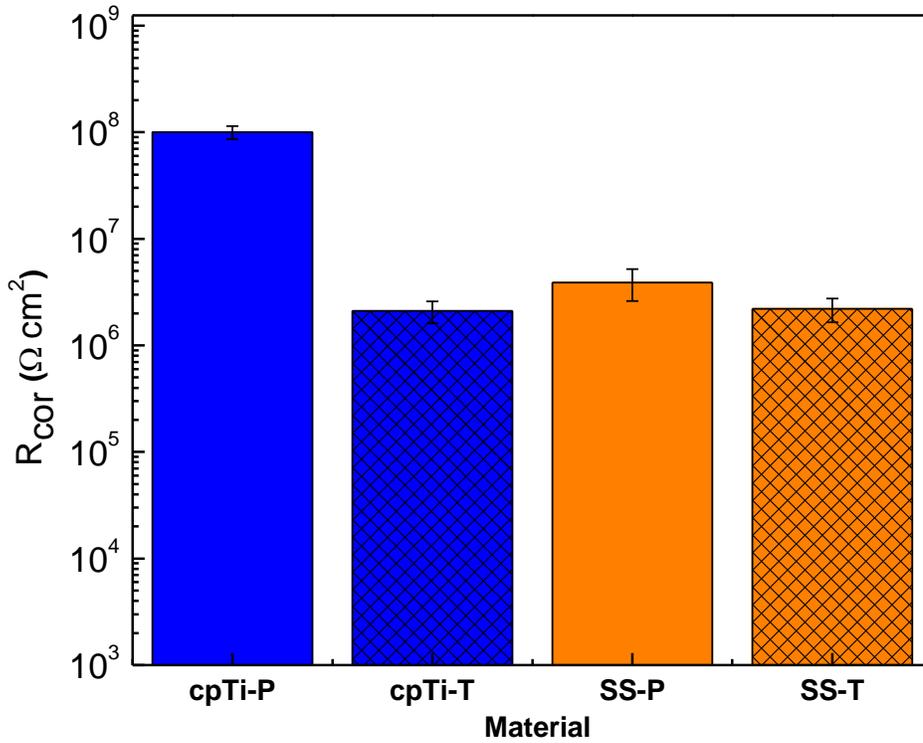


Figura 52. Resistencia a la corrosión en cpTi y SS antes y después del tratamiento con un ambiente rico en H₂O₂.

Por otro lado, a pesar que el espesor de la capa de óxido en ambos metales se incrementó, tal como lo indica la técnica de XPS, sólo en cpTi se mostró un incremento significativo en su rugosidad, al igual que cambios en su topografía.

Podría considerarse que los cambios de rugosidad y topografía de cpTi pueden influenciar el resultado de la mojabilidad, pero, recordando que las superficies están pulidas en acabado espejo y que el incremento de rugosidad es en realidad muy pequeño, consideramos que los cambios de mojabilidad y energía superficial son principalmente consecuencia del H₂O₂, el cual modificó la composición química de la superficie del cpTi, mientras que en SS no hubo una modificación química. Recordando los resultados obtenidos en XPS, donde se mostró que el cpTi en condiciones prístinas mostró ser un óxido sub-estequiométrico (TiO) pasando después del tratamiento con H₂O₂ a ser un óxido estequiométrico (TiO₂). Sin embargo para el SS no se mostraron cambios estequiométricos, pues antes y después del tratamiento con H₂O₂ el óxido de cromo (que fue el que se analizó en este trabajo y es el que provee la protección al SS) siempre fue de cromo (III) es decir un Cr₂O₃.

Para la carga en la superficie del cpTi y del SS hubo una modificación después del tratamiento con H₂O₂, el pzc del cpTi pasó de pH 6.24 a 6.86 esto indica que en condiciones fisiológicas normales (pH=7 - 7.4) posee una carga neta en superficie ligeramente negativa. El pH fisiológico es ligeramente mayor que el pzc del cpTi. Para el SS su pzc aumentó de 7.30 a 7.61, es decir, su pzc está por arriba del pH fisiológico, entonces la carga neta en superficie para SS sería ligeramente positiva. Estas diferencias en la carga superficial, así como la porosidad de la capa externa pueden explicar que los iones positivos (ej. Ca³⁺) en la solución sean preferiblemente atraídos y acumulados en el cpTi. Este resultado está de acuerdo con la propuesta de Tengvall *et al.* [36, 37], donde se describe la formación de una red porosa de TiOOH, la cual ayuda a la interacción entre la capa de óxido y el agua.

Los resultados de mojabilidad y energía de superficie indican que ambos materiales se hacen más hidrofílicos como consecuencia del H₂O₂, pero los cambios en la componentes polares y dispersivas ente ambos materiales son opuestas, por

lo que la explicación más viable de dicho cambio es que en ambos materiales, la componente básica (γ^-) aumenta sustancialmente después de la exposición al H_2O_2 . Esto concuerda con que en ambos materiales el pzc aumenta, pero en el caso de cpTi, dicho valor se acerca al pH fisiológico (7), mientras que en el SS, se aleja de dicho valor. Debido a la complejidad de las interacciones entre las propiedades de superficie y la biocompatibilidad [71, 139], es difícil predecir el efecto de dichos cambios en la respuesta biológicas. Sin embargo, basándose en conceptos generales, no necesariamente válidos para todos los casos [140], como la propuesta de que hay mayor biocompatibilidad de las superficies hidrofílicas [71] esperaríamos que en ambas superficies los resultados de adhesión celular indicaran una mejora posterior al tratamiento con H_2O_2 . Otros modelos más específicos [132, 141, 142] también plantean mejoras en la adhesión celular cuando el porcentaje de la fracción polar ($\gamma^{AB}/(\gamma^{AB}+\gamma^{LW})$) de la energía de superficie es menor. En nuestro caso la fracción polar en el cpTi disminuye (15 a 10%) con el tratamiento, mientras que en el SS dicha fracción aumenta (12 a 19%); de modo que ambos modelos apuntan a que la adhesión celular del cpTi después del tratamiento debería verse ligeramente favorecida, pero no necesariamente en el SS. De forma similar, la rugosidad puede tener efectos positivos en la diferenciación celular de osteoblastos como se ha reportado por diferentes autores [143-145]. Por otro lado, la interacción superficie-células se considera que está mediada por la presencia de proteínas previamente adsorbidas en la superficie [71, 72, 86]. En los cultivos celulares dichas proteínas se encuentran en el suero fetal bovino utilizado para mantener a las células viables y se ha establecido que las superficies son primeramente conquistadas por dichas proteínas antes de que interactúen con las células. La superficie de los materiales son cubiertas en segundos por proteínas (del medio de cultivo celular o de la sangre) y este fenómeno modula la subsiguiente adhesión celular, extensión y migración. El fenómeno de adsorción de proteínas en superficies y su correlación con las propiedades superficiales ha sido ampliamente estudiado, pero a la fecha es aún un gran interrogante, como puede verse en el reciente artículo de Vogler [71], donde justamente plantea las dificultades asociadas al tema, tanto técnicas como conceptuales.

Con el fin de obtener un poco de información sobre el efecto del cambio en las propiedades superficiales de los materiales como consecuencia de la interacción con el H₂O₂ se realizaron experimentos de adhesión de osteoblastos humanos con y sin adición de suero fetal bovino. Es decir, al eliminar el SFB, se obtiene la interacción directa superficie-célula y con el SFB, observamos el efecto de la adsorción de proteínas mediando a la adhesión celular. De manera complementaria, aunque solamente cualitativa, se analizó la expresión de RUNX-2 como un marcador temprano de la diferenciación celular.

Los resultados reportados en la sección 5.2.5 indican que sin SFB, la adhesión celular fue bastante baja en ambos metales y en ambos se observó un ligero aumento (cpTi: 40 a 41% y SS: 12 a 18%), aunque dicho aumento no fue estadísticamente significativo. Es decir experimentalmente vemos que los cambios en las propiedades de superficies no tienen un efecto directo en la interacción directa con las células. Sin embargo, al agregar el SFB, observamos diferencias importantes entre ambos materiales y cambios significativos en el cpTi, para el cual el porcentaje de células adheridas aumento de 80 a 95% como consecuencia de los cambios superficiales inducidos por la respuesta inflamatoria simulada. Mientras que la adhesión en el acero se mantuvo baja, alrededor del 50%. Los resultados demuestran el papel jugado por las proteínas del medio; en ambos metales, la adhesión celular fue superior (incremento >100%) al experimento sin adición de SFB, indicando que las proteínas modulan y mejoran la interacción superficie-células, funcionando como una capa intermedia: superficie-proteína-células.

En términos de estos resultados, debemos considerar las posibles correlaciones entre los cambios de las propiedades superficiales y la adsorción de proteínas, las cuales como se mencionó anteriormente, no son triviales. Y sin embargo, existen algunos conceptos generales que pueden discutirse [146]. Termodinámicamente, se ha planteado que para que la adsorción de proteínas ocurra y el sistema superficie-proteína—solución alcancen el potencial mínimo de equilibrio, la energía libre de Gibbs debe decrecer, ecuación 30:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0 \quad 30$$

Entre los parámetros involucrados en la entalpía y entropía del sistema que puedan influenciar y disminuir a la energía libre de Gibbs para asegurar la adsorción, pueden mencionarse:

- las interacciones electrostáticas, las cuales pueden ser atractivas o repulsivas dependiendo de la carga superficial de ambas la proteína y la superficie, las cuales a su vez dependen del pH y el pzc
- las fuerzas van der Waals, de las cuales dos de ellas involucran al menos un dipolo y la otra (dispersión) ocurre entre moléculas no-polares.
- las interacciones con la componente acuosa de las soluciones, las cuales determinan que en general hay mayor adsorción de proteínas en las superficies hidrofóbicas (dado que la superficie es no-polar, los dipolos del agua cerca de ella deben estar ordenados. Al adsorberse las proteínas, estas moléculas son liberadas de forma desordenadas al bulo de la solución y por ende aumentan la entropía del sistema, lo que significa un aumento en ΔG)
- Fuerzas de hidratación repulsivas, debidas a la interacción electrostática entre cationes hidratados (Na^+ , Ca^{2+}) con superficies negativamente cargadas
- Conformación de las proteínas; los cambios inducidos en la conformación de las proteínas pueden contribuir positiva o negativamente a la ΔG
- Otras como co-adsorción de iones de bajo peso molecular...

De modo que no hay una forma fácil de predecir los efectos de propiedades superficiales, como el pzc, la energía y carga de superficie o incluso la rugosidad. Se maneja que las superficies hidrofóbicas atraen más proteínas de la sangre que las hidrofílicas [147]; las superficies cargadas negativamente (pzc < PH fisiológico) adsorben preferentemente proteínas del plasma en tiempos muy cortos [148], hay un aumento de la adsorción de proteínas al aumentar la rugosidad. El efecto de la rugosidad depende de la escala, a escala macroscópica ($R_a \geq 0.1 \text{ mm}$) el aumento es debido a la mayor área superficial disponible para la adsorción; a escala nano ($R_a < 0.1 \text{ mm}$) se ha observado un efecto de la distorsión de campos eléctricos

alrededor de las irregularidades de dimensiones 1-100 nm que ejerce fuerzas atractivas sobre las proteínas [149]

Basados en estos argumentos podría explicarse que la mejor respuesta de adhesión celular en ensayos con SFB del cpTi con respecto al SS está relacionada con una mayor adsorción de proteínas más adecuada, guiada por la mayor rugosidad del cpTi y su carga ligeramente negativa a pH fisiológico. La Ra del cpTi aumenta de 35.74 a 63.22 nm, mientras que en el SS, los valores son menores y el aumento es muy sutil de 4.11 a 7.20 nm.

En términos de la diferenciación celular a corto plazo (1 y 7 días) se observó que los resultados del cpTi no fueron tan exitosos como se esperaba considerando que es el biomaterial para implantes ortopédicos por excelencia, mientras que para el SS la diferenciación fue nula. El ensayo de diferenciación celular está relacionado con la biocompatibilidad del material, que involucra que el biomaterial le aporte a las células el ambiente necesario para su desarrollo y/o ciclo vital. De modo que el SS ni antes, ni después del tratamiento posee las propiedades de superficie adecuadas para que las células diferencien o conserven la expresión del RUNX-2. Sin embargo, en cpTi sus propiedades superficiales sí le permiten que después de 7 días de cultivo los osteoblastos comiencen a expresar RUNX-2, e incluso cualitativamente, parece que las muestras tratadas a 7 días son las que mayormente expresaron el marcador. De aquí inferimos que el incremento en espesor de la capa de óxido de Ti lograda después de exponerse a las condiciones de respuesta inflamatorias simuladas (H_2O_2) favorece la biocompatibilidad y capacidad de inducir la diferenciación de osteoblastos del Ti.

7.2 Discusión de cpTi versus cTiO₂ y aTiO₂

En esta sección de discusiones comparamos el efecto de la solución inflamatoria simulada en las propiedades superficiales y de adhesión celular del cpTi versus las películas crecidas de óxido de Ti sobre sustratos de Ti. En general, se observó que el efecto del peróxido en las películas es muy ligero, es decir estas presentan un comportamiento bastante pasivo a la interacción con las especies reactivas de oxígeno. La composición evaluada por XPS de ambas películas mostró

al Ti en valencia +4, excepto por una pequeña componente sub-estequiométrica en la $cTiO_2$. Sin embargo, después del tratamiento, se observó que las muestras era 100 % TiO_2 , sin ningún señal de titanio metálico, lo que también asegura que el recubrimiento es uniforme.

La rugosidad de las películas es del mismo orden de magnitud que el cpTi (35-47 nm). Para los tres materiales se observó un incremento después del tratamiento, aunque en el cpTi el valor de R_a casi se duplicó y en las películas solo aumento un 20%. El cpTi y las películas presentan un comportamiento más hidrofílico después del tratamiento, lo que de acuerdo a la discusión de la sección anterior, indicaría que la adsorción de proteínas no es favorecida. En términos de la energía de superficie, se nota un aumento ligero de la energía total, siendo la componente polar la más afectada y con tendencias opuestas entre las películas cristalinas y amorfas. La consecuencia de estos cambios en la fracción polar puede observarse en la figura 53, es decir, tanto en el cpTi como en la película cristalina, el porcentaje de la fracción polar disminuyó. Mientras que en la película amorfa, el valor inicial era muchísimo menor y aumentó hasta alcanzar valores similares al cpTi-P y $cTiO_2$ -P.

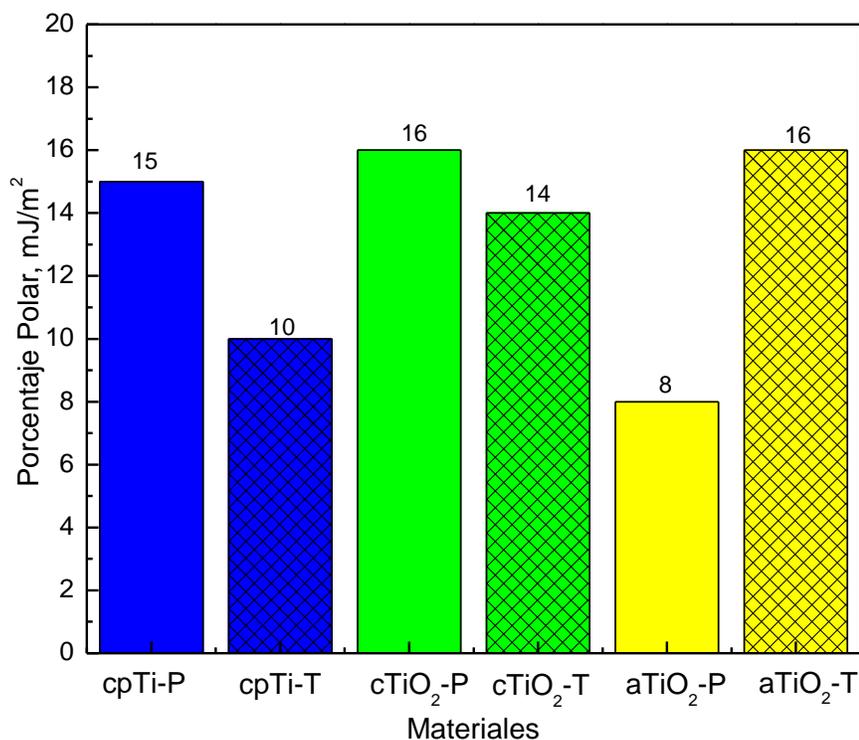


Figura 53. Porcentaje polar de la superficie de los materiales cpTi-P, cpTi-T, $cTiO_2$ -P, $cTiO_2$ -T, $aTiO_2$ -P, $aTiO_2$ -T.

De manera similar, puede observarse que el valor inicial del pzc de las películas amorfa es inferior (4.5 para la de película aTiO₂ y 5.6 para la película de cTiO₂) al del óxido nativo. Después del tratamiento con H₂O₂, las tres muestras alcanzan un valor similar pues en el cpTi-T fue de 6.86 mientras que para la película de cTiO₂ fue de 6.79 y para de la película de aTiO₂ fue de 6.84.

Hasta aquí observamos que en general la película prístina de cTiO₂ es bastante similar al óxido nativo del cpTi después del tratamiento, mientras que la película de aTiO₂ posee diferencias significativas en varias de sus propiedades, lo que concuerda con lo observado por XPS.

Sin embargo, los cambios en la respuesta electroquímica de las películas han resultado más complejos de entender. El OCP, que es la primera medición realizada, muestra muy pocos cambios en función del tiempo de inmersión indicando cierta estabilidad de ambas películas. Sin embargo, parece extraño que el OCP de las películas cristalinas antes y después se mantenga similar a los valores del cpTi-P, mientras que las películas amorfas demuestran tener un valor mucho más pasivo y similar al cpTi-T.

De manera similar, algunos de los resultados de EIS sugieren que la película cristalina prístina hubiese sufrido agrietamiento o delaminación durante la prueba de impedancias porque la resistencia del poro mostrada en la figura 54, es incluso menor que la del óxido nativo en el cpTi-P, mientras que la película amorfa (aTiO₂-P) presenta un R_{poro} casi un orden de magnitud superior, indicando que funciona como una buena barrera. Después del tratamiento con H₂O₂, la R_{poro} en los tres materiales presenta el mismo orden de magnitud, en concordancia con lo obtenido en los otros resultados.

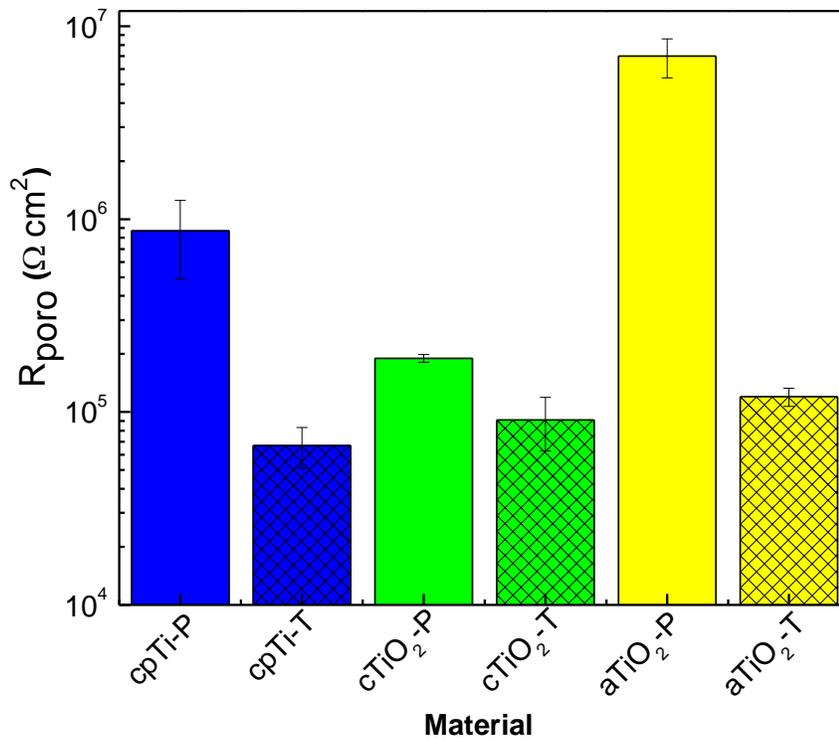


Figura 54. La resistencia de poro en cpTi y en las películas de cTiO₂ y de aTiO₂ antes y después del tratamiento con un ambiente rico en H₂O₂.

El análisis de las curvas potenciodinámicas, concuerda con la posible delaminación del cTiO₂, ya que el cambio en la densidad de corriente de corrosión después del tratamiento con H₂O₂ es el mismo que para el cpTi. Mientras que dicho cambio es casi 4 veces menor en las películas amorfas, como se muestra en la figura 55.

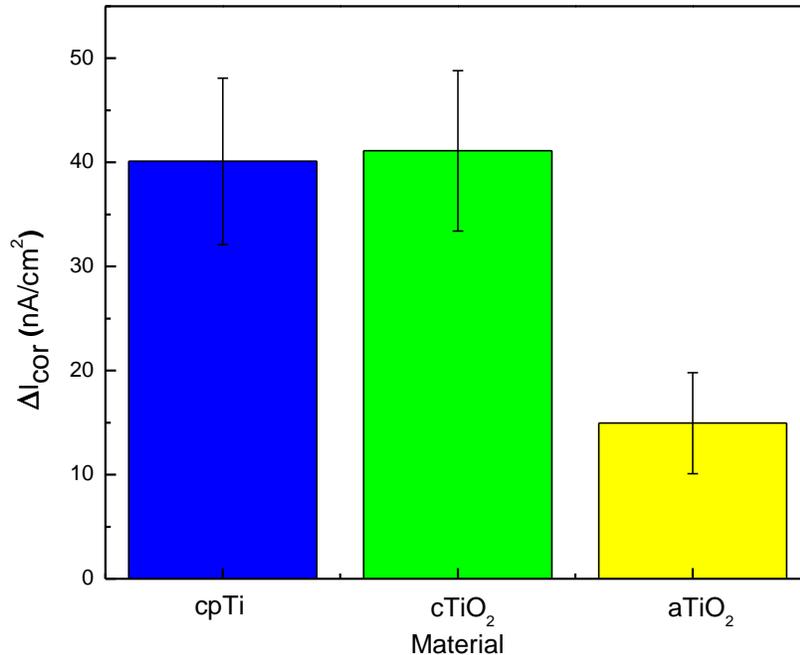


Figura 55. Delta de corriente de corrosión de cpTi y las películas de cTiO₂ y de aTiO₂ después del tratamiento con un ambiente rico en H₂O₂.

Además, se observó que la adhesión celular en las películas de cTiO₂ y de aTiO₂ sin presencia proteínas fue mucho mayor en comparación con el cpTi-T. Sin embargo, cuando sí estuvieron presentes las proteínas, se observó que la adhesión celular fue similar tanto en las películas como en cpTi-T. Con esto se fortalece la teoría que las películas pueden formar fuertes interacciones con grupos hidroxilo OH⁻, los cuales le permiten establecer enlaces de hidrógenos tanto con el agua como con las proteínas.

El tiempo en el cual se llevó a cabo el ensayo de la adhesión celular (90 minutos), corresponde a primeras interacciones de la célula con la superficie del biomaterial, por lo tanto, la química superficial juega un papel muy importante, de modo que la adsorción de las proteínas es determinante en la adhesión celular.

No obstante, en periodos más largos de interacción biomaterial-célula, como es el ensayo de la diferenciación celular, involucra otra propiedad del biomaterial, la cual es la biocompatibilidad, que a su vez esta propiedad es consecuencia de la química superficial.

Los resultados de diferenciación celular dejan claro que las películas de $cTiO_2$ y de $aTiO_2$ son una mejor opción que el $cpTi-T$, pues ambas películas mostraron diferenciación celular desde el primer día de cultivo, mientras que en el $cpTi-T$ la expresión de RUNX-2 apenas comenzaba a mostrarse al día 7. Este resultado en el $cpTi-T$ puede relacionarse al hecho de que la capa de óxido de titanio (IV) que creció sobre el $cpTi-T$ es muy delgada (>10 nm) en comparación con las películas crecidas con *magnetron sputtering* (<70 nm). De modo que el $cpTi$ requiere de una capa de óxido más gruesa para dar resultados comparables a los de las películas de $cTiO_2$ y de $aTiO_2$.

Otro punto importante a mencionar es que no es claro determinar, en términos de los ensayos celulares, cuál película es mejor o el efecto del H_2O_2 , ya que las diferencias en adhesión celular no son estadísticamente significativas. Haciendo un balance de las cualidades de cada una de las películas y para fines prácticos, es claro que la película de $aTiO_2$ es una mejor opción para una aplicación industrial pues su preparación es más sencilla y económica, además la respuesta electroquímica del $aTiO_2$ es más similar al $cpTi-T$ y no vemos indicaciones de posibles delaminaciones.

8. CONCLUSIONES

La película de óxido que crece en el cpTi después de la inmersión durante 7 días en soluciones Hartmann con 50 mM de H_2O_2 , que simulan el ambiente químico de la respuesta inflamatoria, posee propiedades de superficie tales como la composición química, la mojabilidad y la carga en superficie, que, definitivamente mejoran la biocompatibilidad de este metal.

Por lo tanto, la funcionalidad del cpTi como biomaterial incrementa debido a los cambios superficiales sufridos por el tratamiento con H_2O_2 , mientras que para el SS el H_2O_2 disminuye su biocompatibilidad. Es decir, la respuesta de estos dos metales sometidos al mismo ambiente químico es muy diferente, corroborando la idea de que el titanio tiene características exclusivas en su funcionamiento biológico.

Al comparar el cpTi con películas de óxido de titanio crecidas por evaporación catódica, pudimos corroborar que la biocompatibilidad del titanio es más bien consecuencia de la capa de óxido nativo. Sin embargo, dicha capa incluso después del tratamiento con H_2O_2 , que indujo su crecimiento en espesor, no es lo suficientemente "biocompatible" para asegurar una buena interacción directa con las células, como pudo corroborarse en los ensayos de adhesión celular sin presencia de suero fetal bovino. Dichos ensayos mostraron que ambas películas cTiO₂ y aTiO₂ permiten un alto porcentaje de adhesión (~80%) mientras que el cpTi aún después del tratamiento apenas alcanza el 40%. En los ensayos de adhesión con SFB, tanto el cpTi como las películas presentan porcentajes de adhesión similar, sugiriendo que la presencia de las proteínas en el medio modula la interacción con las células y en tal caso, las propiedades de la capa de óxido del cpTi son adecuadas para ofrecer una buena adhesión celular. Además, los cambios superficiales inducidos en el cpTi debido a la respuesta inflamatoria simulada, que conllevan a un crecimiento de la capa de óxido, mejoran a su vez la adhesión celular. Es decir, películas de TiO₂ de mayor espesor promueven una mejor adhesión celular e incluso en el cTiO₂ y aTiO₂ (espesores del orden de 60-80 nm) se observó una mayor expresión del marcador RUNX-2 de diferenciación osteoblástica.

Finalmente, ambas películas son una excelente opción para recubrir implantes metálicos de reemplazo óseo sustituyendo a los implantes basados en cpTi. Los resultados indican que la película de aTiO₂ es la mejor, pues los resultados electroquímicos mostraron que esta película es más resistente, además su fabricación es más rentable ya que no requiere calentamiento para su síntesis como el cTiO₂.

9. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

1. *The effect of simulated inflammatory conditions on the surface properties of titanium and stainless steel and their importance as biomaterials.* **Abril Fonseca-García**, J. Pérez-Alvarez, C.C. Barrera, J.C. Medina, A. Almaguer-Flores, R. Basurto Sánchez, Sandra E. Rodil, 66, 119-129, 2016.
2. *Reduction of the coefficient of friction of niobium nitride coatings by the addition of bismuth.* Roberto Mirabal-Rojas, Osmar Depablos-Rivera, Celia L. Gomez, **Abril Fonseca-Garcia**, Juan C. Medina, Cecilia C. Barrera-Ortega, Jonatan Perez-Alvarez, Stephen Muhl, Enrique Camps, Sandra E. Rodil, Vacuum, 125, 146-153, 2016.
3. *Sputtered bismuth oxide thin films as a potential photocatalytic material.* J.C. Medina, M. Bizarro, C.L. Gomez, O. Depablos-Rivera, R. Mirabal-Rojas, B.M. Monroy, **A. Fonseca-Garcia**, J. Perez-Alvarez, S.E. Rodil, Catalysis Today, 266, 144-152, 2016.

10. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Como poster:

1. *Effect of the hydrogen peroxide on the corrosion behaviour of titanium surfaces*, **Abril Fonseca García**, Jonatan Pérez Alvarez, Argelia Almaguer Flores, Sandra Elizabeth Rodil Posada, VII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, Ensenada, Baja California, México, 2014.
2. *Efecto del peróxido de Hidrógeno en el proceso de corrosión en de superficies de titanio*, **Abril Fonseca García**, Jonatan Pérez Alvarez, Argelia Almaguer Flores, Sandra Elizabeth Rodil Posada, 1er Congreso de la Red BIT, Ciudad de México, México, 2014.
3. *Respuesta de titanio en un Medio biológico Simulado*, **Abril Fonseca García**, Jonatán Perez Alvarez, Argelia Almaguer Flores, Sandra Rodil Posada, 3er SIMPOSIO DE ESTUDIANTES ASOCIADOS DEL IIM-UNAM, Ciudad de México, México, 2015.
4. *Study of surface phenomena on titanium and its oxides due to its treatment with hydrogen peroxide*, **Abril Fonseca García**, Jonatán Pérez Álvarez , Argelia Almaguer Flores , Sandra Elizabeth Rodil, 10th World Biomaterials Congress, Montreal, Mpexico, 2016.
5. *Cell adhesion on titanium and titanium oxides*, **A. Fonseca-García**, E.K. Ruvalcaba-Paredes, D. Garciadiedo, J. Perez-Alvarez, M.C. Velasquillo, A. A. Flores, S. E. Rodil, XXV International Materials Research Congress, Cancún, Quintana Roo, México, 2016.

Como potencia:

1. *Surface phenomena on titanium due to treatment with hydrogen peroxide*, **A. Fonseca García**, J. Perez Alvarez, Mauro Giorcelli, A. Almaguer Flores, Sandra E. Rodil, XXIV International Materials Research Congress, Cancún, Quintana Roo, México, 2015.
2. *Surface characterization of titanium surfaces before and after exposition to an hydrogen peroxide ambient*, **Abril Fonseca-García**, Jonatán Pérez Alvarez, Mauro Giorcelli, Argelia Almaguer-Flores, Sandra E. Rodil. VIII

International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum. Puebla, Puebla, México, 2015.

3. *Effect of peroxide on surfaces of titanium and stainless steel to enhance cell adhesion*, **A. Fonseca-García**, E.K. Ruvalcaba-Paredes, D. Garciadiedo, J. Perez-Alvarez, M.C. Velasquillo, A. A. Flores, S. E. Rodil, XXV International Materials Research Congress, Cancún, Quintana Roo, México, 2016.

11. REFERENCIAS

1. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.
2. Bauer, S., et al., *Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces*. Progress in Materials Science, 2013. **58**(3): p. 261-326.
3. Eisenbarth, E., et al., *Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys*. Biomaterials, 2004. **25**(26): p. 5705-5713.
4. Long, M. and H.J. Rack, *Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective*. Biomaterials, 1998. **19**(18): p. 1621-1639.
5. Palmquist, A., et al., *Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome*. Journal of the Royal Society Interface, 2010. **7**: p. S515-S527.
6. Rack, H.J. and J.I. Qazi, *Titanium alloys for biomedical applications*. Materials Science and Engineering: C, 2006. **26**(8): p. 1269-1277.
7. Hill, C.S., et al., *Titanium cranioplasty and the prediction of complications*. British journal of neurosurgery, 2012. **26**(6): p. 832-837.
8. Wiggins, A., et al., *Cranioplasty with custom-made titanium plates—14 years experience*. Neurosurgery, 2013. **72**(2): p. 248-256.
9. Available from: <https://spanish.alibaba.com/g/titanium-skull-mesh-implant.html>.
10. Lu, J., et al., *Decreased platelet adhesion and enhanced endothelial cell functions on nano and submicron-rough titanium stents*. Tissue Engineering Part A, 2012. **18**(13-14): p. 1389-1398.
11. O'Brien, B. and W. Carroll, *The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: A review*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(4): p. 945-958.
12. Li, J.P., et al., *Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition*. Biomaterials, 2007. **28**(18): p. 2810-2820.
13. Turna, A., et al., *Reconstruction with a patient-specific titanium implant after a wide anterior chest wall resection*. Interactive cardiovascular and thoracic surgery, 2014. **18**(2): p. 234-236.
14. Protesis de pierna Available from <http://protesisdepiernas.com.mx/>
15. Abrahamsson, I., et al., *The peri-implant hard and soft tissues at different implant systems - A comparative study in the dog*. Clinical Oral Implants Research, 1996. **7**(3): p. 212-219.

16. Kang, I.H., et al., *A comparative study on the initial stability of different implants placed above the bone level using resonance frequency analysis*. Journal of Advanced Prosthodontics, 2011. **3**(4): p. 190-195.
17. Karoussis, I.K., et al., *Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI (R) Dental Implant System*. Clinical Oral Implants Research, 2004. **15**(1): p. 8-17.
18. van Steenberghe, D., et al., *A prospective split-mouth comparative study of two screw-shaped self-tapping pure titanium implant systems*. Clinical Oral Implants Research, 2000. **11**(3): p. 202-209.
19. *Survey Reveals Increase in Dental Implants Over Five-Year Period*. ADA. 2007, American Dental Association.
20. Adell, R., et al., *A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw*. International Journal of Oral Surgery, 1981. **10**(6): p. 387-416.
21. Norowski, P.A. and J.D. Bumgardner, *Biomaterial and Antibiotic Strategies for Peri-implantitis*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2009. **88b**(2): p. 530-543.
22. Mouhyi, J., D.M. Dohan, and T. Albrektsson, *The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects*. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2012. **14**(2): p. 170-183.
23. Liu, X.Y., P.K. Chu, and C.X. Ding, *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science & Engineering R-Reports, 2004. **47**(3-4): p. 49-121.
24. Brånemark, P.I., *Vital microscopy of bone marrow in rabbit*. 1959: Berlingska Boktryckeriet.
25. Brånemark, P.I., *Osseointegration and its experimental background*. The Journal of prosthetic dentistry, 1983. **50**(3): p. 399-410.
26. Branemark, R., et al., *Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: A review*. Journal of Rehabilitation Research and Development, 2001. **38**(2): p. 175-181.
27. Lausmaa, J., B. Kasemo, and S. Hansson, *Accelerated Oxide-Growth on Titanium Implants during Autoclaving Caused by Fluorine Contamination*. Biomaterials, 1985. **6**(1): p. 23-&.

28. Lausmaa, J. and L. Linder, *Surface Spectroscopic Characterization of Titanium Implants after Separation from Plastic-Embedded Tissue*. *Biomaterials*, 1988. **9**(3): p. 277-280.
29. Ravanetti, F., et al., *In vitro cellular response and in vivo primary osteointegration of electrochemically modified titanium*. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**(3): p. 1014-1024.
30. Atapour, M., et al., *Corrosion behavior of beta titanium alloys for biomedical applications*. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2011. **31**(5): p. 885-891.
31. Geetha, M., et al., *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review*. *Progress in Materials Science*, 2009. **54**(3): p. 397-425.
32. Kumar, S. and T.S.N.S. Narayanan, *Electrochemical characterization of beta-Ti alloy in Ringer's solution for implant application*. *Journal of Alloys and Compounds*, 2009. **479**(1-2): p. 699-703.
33. Niinomi, M., *Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2008. **1**(1): p. 30-42.
34. Niinomi, M., M. Nakai, and J. Hieda, *Development of new metallic alloys for biomedical applications*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(11): p. 3888-3903.
35. Elias, C., et al., *Biomedical applications of titanium and its alloys*. *Jom*, 2008. **60**(3): p. 46-49.
36. Tengvall, P., et al., *Interaction between hydrogen peroxide and titanium: a possible role in the biocompatibility of titanium*. *Biomaterials*, 1989. **10**(2): p. 118-120.
37. Tengvall, P., et al., *Titanium-hydrogen peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants*. *Biomaterials*, 1989. **10**(3): p. 166-175.
38. Pan, J., D. Thierry, and C. Leygraf, *Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application*. *Electrochimica Acta*, 1996. **41**(7): p. 1143-1153.
39. Fonseca, C. and M.A. Barbosa, *Corrosion behaviour of titanium in biofluids containing H₂O₂ studied by electrochemical impedance spectroscopy*. *Corrosion Science*, 2001. **43**(3): p. 547-559.
40. Beringer, J.P., C.A. Orme, and J.L. Gilbert, *Direct observation of hydration of TiO₂ on Ti using electrochemical AFM: freely corroding versus potentiostatically held*. *surface science*, 2001. **491**(3): p. 370-387.

41. Bearinger, J.P., C.A. Orme, and J.L. Gilbert, *Effect of hydrogen peroxide on titanium surfaces: In situ imaging and step-polarization impedance spectroscopy of commercially pure titanium and titanium, 6-aluminum, 4-vanadium*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **67A**(3): p. 702-712.
42. Brooks, E., et al., *The influence of cathodic polarization and simulated inflammation on titanium electrochemistry*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2014. **102**(7): p. 1445-1453.
43. metalográfica, P.; Available from: <http://www.cientec.com.mx/productos-pulidora-y-esmeriladora-metalografica-de-un-solo-plato-forcipol-1v-1016>.
44. Wei Tiwei, C.J., Wang Qian, Hu Yang, Wang Lu, Liu Ziyu, Wu Zijian, *Optimization and Evaluation of Sputtering Barrier/Seed Layer in Through Silicon Via for 3-D Integration*. Tsinghua Science and Technology, 2014. **19**(2): p. 150-160.
45. Kelly, P. and R. Arnell, *Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications*. Vacuum, 2000. **56**(3): p. 159-172.
46. Surmenev, R.A., *A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication*. Surface and Coatings Technology, 2012. **206**(8): p. 2035-2056.
47. *DIFRACCIÓN DE BRAGG*. Available from: <http://servicios.fis.puc.cl/rayosx/teoria.html>.
48. Kittel, C., *Introduction to Solid State Physics. Sixth Edition*. 1995, New York, U.S.A.: John Wiley and Sons, Inc.
49. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang. *Foreign body reaction to biomaterials*. in *Seminars in immunology*. 2008. Elsevier.
50. Bandyopadhyay, U., D. Das, and R.K. Banerjee, *Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis*. CURRENT SCIENCE-BANGALORE-, 1999. **77**: p. 658-666.
51. REID, F., et al., *(Ab)normal saline and physiological Hartmann's solution: a randomized double-blind crossover study*. Clinical Science, 2003. **104**(1): p. 17-24.
52. Karthega, M., S. Nagarajan, and N. Rajendran, *In vitro studies of hydrogen peroxide treated titanium for biomedical applications*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(6): p. 2201-2209.
53. Kokubo, T. and H. Takadama, *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* Biomaterials, 2006. **27**(15): p. 2907-2915.
54. Heide, P.v.d., *X-ray Photoelectron Spectroscopy: An introduction to Principles and Practices*. 2011: John Wiley & Sons. 256.

55. González, J.J.d.D., *Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos*. 2000, Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
56. Meyer, E., *Atomic force microscopy*. Progress in Surface Science, 1992. **41**(1): p. 3-49.
57. Rugar, D. and P. Hansma, *Atomic force microscopy*. Physics today, 1990. **43**(10): p. 23-30.
58. Inc, V.I., *DEKTAK 150 SURFACE PROFILER USER'S MANUAL*. 2007.
59. Wang, H. and P.K. Chu, *Characterization of Biomaterials: Chapter 4. Surface Characterization of Biomaterials*. 2013: Elsevier Inc. Chapters.
60. Packham, D.E., *Surface energy, surface topography and adhesion*. International Journal of Adhesion and Adhesives, 2003. **23**(6): p. 437-448.
61. Gennaro, A.R., *Remington: Farmacia*. 2003: Editorial Médica Panamericana.
62. Young, T., *An essay on the cohesion of fluids*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1805. **95**: p. 65-87.
63. Guo, Z. and L. Tan, *Fundamentals and Applications of Nanomaterials*. 2009: Artech House.
64. Hornyak, G.L., et al., *Introduction to Nanoscience*. 2008: CRC Press.
65. Kwok, D.Y. and A.W. Neumann, *Contact angle measurement and contact angle interpretation*. Advances in Colloid and Interface Science, 1999. **81**(3): p. 167-249.
66. Feng, L., et al., *Super-hydrophobic surfaces: from natural to artificial*. Advanced materials, 2002. **14**(24): p. 1857-1860.
67. Bico, J., U. Thiele, and D. Quéré, *Wetting of textured surfaces*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. **206**(1-3): p. 41-46.
68. McHale, G., N. Shirtcliffe, and M. Newton, *Contact-angle hysteresis on super-hydrophobic surfaces*. Langmuir, 2004. **20**(23): p. 10146-10149.
69. Tadanaga, K., et al., *Superhydrophobic-superhydrophilic micropatterning on flowerlike alumina coating film by the sol-gel method*. Chemistry of materials, 2000. **12**(3): p. 590-592.
70. Berg, J.M., et al., *Three-component Langmuir-Blodgett films with a controllable degree of polarity*. Langmuir, 1994. **10**(4): p. 1225-1234.
71. Vogler, E.A., *Protein adsorption in three dimensions*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1201-1237.
72. Vogler, E.A., *Water and the acute biological response to surfaces*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1999. **10**(10): p. 1015-1045.

73. Żenkiewicz, M., *Methods for the calculation of surface free energy of solids*. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, 2007. **24**(1): p. 137-145.
74. Fowkes, F.M., *Calculation of work of adhesion by pair potential summation*. Journal of colloid and interface science, 1968. **28**(3-4): p. 493-505.
75. Fowkes, F.M., *Donor-acceptor interactions at interfaces*. The Journal of Adhesion, 1972. **4**(2): p. 155-159.
76. Van Oss, C.J., *Interfacial forces in aqueous media*. 2006: CRC press.
77. Rieke, P.C., *Application of Van Oss-Chaudhury-Good theory of wettability to interpretation of interfacial free energies of heterogeneous nucleation*. Journal of Crystal Growth, 1997. **182**(3): p. 472-484.
78. Xu, Z., Q. Liu, and J. Ling, *An evaluation of the van Oss-Chaudhury-Good equation and Neumann's equation of state approach with mercury substrate*. Langmuir, 1995. **11**(3): p. 1044-1046.
79. Van Oss, C.J., M.K. Chaudhury, and R.J. Good, *Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems*. Chemical Reviews, 1988. **88**(6): p. 927-941.
80. Kwok, D.Y., *The usefulness of the Lifshitz-van der Waals/acid-base approach for surface tension components and interfacial tensions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. **156**(1-3): p. 191-200.
81. Franks, G.V. and L. Meagher, *The isoelectric points of sapphire crystals and alpha-alumina powder*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. **214**(1): p. 99-110.
82. Gulicovski, J.J., L.S. Čerović, and S.K. Milonjić, *Point of zero charge and isoelectric point of alumina*. Materials and Manufacturing Processes, 2008. **23**(6): p. 615-619.
83. Kosmulski, M., *Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature*. Advances in Colloid and Interface Science, 2009. **152**(1-2): p. 14-25.
84. Almaguer-Flores, A., et al., *Bacterial adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings*. Materials Science and Engineering: C, 2015. **57**: p. 88-99.
85. Arima, Y. and H. Iwata, *Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers*. Biomaterials, 2007. **28**(20): p. 3074-3082.

86. Hallab, N., et al., *Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology*. Journal of long-term effects of medical implants, 1994. **5**(3): p. 209-231.
87. Lück, M., et al., *Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics*. Journal of biomedical materials research, 1998. **39**(3): p. 478-485.
88. Silva-Bermudez, P., S.E. Rodil, and S. Muhl, *Albumin adsorption on oxide thin films studied by spectroscopic ellipsometry*. Applied Surface Science, 2011. **258**(5): p. 1711-1718.
89. Wang, Z., et al., *Mechanisms of protein adhesion on surface films of hydrophobin*. Langmuir, 2010. **26**(11): p. 8491-8496.
90. Xu, L.-C. and C.A. Siedlecki, *Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces*. Biomaterials, 2007. **28**(22): p. 3273-3283.
91. Hepler, L.G., *Chemical Principles*. 1968: Editorial Reverté.
92. Vidal, C.V. and A.I. Muñoz, *Electrochemical aspects in biomedical alloy characterization: electrochemical impedance spectroscopy*. 2011: INTECH Open Access Publisher Rijeka.
93. Landolt, D., *Corrosion and surface chemistry of metals*. 2007: CRC Press.
94. Martín, J.M.A., *Láminas delgadas y recubrimientos: preparación, propiedades y aplicaciones*. 2003: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
95. Calderón, J., O. Mattos, and O. Barcia, *Análisis de la evolución del potencial de circuito abierto del cobalto en medio levemente alcalino*. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia, 2006. **38**: p. 20-30.
96. Barsoukov, E. and J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. 2005: Wiley.
97. *Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy Gamry*. Available from: <http://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>.
98. Evgenij Barsoukov, J.R.M., *Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications, Second Edition*. Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons, Inc.
99. Muñoz, A.I., et al., *The effect of chromate in the corrosion behavior of duplex stainless steel in LiBr solutions*. Corrosion Science, 2006. **48**(12): p. 4127-4151.
100. Zheng, Y., *Magnesium Alloys as Degradable Biomaterials*. 2016, New York: Taylor and Francis Group.

101. Kirkland, N., N. Birbilis, and M. Staiger, *Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: a critical review of current methodologies and their limitations*. Acta biomaterialia, 2012. **8**(3): p. 925-936.
102. Uhlig, H.H. and C. King, *Corrosion and corrosion control*. Journal of The Electrochemical Society, 1972. **119**(12): p. 327C-327C.
103. Zhang, X., et al., *Effects of scan rate on the potentiodynamic polarization curve obtained to determine the Tafel slopes and corrosion current density*. Corrosion Science, 2009. **51**(3): p. 581-587.
104. Munoz, A.I. and L.C. Julián, *Influence of electrochemical potential on the tribocorrosion behaviour of high carbon CoCrMo biomedical alloy in simulated body fluids by electrochemical impedance spectroscopy*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(19): p. 5428-5439.
105. García, A.J., *Get a grip: integrins in cell–biomaterial interactions*. Biomaterials, 2005. **26**(36): p. 7525-7529.
106. Keselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. García, *Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(17): p. 5953-5957.
107. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4385-4415.
108. Roach, P., D. Farrar, and C.C. Perry, *Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(22): p. 8168-8173.
109. Anselme, K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21**(7): p. 667-681.
110. Humphries, M.J., *Cell adhesion assays*. Extracellular Matrix Protocols: Second Edition, 2009: p. 203-210.
111. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-497.
112. G. Palomero, M.T.V., J.A. Vega, F.J. Naves, C. Rodríguez, *Lecciones de embriología*. 2000: Servicio de Publicaciones. Universidad de Oviedo. . 561.
113. Sadava, D. and W.H. Purves, *Vida / Life: La ciencia de la biología / The Science of Biology*. 2009: Médica Panamericana.
114. Aubin, J., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone, 1995. **17**(2): p. S77-S83.

115. Zimmerman, L.B., J.M. De Jesús-Escobar, and R.M. Harland, *The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4*. Cell, 1996. **86**(4): p. 599-606.
116. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth factors, 2004. **22**(4): p. 233-241.
117. Le Roith, D., *Insulin-like growth factors*. New England Journal of Medicine, 1997. **336**(9): p. 633-640.
118. Neer, R.M., et al., *Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis*. New England journal of medicine, 2001. **344**(19): p. 1434-1441.
119. Segre, G.V. and S.R. Goldring, *Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1993. **4**(10): p. 309-314.
120. Song, L. and R.S. Tuan, *Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow*. The FASEB Journal, 2004. **18**(9): p. 980-982.
121. Fujita, T., et al., *Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling*. The Journal of cell biology, 2004. **166**(1): p. 85-95.
122. Sugano, M. and C. Gilmore, *A crystallographic study of fatigue damage in titanium*. Metallurgical Transactions A, 1980. **11**(4): p. 559-563.
123. McCafferty, E. and J.P. Wightman, *An X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium*. Applied Surface Science, 1999. **143**(1-4): p. 92-100.
124. Hanawa, T., et al., *XPS Characterization of the Surface Oxide Film of 316L Stainless Steel Samples that were Located in Quasi-Biological Environments*. Materials transactions, 2002. **43**(12): p. 3088-3092.
125. Silverthorn, D.U., *Fisiología humana*. 2008: Ed. Médica Panamericana.
126. González, J.E.G. and J.C. Mirza-Rosca, *Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999. **471**(2): p. 109-115.

127. Dhoke, S.K. and A. Khanna, *Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) study of nano-alumina modified alkyd based waterborne coatings*. Progress in Organic Coatings, 2012. **74**(1): p. 92-99.
128. Magana-Zavala, C., et al., *Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) modelling of different behaviours of Ni and Ni oxide thin films for corrosion prevention in sour media*. Anti-Corrosion Methods and Materials, 2010. **57**(3): p. 118-125.
129. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
130. Ren, X.D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz, *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. The EMBO journal, 1999. **18**(3): p. 578-585.
131. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-399.
132. Guo, S., et al., *Parallel control over surface charge and wettability using polyelectrolyte architecture: effect on protein adsorption and cell adhesion*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016.
133. Cui, X., et al., *Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation*. Dental materials, 2009. **25**(1): p. 80-86.
134. Kim, H.M., et al., *Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment*. Journal of biomedical materials research, 1996. **32**(3): p. 409-417.
135. Kokubo, T., et al., *Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals*. Journal of the American Ceramic Society, 1996. **79**(4): p. 1127-1129.
136. Song, H.-J., et al., *Surface characteristics and bioactivity of oxide films formed by anodic spark oxidation on titanium in different electrolytes*. Journal of Materials Processing Technology, 2009. **209**(2): p. 864-870.
137. Yang, B., et al., *Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment*. Biomaterials, 2004. **25**(6): p. 1003-1010.
138. Hugot-Le Goff, A., *Structure of very thin TiO₂ films studied by Raman spectroscopy with interference enhancement*. Thin Solid Films, 1986. **142**(2): p. 193-197.
139. Vogler, E.A., *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 1998. **74**(1-3): p. 69-117.

140. Menzies, K.L. and L. Jones, *The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials*. Optometry & Vision Science, 2010. **87**(6): p. 387-399.
141. Hallab, N.J., et al., *Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion*. Tissue engineering, 2001. **7**(1): p. 55-71.
142. Ponsonnet, L., et al., *Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour*. Materials Science and Engineering: C, 2003. **23**(4): p. 551-560.
143. Anselme, K., et al., *Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses*. Journal of biomedical materials research, 2000. **49**(2): p. 155-166.
144. Huang, H.-H., et al., *Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion*. Biomolecular engineering, 2004. **21**(3): p. 93-97.
145. Lampin, M., et al., *Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration*. Journal of biomedical materials research, 1997. **36**(1): p. 99-108.
146. Tsapikouni, T.S., S. Allen, and Y.F. Missirlis, *Measurement of interaction forces between fibrinogen coated probes and mica surface with the atomic force microscope: The pH and ionic strength effect*. Biointerphases, 2008. **3**(1): p. 1-8.
147. Lestelius, M., B. Liedberg, and P. Tengvall, *In vitro plasma protein adsorption on ω -functionalized alkanethiolate self-assembled monolayers*. Langmuir, 1997. **13**(22): p. 5900-5908.
148. Tengvall, P., I. Lundström, and B. Liedberg, *Protein adsorption studies on model organic surfaces: an ellipsometric and infrared spectroscopic approach*. Biomaterials, 1998. **19**(4-5): p. 407-422.
149. Gongadze, E., et al., *Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface*. International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 1801.

12. ANEXOS

Anexo1

Programa para calcular energía de superficie

Recordando, el modelo VCG se describe mediante la ecuación del mismo nombre, la cual se describe en la ecuación 1 que se muestra a continuación:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} \right) \quad 1$$

Donde:

θ es el ángulo de contacto.

γ_L es la energía superficial del líquido de prueba.

γ_S^{LW} , γ_L^{LW} son las energías superficiales que consideran la interacción apolar o dispersiva (LW) de la superficie sólida de análisis y del líquido de prueba, respectivamente.

$\gamma_L^+\gamma_L^-$ y $\gamma_S^+\gamma_S^-$ son las interacciones ácido y base de la componente polar del líquido de prueba y la superficie sólida de análisis, respectivamente.

γ_L^{AB} y γ_S^{AB} son la interacción polar del líquido de prueba y de la superficie sólida de análisis, respectivamente. $\gamma_L = \gamma_L^{LW} + \gamma_L^{AB}$ y $\gamma_S = 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_S^-}$.

Las incógnitas en la ecuación 1, son la componente dispersiva de la energía superficial de los material, γ_S^{LW} , la interacción ácida de energía superficial del materia γ_S^+ , y la interacción básica de energía superficial del material γ_S^- .

Para encontrar los valores de esas incógnitas, es necesario utilizar tres líquidos, en nuestro caso se utilizó, agua (A), formamida (F) y diyodometano (D), para generar tres ecuaciones (ecuaciones 2, 3 y 4), de tal manera que al introducir los valores de las constantes conocidas para cada líquido nos queda un sistema de ecuaciones, como se muestra a continuación:

$$(1 + \cos \theta_A)(72.8) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} \right) \quad 2$$

$$(1 + \cos \theta_F)(58) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} \right) \quad 3$$

$$(1 + \cos \theta_D)(50.8) = 2(\sqrt{\gamma_D^{LW}} + \sqrt{50.8}) \quad 4$$

El sistema de ecuaciones se puede reescribir en forma matricial, de la forma $AX=Y$, cómo se muestra en la ecuación 5:

$$\begin{pmatrix} 2\sqrt{21.8} & 2\sqrt{25.5} & 2\sqrt{25.5} \\ 2\sqrt{39} & 2\sqrt{39} & 2\sqrt{2.28} \\ 2\sqrt{50.8} & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \sqrt{\gamma_S^{LW}} \\ \sqrt{\gamma_S^+} \\ \sqrt{\gamma_S^-} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (1 + \cos \theta_A)(72.8) \\ (1 + \cos \theta_F)(58) \\ (1 + \cos \theta_D)(50.8) \end{pmatrix} \quad 5$$

Este sistema matricial se puede resolver por varios métodos muy conocidos del algebra lineal. Debido que en nuestro caso se midió el ángulo de contacto 12 veces para cada líquido. Tomando todas sus posibles combinaciones se tendría que resolver 1728 veces el sistema de ecuaciones, por lo que se decidió hacer un programa que resolviera el sistema de ecuaciones.

Para ello se puede utilizar una gran variedad de softwares que ya tienen preprogramada la solución de los sistemas de ecuaciones iguales a las que requeríamos resolver. En este tipo de softwares la solución del este sistema de ecuaciones, el usuario sólo tiene que introducir las matrices que se genera del sistema de ecuaciones lineales.

En nuestro caso se utilizó **Labview**, que es un **lenguaje de programación gráfica**, haciendo más fácil la programación.

El programa, consiste en **ciclos for anidados**, para que vayan iterando los valores de los ángulos de contacto de los tres líquidos. En la figura 1 se presenta la plataforma o panel que ve el usuario el programa, se etiquetó a las variables de entrada, tal cual se llaman en la ecuación 1, también se despliegan los datos calculados para que el usuario observe los valores calculados, finalmente los datos los guarda en una hoja de Excel para su uso en otros análisis.

Labview tiene una aplicación para resolver sistemas de ecuaciones en la cual se introducen dos matrices, una matriz rectangular o cuadrada (A) y otra matriz columna (Y), esta aplicación **funciona resolviendo una ecuación de la forma $AX=Y$** .

Además, se calcularon la energía superficial total de la superficie del material, γ_s : ecuación 6

$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad 6$$

La energía polar de la superficie del material se define en la ecuación 7:

$$\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} \quad 7$$

A continuación se muestra en las figuras 2-6 los diagramas de flujos de datos que se empleó utilizando Labview.

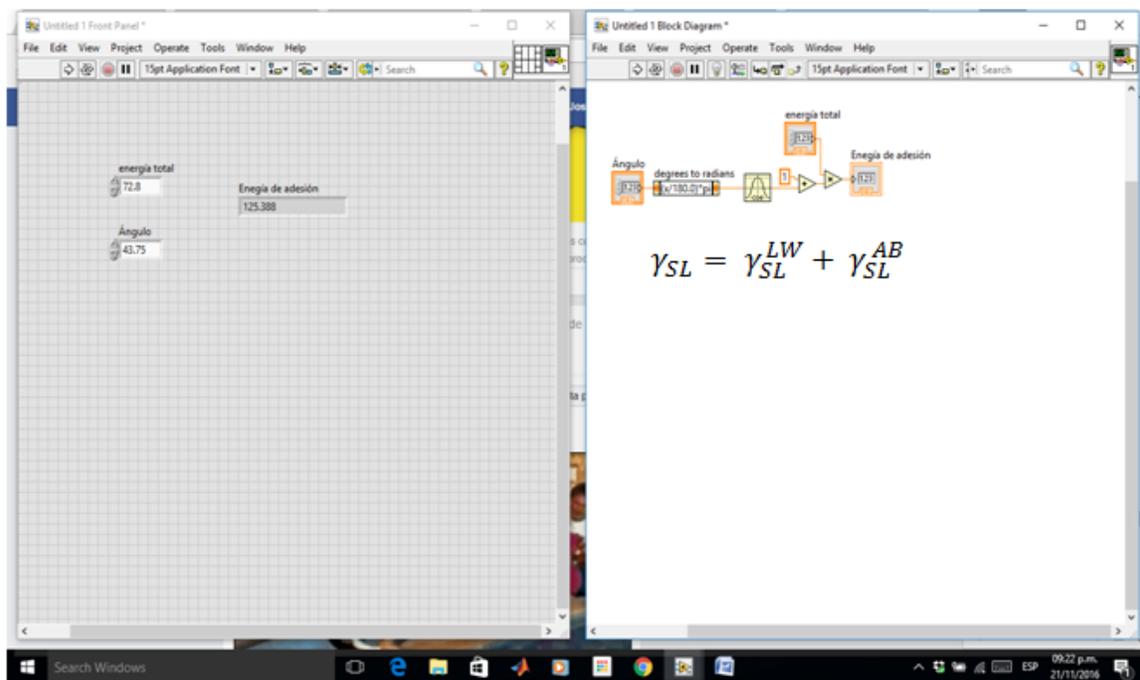


Figura 2. Diagrama de flujo del programa empleado el cálculo de la energía de superficie en Labview.

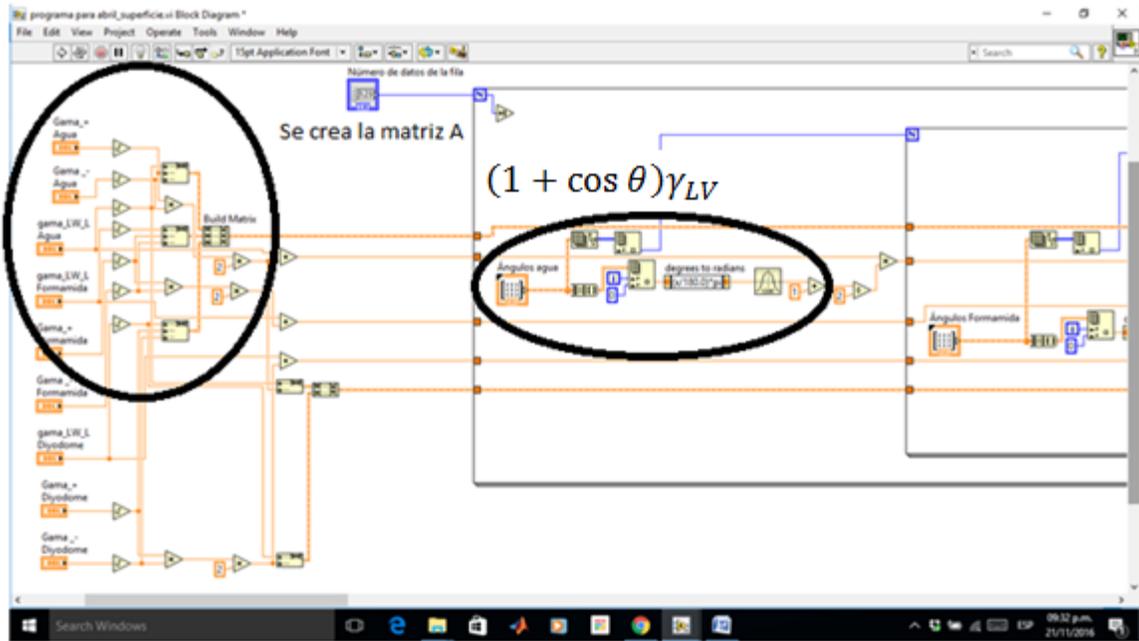


Figura 3. Diagrama de flujo del programa empleado el cálculo de la energía de superficie en Labview.

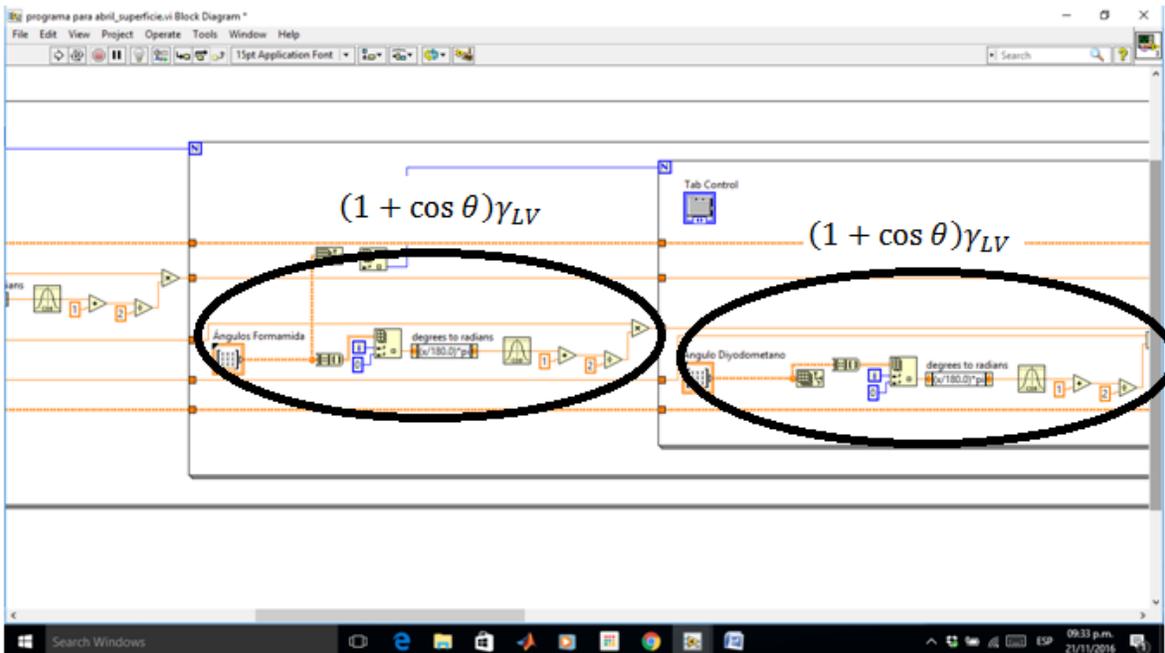


Figura 4. Diagrama de flujo del programa empleado el cálculo de la energía de superficie en Labview.

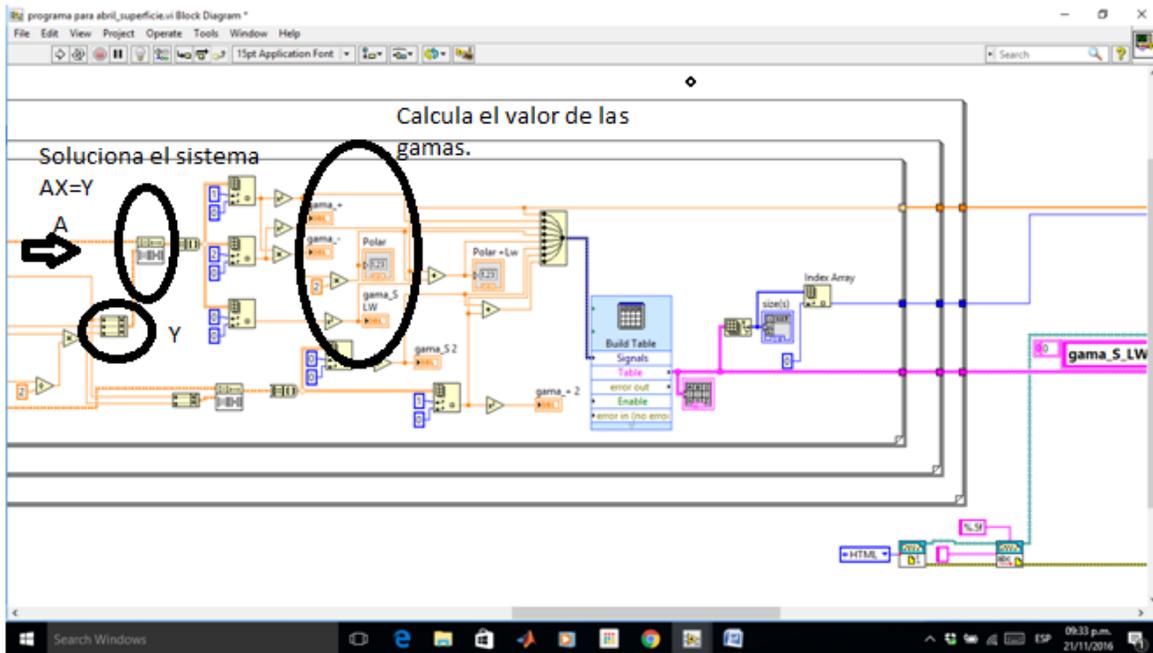


Figura 5. Diagrama de flujo del programa empleado el cálculo de la energía de superficie en Labview.

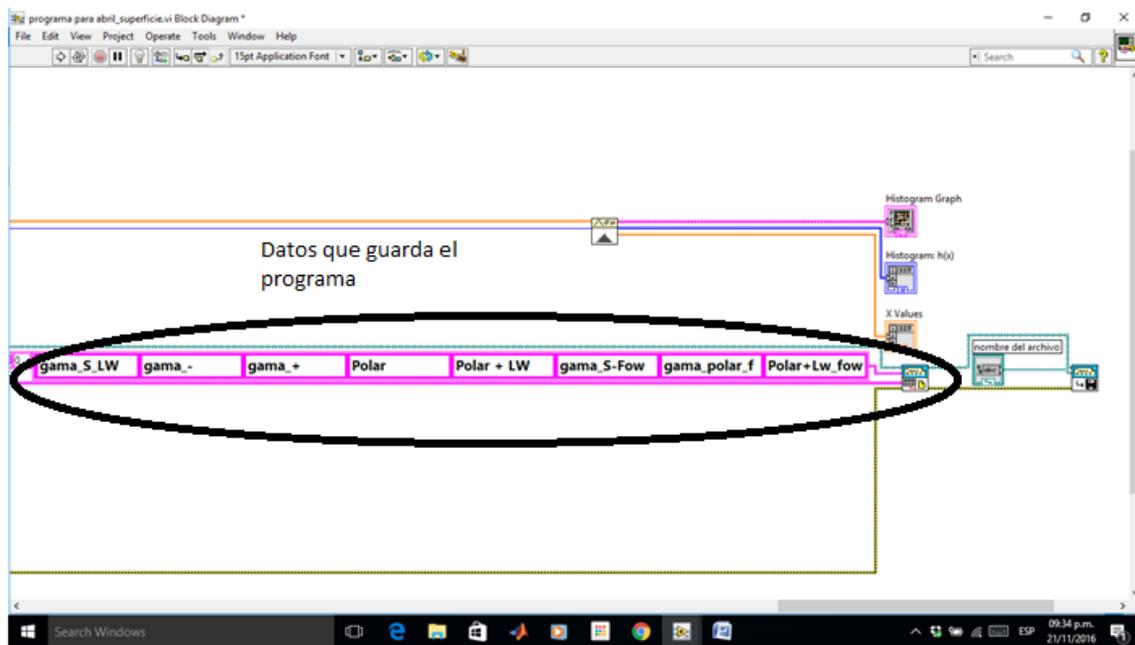


Figura 6. Diagrama de flujo del programa empleado el cálculo de la energía de superficie en Labview.

Anexo 2

Voltamperometría cíclica de los materiales

La voltamperometría cíclica de cpTi se observa en la figura 1, de manera general el material respondió como un sistema reversible el cual muestra los estados de oxidación y de reducción del metal ($Ti^{4+} \rightarrow Ti^{3+} \rightarrow Ti^{2+} \rightarrow Ti^0$, va de $3V \rightarrow -0.770V \rightarrow -0.525V \rightarrow 0.235V$, respectivamente), los parámetros correspondientes al pico catódico (E_{pC}), potencial del pico anódico (E_{pA}), intensidad de corriente catódica (I_{pC}) y Del pico anódico (I_{pA}).

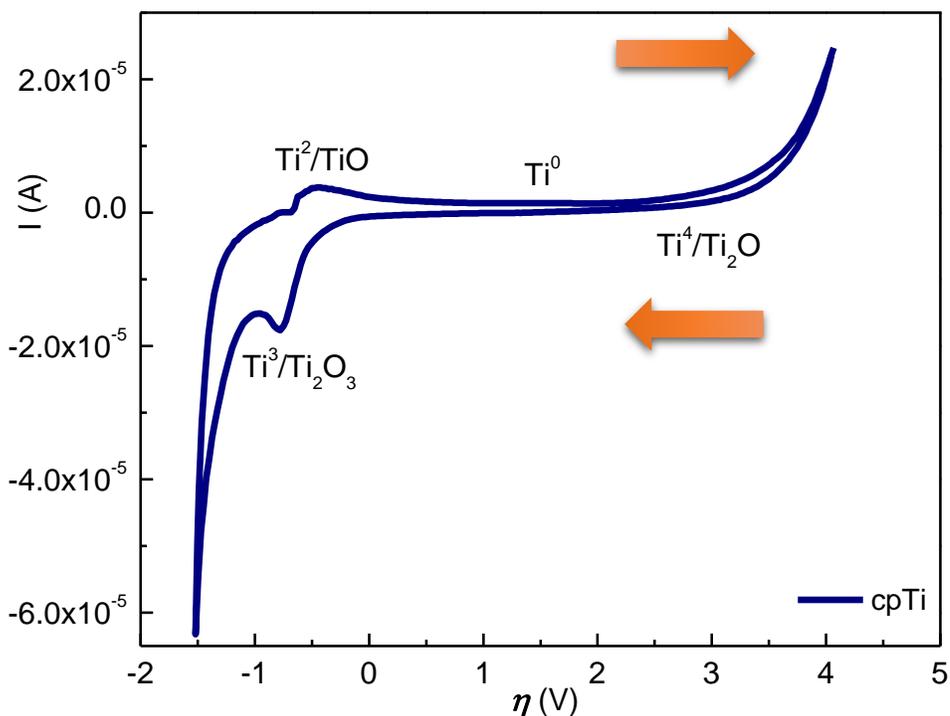


Figura 1. La voltamperometría cíclica del cpTi

La voltamperometría cíclica del SS se observa en la figura 2, de manera general el material respondió como un sistema reversible el cual muestra los estados de oxidación y de reducción del metal ($Cr^{3+} \rightarrow Cr^{6+}$ en $0.819 V$, $Ni^{3+} \rightarrow Ni^{2+} \rightarrow Ni^0$ en $-1V$ y $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ en $-0.628V$), los parámetros correspondientes al pico catódico (E_{pC}), potencial del pico anódico (E_{pA}), intensidad de corriente catódica (I_{pC}) y Del pico anódico (I_{pA}).

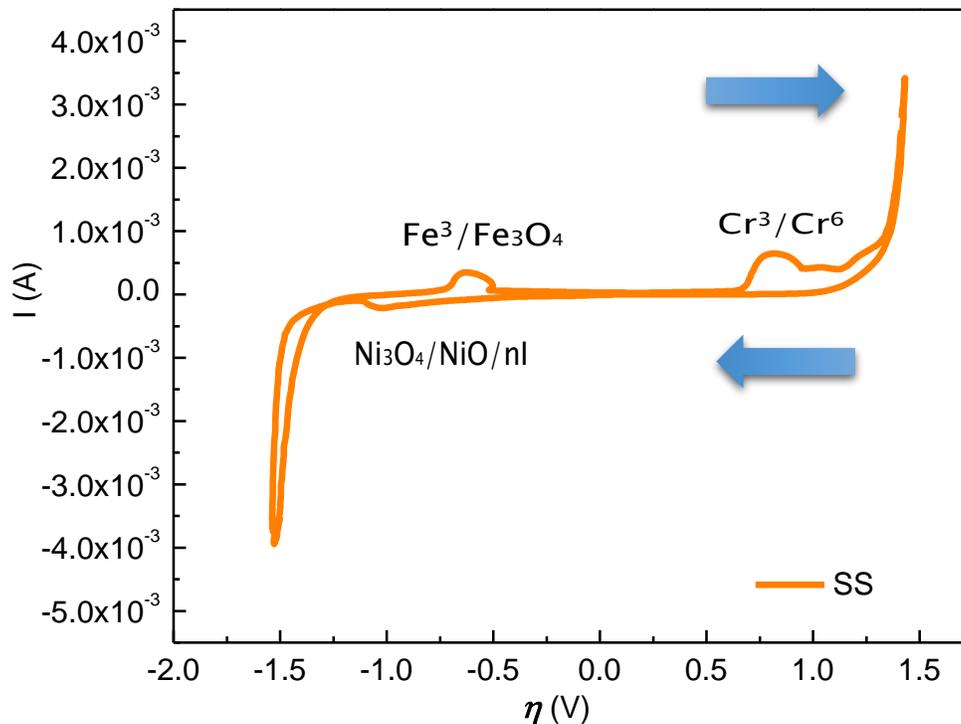


Figura 2. La voltamperometría cíclica del SS

La voltamperometría cíclica de cTiO₂ se observa en la figura 3, de manera general el material respondió como un sistema reversible muy parecido a la respuesta del cpTi, esto ocasiona esta voltamperometría tenga los mismo estados de oxidación y de reducción que tiene el cpTi (Ti⁴⁺ → Ti³⁺ → Ti²⁺ → Ti⁰, va de 3V → -0.770V → -0.525V → 0.235V, respectivamente), esto lo relacionamos con el hecho que el material se daña fácilmente y lo que realmente estamos viendo es el sustrato que en este caso es el cpTi.

La voltamperometría cíclica de aTiO₂ se observa en la figura 4, de manera general se observa que la película de aTiO₂ es muy resistente al potencial que se aplica, por lo tanto, no hay respuesta electroquímica, sólo se observan procesos de reducción que parte de ello es la reducción del agua que se encuentra en los -0.800V, esto es indicativo que la película es muy estable y el potencial no la daña fácilmente, se requieren varios ciclos para que aparezcan los estados de reducción del Ti.

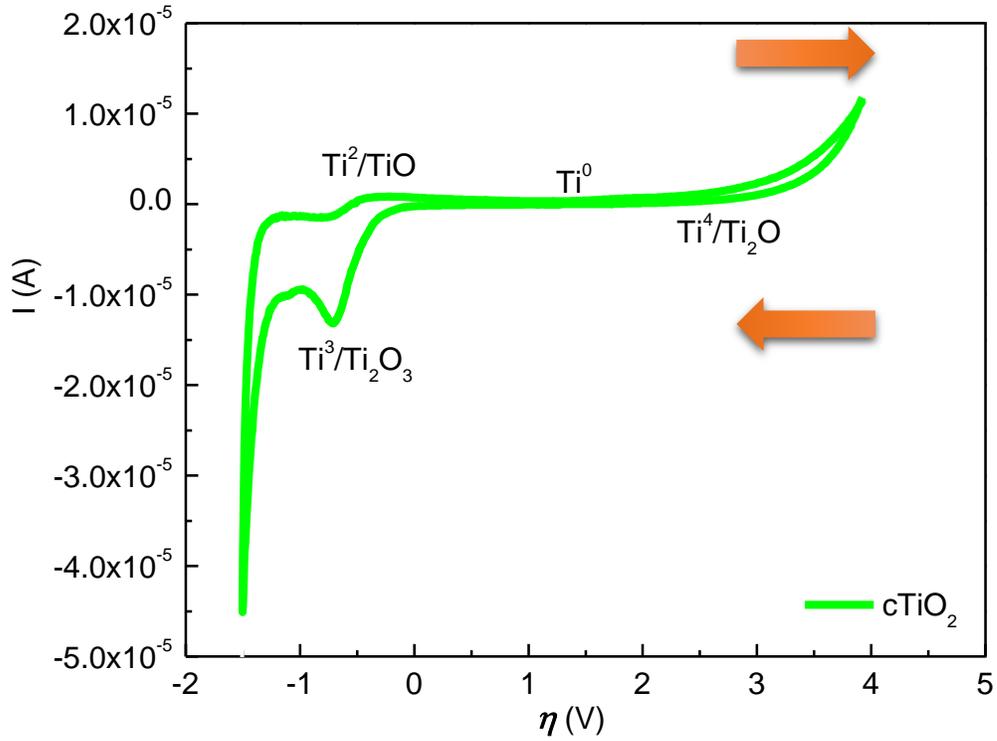


Figura 3. La voltamperometría cíclica del cTiO₂.

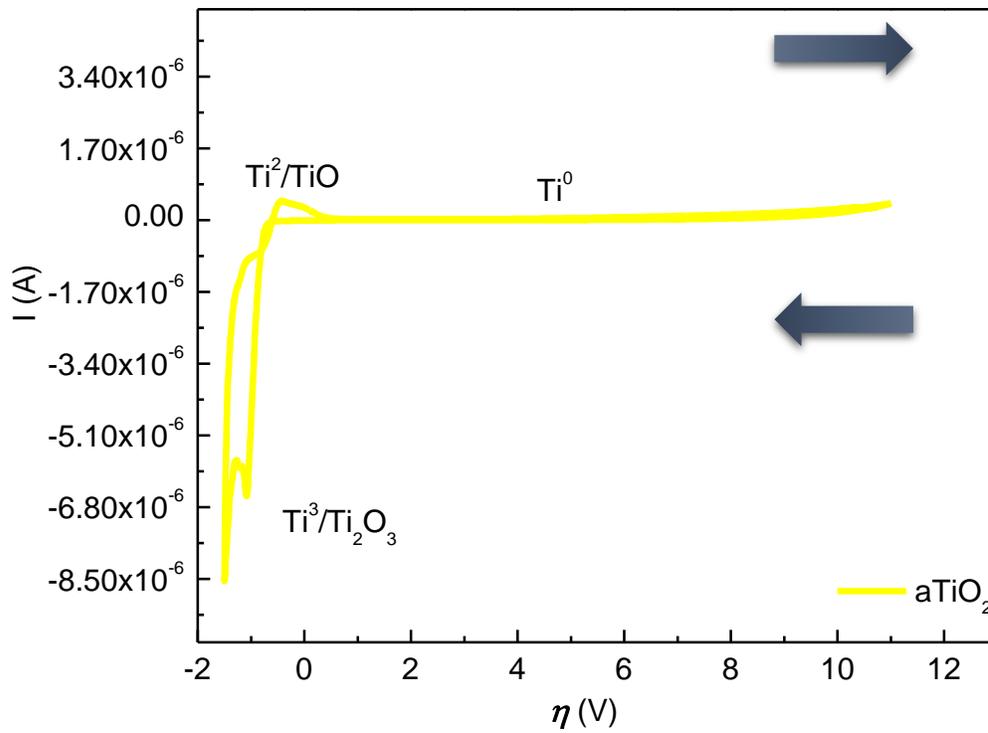


Figura 4. La voltamperometría cíclica del aTiO₂.

Anexo 3

14.1 Protocolo del ensayo de adhesión celular

12.3.1 Materiales

- Cajas de cultivo de 24 pozos estériles de poliestireno estériles de Corning Costar.
- Colágena tipo I en solución al 1 mg/ml, de Sigma Aldrich numero de CAS 9007-34-5.
- Medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, siglas en inglés) con suero fetal bovino (SFB) al 12% de Gibco®
- Albumina al 1% de Sigma Aldrich en PBS de Gibco®
- PBS 1X de Gibco®.
- Medio recuperador de Membranas: D-MEM, ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetano sulfónico (HEPES) 25 Mm y 0.5% de albumina ambas de Sigma Aldrich.
- Paraformaldehído 2.5% (PFA) en PBS, con pH de 7.4 de Sigma Aldrich.
- Azul de toluidina 1% peso, de Sigma Aldrich.
- Dodecil sulfato sódico (SDS, siglas en inglés) al 2%, de Sigma Aldrich.

12.3.2 Metodología

1. Preparación de los controles positivos: colocar colágena tipo I a una concentración 10 mg/cm² en tres pozos de cultivo. Secar con agitación suave durante 48 horas.
2. Controles negativos, son el pozo de cultivo sin colágena tipo I.
3. Lavar pozos y muestras con 200 µl de PBS.
4. Bloquear las superficies con 300 µl de albumina 1% en PBS.
5. Lavar los pozos con 300 µl de PBS.
6. Despender o despegar las células de la caja de cultivo (para este trabajo de investigación se utilizaron osteoblastos obtenidos a partir de un cultivo primario de hueso de mandíbula de humano), colocar tripsina al 0.25% a 37°C a las células durante 5 min.

7. Resuspender las células en medio de recuperación de membranas durante 1 hora, a 4 °C.
8. Centrifugar a 500 rpm, durante 5 min.
9. Resuspender en D-MEM0 sin SFB.
10. Sembrar 100,000 células en el pozo control y sobre el material de estudio.
11. Incubar, durante 1.5 horas, los cultivos, con el fin de generar la adhesión.
12. Observar, en microscopio óptico, las células de controles positivos y negativos.
13. Retirar el D-MEM.
14. Lavar los materiales y controles con 100 µl de PBS, cuatro veces seguidas.
15. Fijar las células con 100 µl FPA al 2.5% por tiempo de 20 min a temperatura ambiente.
16. Teñir las células con azul de toluidina al 1%, colocar 200 µl de solución de toluidina en cada material de estudio y controles, durante 1 hora a temperatura ambiente.
17. Lavar con agua destilada los materiales y controles, hasta que ya no había presencia de color en el agua.
18. Extraer el colorante de las células adheridas en los materiales y controles con 200 µl de SDS 2% durante una hora.
19. Medir el color con un espectrofotómetro Beckman Coulter de microplato para ELISA con un filtro de 620 nm en absorbancia.

12.4 Protocolo de ensayo de diferenciación celular

Se sembraron 25,000 células en cada material, hubo dos periodos de cultivo 1 y 7 días, finalmente se realizó un análisis de **inmunofluorescencia para marcaje de RUNX-2**, el medio de cultivo utilizado en este ensayo fue medio Eagle modificado por Dulbecco: nutrientes mixtos F-12 (D-MEM-F12) con SBF 10%, antibiótico/antimicótico 1 %, penicilina con estreptomycin de Gibco®.

12.4.1 Inmunofluorescencia con Marcaje de RUNX-2

12.4.1.1 Materiales

- Paraformaldehído 2.5% (PFA)

- Solución de bloqueo: PBS + albumina 1% + triton 0.3%
- Tween 20 0.3% de Sigma Aldrich en PBS (PBTw).
- Anticuerpo primario marcador de RUNX-2 de cabra policlonal IgG de santa Cruz Biotechnology catálogo (C-19) SC-8566.
- Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG-TR: sc-2781 de Santa Cruz.

12.4.1.2 Marcaje de RUNX-2

Después del tiempo de cultivo, las células se fijaron con PFA al 2.5% a 4°C durante 20 min. Posteriormente se retiró el PFA al 2.5% y se colocó PBS.

Para realizar el marcaje de RUNX-2 se siguió la siguiente metodología:

1. Colocar PBS a las muestras por 15 min a 4°C.
2. Retirar el PBS y colocar solución de bloqueo por 20 min a 4 °C.
3. Retirar solución de bloqueo y colocar el anticuerpo de runx-2 de cabra policlonal IgG, concentración 1:30. Colocar en estufa a 37°C durante 2 hr.
4. Retirar anticuerpo y lavar con PBS dejándolo 5 min, repetir una segunda vez.
5. Retirar PBS y colocar el anticuerpo secundario, 1:500, refrigerar a 4 °C durante 12 hr (toda la noche).
6. Retirar y lavar con PBS-Triton 0.3% dejar la solución por 5 min, repetir la acción.
7. Lavar nuevamente con PSB por dos ocasiones.

12.4.1.3 Microscopio de fluorescencia

Se tomaron fotos con diferentes filtros; para observar la expresión de RUNX-2 en núcleos a través de la fluorescencia. Para la inmunofluorescencia de RUNX-2 se utilizó una lámpara UV con el filtro para excitación a 470 nm y emisión en 490 nm.