



TESIS DOCTORAL

Evaluación y caracterización de superficies extensas de
titanio para uso en biomedicina

Margarita Hierro Oliva

Programa de doctorado: Modelización y Experimentación en Ciencia y
Tecnología (R007)

Conformidad de las directoras:

María Luisa González Martín

Amparo María Gallardo Moreno

2017

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis doctoral es un proceso duro, que requiere un gran esfuerzo y mucha dedicación. Hubiese sido imposible llevarlo a buen puerto sin la participación de muchas personas que han hecho posible la materialización de este trabajo y por ello son muchas a las que debo agradecer su apoyo a estas alturas:

En primer lugar a mis directoras de tesis, las doctoras Marisa González y Amparo Gallardo, por compartir conmigo la dedicación y el esfuerzo que requiere un trabajo como este, por su paciencia, su disponibilidad, su amabilidad y humanidad en el trato, siempre es más sencillo trabajar con gente que sabe sacar una sonrisa hasta en los malos momentos. En particular me gustaría agradecer muy sinceramente a Marisa esa primera oportunidad que me brindó, y que tan importante es para todos los comienzos. Gracias por confiar en mí, por tu apoyo y por enseñarme y guiarme en una profesión tan apasionante como es la investigación.

Me gustaría tener una mención especial para Dr. José Morales, por su colaboración y su aporte invaluable en la primera parte de esta tesis.

Al resto de mis compañeros del grupo de investigación de Adhesión Microbiana de la Universidad de Extremadura, por su ayuda y colaboración, con ellos he compartido muchas horas de trabajo. Y a los amigos que me he ido encontrando en el transcurso de este recorrido y que han hecho llevaderos muchos momentos difíciles. Gracias Lupe, por todos esos ratitos de descanso y porque en muchas ocasiones no hace falta decir nada para tener el apoyo de un amigo. En este grupo de amigos puedo incluir a Daniel Gamarra, porque además de compartir conmigo sus conocimientos en las técnicas que he utilizado, por su paciencia y dedicación desinteresada, siempre ha estado para socorrerme en los infinitos momentos de dudas. Gracias por hacer lo difícil mucho más sencillo y llevadero.

Al Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER-BBN) por el soporte financiero que me ha permitido poder realizar esta tesis doctoral.

A mi familia y amigos por el apoyo constante que recibo de ellos y que me ha ayudado a llegar hasta aquí. Me siento una persona muy afortunada por todos los grandes amigos que tengo, nombrarlos a todos sería muy extenso y podría cometer algún olvido injusto ¡gracias a todos, amigos! Sí que me gustaría tener una mención especial a mis tíos, Mari Paz y Jose Mari, y a mi prima Patricia, que me han acompañado en todos los momentos de mi vida, gracias por estar ahí siempre.

Gracias a los que vienen y a los que ya no están, porque de una manera u otra han sido un gran impulso para llegar hasta aquí.

A Jaime, mi compañero de vida. En parte te doy las gracias y me disculpo porque este proceso, en muchas ocasiones te ha robado horas de compañía. Quiero agradecerte tu ayuda y apoyo en todo, gracias por hacerme la vida mucho más sencilla y tener siempre una palabra de

ánimo, pero sobre todo por hacerme feliz. La mitad de esta tesis es tuya, sin ti nunca hubiese sido posible.

Probablemente ahora viene la parte más difícil en esta redacción, porque no se expresar con palabras todo lo que te tengo que agradecer a ti, Mamá. En primer lugar, gracias por ser mi maestra en la vida. Por tu apoyo incondicional, animándome siempre a continuar, pero sobre todo, por inculcarme los valores que me han hecho llegar hasta aquí y por educarme con la confianza suficiente para realizar todo lo que me proponga en la vida. Gracias por todos los esfuerzos que has hecho. Por todo esto y muchas cosas más que sería interminable enumerar aquí, esto es para ti.

ÍNDICE

GLOSARIO	9
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	11
1.1. MATERIALES IMPLANTABLES	13
1.1.1. Biocompatibilidad	14
1.2. RESPUESTA DE LOS MATERIALES IMPLANTABLES EN UN ENTORNO BIOLÓGICO	16
1.3. MODIFICACIONES SUPERFICIALES EN MATERIALES IMPLANTABLES METÁLICOS	18
1.4. CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES IMPLANTABLES	19
1.5. OBJETIVOS	20
BIBLIOGRAFÍA	22
WEBGRAFÍA	24
Capítulo 2: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	25
2.1. DETECCIÓN DE IONES SECUNDARIOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR TIEMPO DE VUELO (TOF-SIMS, de sus siglas en inglés, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry)	27
2.1.1. Análisis mediante componentes principales (PCA)	33
2.2. ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS, de sus siglas en inglés, X-ray photoelectron spectroscopy)	35
2.3. GONIOMETRÍA DE ÁNGULO DE CONTACTO	41
BIBLIOGRAFÍA	45
WEBGRAFÍA	46
Capítulo 3: CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES EXTENSAS DE TITANIO Y ALEACIONES DE TITANIO DE USO MÉDICO	47
3.1. INTRODUCCIÓN	49
3.1.1. El titanio y sus aleaciones	49
3.1.1.1. Composición de la capa pasiva de los materiales de titanio	51
3.1.1.2. Propiedades físico-químicas de la capa de pasivado en materiales de titanio	52
3.1.2. Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones.....	53
3.1.3. Objetivos de este capítulo	54
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	54
3.2.1. Titanio y aleaciones de titanio	54
3.2.1.1. Pulido de las probetas	54

3.2.1.2. Protocolo de limpieza de las probetas	55
3.2.1.3. Homogeneización de la capa de pasivado en muestras de titanio siguiendo distintos protocolos de limpieza y secado	55
3.2.1.4. Tratamiento con luz ultravioleta (UV-C)	56
3.2.2. Técnicas de caracterización	56
3.2.2.1. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS).....	56
3.2.2.2. Goniometría de ángulo de contacto	57
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.3.1. Análisis del crecimiento de la capa de óxido en la superficie de la aleación Ti6Al4V bajo condiciones de ultra alto vacío (UHV)	59
3.3.2. Caracterización de la superficie de titanio y aleaciones de titanio mediante goniometría de ángulo de contacto	66
BIBLIOGRAFÍA	72
WEBGRAFÍA	75

Capítulo 4: EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN COMPETITIVA DE PROTEÍNAS EN SUPERFICIES EXTENSAS DE ALEACIONES DE TITANIO.....77

4.1. INTRODUCCIÓN	79
4.1.1. Proteínas.....	79
4.1.1.1. Albúmina de suero humano (HSA)	82
4.1.1.2. Fibrinógeno (Fng)	82
4.1.1.3. Fibronectina (Fn)	83
4.1.2. Adsorción de proteínas	84
4.1.2.1. Adsorción competitiva de proteínas	85
4.1.3. Caracterización de la superficie de capas de proteínas adsorbidas en biomateriales metálicos	86
4.1.4. Objetivos de este capítulo	87
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	87
4.2.1. Descripción de sustratos y medios	87
4.2.2. Adsorción de proteínas	87
4.2.3. Técnicas de caracterización	88
4.2.3.1. Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo (TOF-SIMS)	88
4.2.3.2. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS).....	89
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89

4.3.1. Estimación del rango de concentraciones de la disolución de proteínas para los análisis mediante TOF-SIMS	89
4.3.2. Caracterización de la capa de una única proteína adsorbida sobre superficies de Ti6Al4V y Ti6Al7Nb con distinto grado de hidrofobicidad.....	95
4.3.2.1. Caracterización mediante XPS de la capa de HSA y Fng adsorbida sobre superficies de Ti6Al4V	107
4.3.3. Evaluación de la adsorción competitiva de proteínas	111
BIBLIOGRAFÍA	121
WEBGRAFÍA	123

Capítulo 5: CARACTERIZACIÓN DE IMPLANTES DENTALES RETIRADOS.....

5.1. INTRODUCCIÓN.....	127
5.1.1. Objetivos de este capítulo	130
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	130
5.2.1. Casos Clínicos.....	130
5.2.2. Tipos de implantes retirados	130
5.2.3. Técnicas de caracterización	131
5.2.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	131
5.2.3.2. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS).....	131
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	132
5.3.1. Cambios topográficos producidos en la superficie de los implantes retirados	132
5.3.2. Análisis de la composición química de la superficie de los implantes retirados	136
BIBLIOGRAFÍA	141

Capítulo 6: CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO Y ALEACIONES DE TITANIO CON MODIFICACIONES FÍSICAS O QUÍMICAS QUE MEJORAN SU OSTEINTEGRACIÓN.....

6.1. INTRODUCCIÓN.....	147
6.1.1. Objetivos de este capítulo	150
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	150
6.2.1. Modificaciones superficiales	150
6.2.1.1. Modificación física superficial de muestras de aleación de titanio....	150
6.2.1.2. Modificación química superficial de muestras de titanio.....	151
6.2.2. Técnicas de caracterización	152

6.2.2.1. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS).....	152
6.2.2.2. Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo (TOF-SIMS)	152
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
6.3.1. Caracterización de la superficie de los sustratos de Ti6Al4V sometidos a una modificación física mediante LP	152
6.3.2. Caracterización de la superficie de los sustratos de titanio sometidos a modificaciones químicas	156
6.3.3. Estudio comparativo de las modificaciones superficiales físicas y químicas realizadas en muestras de Ti y Ti6Al4V	160
BIBLIOGRAFÍA.....	162
WEBGRAFÍA.....	165
Capítulo 7: CONCLUSIONES.....	167
LISTA DE PUBLICACIONES	171

GLOSARIO

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
AIMEN	Centro de Aplicaciones Láser
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
CENIM-CSIC	Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas
CICOM	Centro de Implantología y Cirugía Oral y Maxilofacial
DSF	Líquido Antiséptico, Derquim
EDX	Energía Dispersiva de Rayos X
Fn	Fibronectina
Fng	Fibrinógeno
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
FWHM	Anchura a media altura
HAP	Hidroxiapatita
HSA	Albúmina de Suero Humano
IP6Na6	Fitato de hexasodio (sal sódica de myo-inositol-hexafosfato)
IUNICS	Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud
KPi	Tampón Fosfato Potásico
LMIG	Fuente de Iones de Metal Líquido
LP	Laser Peening
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCA	Análisis mediante Componentes Principales
PCs	Componentes Principales
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetrafluoroetileno
QCM	Microbalanza de Cristal de Cuarzo
QR	Quercitrina

SACSS	Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies
SAM	Monocapas Autoensambladas
SE	Elipsometría Espectroscópica
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SIMS	Espectrometría de Masas
Ti cp	Titanio Comercialmente Puro
TOF-SIMS	Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo
TX	Taxifolina
UHV	Ultra Alto Vacío
UV	Ultravioleta
UV-C	Ultravioleta C
VOCG	Van Oss-Chaudhury-Good
XPS	Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MATERIALES IMPLANTABLES

El factor más importante que distingue un biomaterial de cualquier otro material es su capacidad para poder mantenerse en contacto con los tejidos del cuerpo humano sin producir reacciones adversas. Atendiendo a este requisito, se engloba en el grupo de los biomateriales a aquellos materiales sintéticos o de origen biológico, que no producen daños al ser puestos en contacto con tejidos vivos o con fluidos fisiológicos y que pueden emplearse para tratar o reemplazar una parte de un sistema vivo (Williams, D.F., 2009). Por lo tanto, los materiales seleccionados para ser implantados en el organismo deben cumplir una serie de requisitos que dependerán de la aplicación médica específica para la que vayan a ser requeridos; en general, deben ser químicamente estables e inertes, no deben ser tóxicos, ni trombogénicos, ni irritantes.

Los biomateriales pueden ser de origen artificial o biológico (Barrère, F. *et al.* 2008). En el primer tipo se pueden incluir los materiales metálicos, poliméricos y cerámicos, o compuestos entre los anteriores. El grupo de los biomateriales de origen biológico comprende, por ejemplo, fragmentos de huesos o injertos de piel, obtenidos del propio individuo (autógeno), de un donante distinto al que recibirá el implante (alo-injerto) o incluso proveniente de otra especie que no sea humana (xero-injerto). Retomando los biomateriales de origen artificial, cabe destacar que los materiales metálicos y sus aleaciones, son los más utilizados para sustituciones óseas, como implantes ortopédicos y dentales. Este hecho puede deberse a que poseen una mejor resistencia al desgaste mecánico, resistencia a la fatiga, ductilidad y tenacidad en comparación con los materiales cerámicos y poliméricos. Además, estos materiales son capaces de soportar la carga adecuada para su función. Los metales más usados para la fabricación de implantes son el acero inoxidable, las aleaciones de cobalto con cromo y las de magnesio, el titanio puro (Ti) y algunas de sus aleaciones (Chen, Q. y Thouas, G.A., 2015). Las aleaciones de base titanio tienen una alta resistencia mecánica y un módulo de elasticidad más bajo que otros metales, lo que se asemeja más al del hueso. A su vez tienen una alta resistencia a la corrosión como consecuencia de la formación espontánea de la capa pasiva de óxido de titanio muy bien adherida, lo que las ha convertido en unas de las aleaciones más utilizadas para aplicaciones ortopédicas y con mejor respuesta en contacto con células (Geetha, M. *et al.*, 2009).

Si nos fijamos en el comportamiento del material una vez está implantado en el cuerpo humano, se puede hacer una clasificación de los biomateriales en función de si son materiales biotolerables, bioactivos o biorreabsorbibles. Los materiales biotolerables son aquellos que producen una reacción mínima a cuerpo extraño. En general, estos materiales tienen por respuesta a la implantación la formación de una cápsula delgada de tejidos orgánicos, principalmente colágeno, que no se adhiere a la superficie del implante. Algunos de estos materiales son el politetrafluoroetileno (PTFE) (Jagur-Grodzinski, J., 1999), el polimetilmetacrilato (PMMA) (Yue Sa *et al.*, 2016) y los biomateriales de origen metálico. Uno de los inconvenientes que pueden tener este tipo de biomateriales es el alto porcentaje de rechazo que sufren los mismos por parte del organismo. Los materiales bioactivos son aquellos que permiten la formación de tejido óseo a su alrededor, integrándose fuertemente con la superficie

del mismo y haciendo que se produzca la aceptación del implante, con el consiguiente éxito de la implantación. Entre estos materiales están aquellos compuestos por fosfato de calcio sintético (Ebrahimi, M. *et al.*, 2017), como la hidroxiapatita (HAP). Por último, los materiales biorreabsorbibles son aquellos que una vez puestos en servicio, son sustituidos por los tejidos del organismo, es decir aquellos materiales cuya masa disminuye gradualmente con el tiempo de manera que permiten ser integrados en el tejido y metabolizados hasta su completa desaparición. Algunos de estos materiales son los polímeros de ácido poliláctico (Wang, M. *et al.*, 2001) y poliglicólico (Nair, L.S. y Laurencin, C.T., 2007).

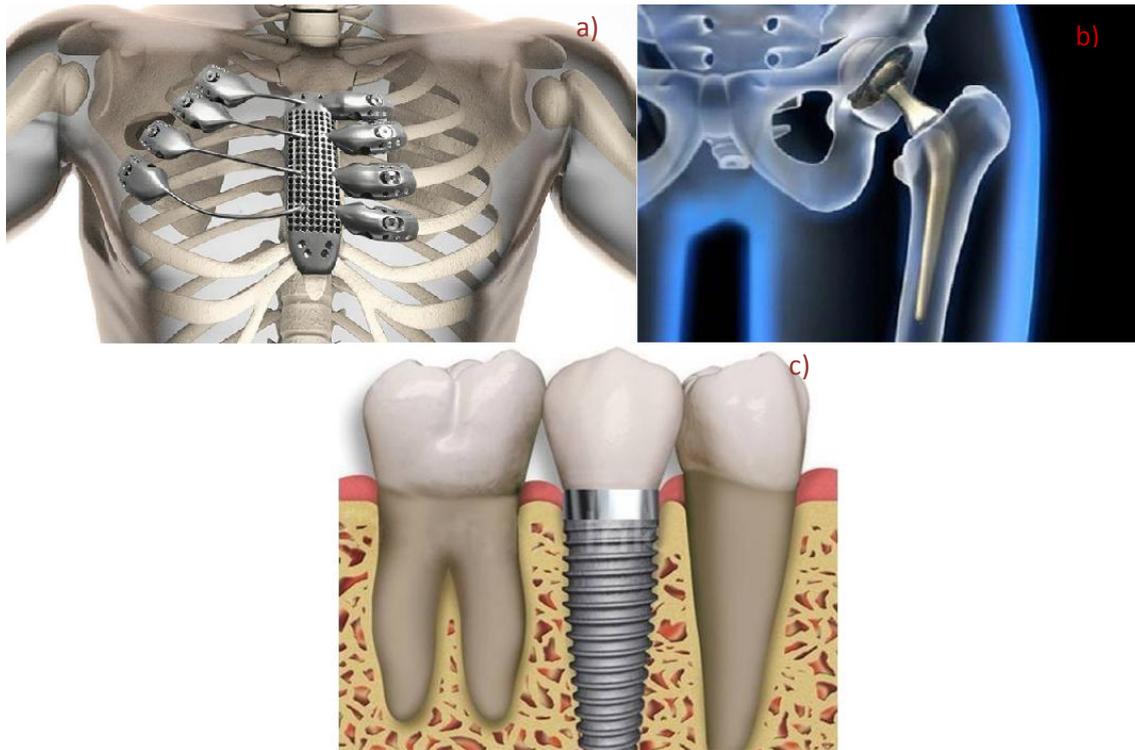


Figura 1. Ejemplos de prótesis o implantes metálicos. a) Prótesis de esternón y costillas, realizadas en titanio (Imagen recuperada de página web 1), b) prótesis de cadera (Imagen recuperada de página web 2) y c) implantes dentales (Imagen recuperada de página web 3).

En el caso de prótesis para sustitución ósea (Fig. 1), por ejemplo, se pretende que el material implantable no sea entendido por el cuerpo como un ente extraño. Al contrario, se busca que la superficie del material ofrezca a las células óseas un contexto adecuado para su adhesión y proliferación, de modo que el dispositivo acabe integrándose con el tejido óseo. Para conseguir este ambiente adecuado, la superficie ha de exponer a las células una terminación que mimetice un entorno biológico, de modo que pueda ser reconocida por las mismas.

1.1.1. Biocompatibilidad

Una definición muy completa de biocompatibilidad es la que propone David F. Williams (Williams, D.F., 2008), que la define como "la capacidad de un dispositivo de uso permanente para realizar la función para la que se diseñó, incorporándose en el receptor en el grado pretendido sin provocarle ningún efecto local o sistémico no deseado". Los requisitos para que

un material sea biocompatible son complejos y varían dependiendo de las funciones médicas para las que sean requeridos. Así, los materiales utilizados para implantes ortopédicos deben estar fabricados por elementos no tóxicos, para no causar reacciones inflamatorias o alérgicas en el cuerpo humano. Pero algunos de los materiales utilizados satisfactoriamente en cirugía ortopédica podrían ser inapropiados para aplicaciones cardiovasculares debido a sus propiedades trombogénicas.

Los estudios realizados en esta tesis se centran en materiales metálicos utilizados para la fabricación de prótesis para sustitución ósea e implantes dentales, y por lo tanto deben ser materiales cuyas características les permitan permanecer implantados en el organismo durante un largo periodo de tiempo sin ser rechazados. Algunas de las características que deben cumplir son (Manam, N.S. *et al.*, 2017):

- No toxicidad. La fabricación de implantes metálicos requiere el uso de elementos inertes o existentes como oligoelementos en el cuerpo humano.
- Alta resistencia a la corrosión, ya que el ambiente del cuerpo humano es en general muy agresivo. La mayoría de los fluidos corporales contienen un gran número de iones en suspensión, aminoácidos y proteínas solubles que se pueden adsorber en la superficie del implante, provocando reacciones químicas o electroquímicas que pueden producir un deterioro en la superficie del material. Al liberarse iones metálicos, se puede inducir una reacción adversa del organismo, local si es cerca del material, o remota si la repercusión es en otro órgano.
- Propiedades mecánicas adecuadas. Las de mayor importancia para la fabricación de implantes para la sustitución ósea son el módulo de Young, la resistencia a la tracción y la dureza. Una vez implantado, el material va a estar sometido de forma continua a diferentes tipos de estrés que pueden debilitar su resistencia. También se busca que presenten unas propiedades mecánicas similares a las del hueso que va a sustituir.
- Alta resistencia al desgaste. Este es un problema inevitable en cualquier reemplazo de articulaciones, independientemente del material que se utilice, ya que el sistema esquelético tiene varios tipos de articulaciones móviles, aquellas que están en contacto con los huesos largos (como la cadera, rodilla, tobillo, hombro y codo) y aquellas articulaciones más estáticas (como la muñeca, el cráneo y los dientes).
- Tener capacidad de osteointegración. El proceso de osteointegración se define como una conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante (Albrektsson, T. *et al.*, 1981) y es fundamental en la sustitución ósea mediante biomateriales. La incapacidad del implante de integrarse al hueso circundante y a otros tejidos que le rodean, puede provocar que se forme entorno a él una cápsula fibrosa, que en ocasiones es motivo de fracaso de la implantación por rechazo inflamatorio o por impedir el anclaje o fijación del implante en el tejido receptor. Factores como la composición química de la superficie del material y la topografía deben ser considerados para que se produzca una buena osteointegración.

1.2. RESPUESTA DE LOS MATERIALES IMPLANTABLES EN UN ENTORNO BIOLÓGICO

Las propiedades mecánicas de los biomateriales de las que hemos hablado en el apartado anterior son fundamentales para una correcta selección de los materiales para cada una de las aplicaciones biomédicas específicas. Pero hay que tener en cuenta que en los eventos posteriores a la implantación lo que se producen son interacciones entre el entorno biológico y la superficie del material. Por lo tanto, la superficie del material desempeña un papel extremadamente importante para la integración del implante con el tejido que le rodea y si sus propiedades superficiales no son las adecuadas, el implante puede fallar y ser rechazado por el organismo. Por ejemplo, un material metálico utilizado para la sustitución ósea puede tener excelentes propiedades mecánicas de carga, pero si la superficie del material no promueve la osteointegración, este material no será una buena elección para esta aplicación a menos que se modifique su superficie.

Tan pronto como un material se implanta en el cuerpo humano entra en contacto con fluidos fisiológicos y su superficie se cubre con moléculas presentes en el organismo. Este proceso ha sido descrito por B. Kasemo (Kasemo, B., 2002), quien propone una sucesión de eventos para describir lo que ocurre en la interfase del implante con el medio que le rodea. De forma resumida, las primeras biomoléculas que alcanzan la superficie a los pocos nanosegundos de establecerse el contacto son las moléculas de agua (Figura 2a). Se sabe que el agua interactúa y se une de manera muy diferente en las superficies dependiendo de las propiedades de éstas. Por lo tanto, se van a observar dos tipos de estructuras diferentes para el agua en contacto con las superficies, una distribución menos densa de agua en las superficies hidrófobas y otra más densa en las superficies hidrófilas (Vogler, E.A., 1998). En superficies hidrófilas las moléculas de agua pueden disociarse formando una estructura de grupos $-OH$ sobre ellas, o bien se pueden adsorber directa y fuertemente en forma de H_2O . Sin embargo, en superficies hidrófobas, las moléculas de H_2O sin disociarse, se adsorben débilmente a la misma. El segundo evento que ocurre tras el contacto del biomaterial con los fluidos fisiológicos, es la adsorción de iones hidratados que están presentes en el medio biológico (Figura 2b), formando una doble capa. Seguidamente, se adsorben las proteínas y otras biomoléculas (Figura 2c). Esta capa inicial servirá de acondicionamiento del material para facilitar la interacción con las células (Figura 2e) y dado que estas dependen de proteínas específicas para lograr anclarse a una superficie, la composición de la capa de proteínas adsorbida puede estimular una respuesta constructiva en las células y por tanto la integración del material con el tejido (Wei-Bor Tsai *et al.*, 1999). Es decir, la capa de proteínas adsorbidas va a actuar como mediador entre la superficie del material y los receptores celulares.

Una vez concluye la formación de esta capa precursora, es de esperar que se produzca la adhesión de las células óseas en la superficie del implante y que además, estas células proliferen, hecho que conduce a la osteointegración del implante y por lo tanto a que sea aceptado por el cuerpo en el que se inserta. Ahora bien, hay que tener en cuenta que el éxito de un implante puede verse afectado por otros procesos que pueden suceder una vez posicionado este en el paciente. Entre otros se encuentran los procesos inflamatorios como respuesta a la implantación, el aflojamiento de las prótesis o incluso pequeños desplazamientos, que dan lugar

a la formación de una cápsula fibrosa e impiden la correcta osteintegración del dispositivo. Además, en el caso de que haya presencia de bacterias en el medio, estas competirán con las células eucariotas por el acceso y la colonización de la superficie del material (Gristina, A., 1987).

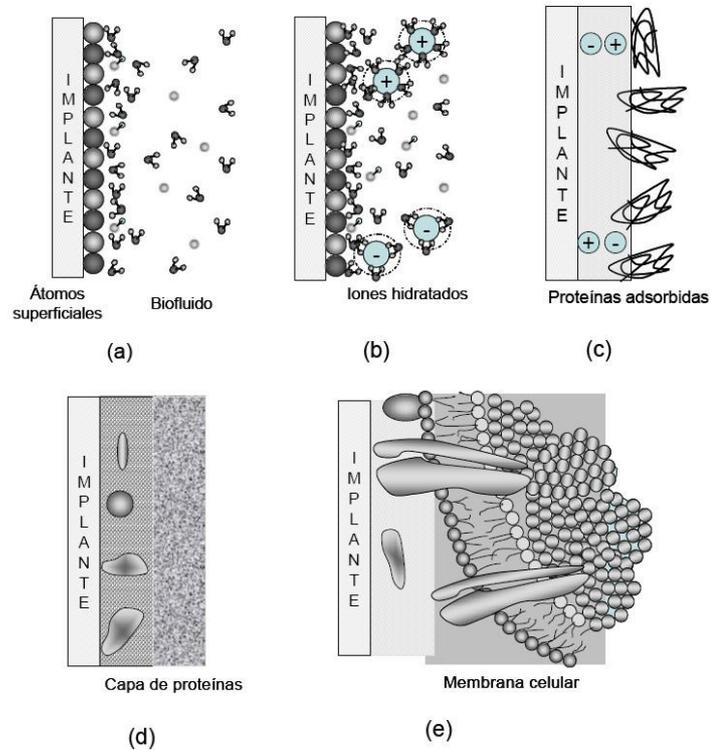


Figura 2. Secuencia de eventos que ocurren al colocar un biomaterial dentro del cuerpo humano (Imagen recuperada de Rodil, S.E., 2009).

Como ya se ha mencionado, las propiedades superficiales del biomaterial son determinantes para dirigir estos eventos que se producen tras la implantación del material. Entre las propiedades físico-químicas de las superficies que se ha probado que tienen una gran influencia en su interacción con los fluidos y tejidos biológicos se encuentran la hidrofobicidad e hidrofiliidad de la superficie, que determinan su mojabilidad, la energía libre superficial, la composición química, la carga superficial y la topografía (Spriano, S. *et al.*, 2017). Estas propiedades, por lo general, están interrelacionadas y es difícil diferenciar los efectos de cada una de ellas de forma individual. El papel de la mojabilidad, que está condicionado por la topografía de la superficie y la composición del implante, es uno de los factores más importantes en la determinación de qué proteínas se adsorben sobre la superficie y por lo tanto, en la adhesión y proliferación celular (Boyan, B.D. *et al.*, 1996).

1.3. MODIFICACIONES SUPERFICIALES EN MATERIALES IMPLANTABLES METÁLICOS

Es complicado encontrar un material que cumpla con todos los requisitos para una aplicación dada y los biomateriales no son una excepción. Así, en el ámbito de los biomateriales es frecuente realizar modificaciones superficiales a los materiales elegidos para la fabricación de prótesis y conseguir mejorar su rendimiento una vez implantado en el cuerpo humano. Se han estudiado una gran variedad de estrategias que optimizan la integración del implante. Por ejemplo, la rugosidad de la superficie causa gran influencia en la adhesión y el crecimiento celular (Jäger, M. *et al.*, 2007) y también otros estudios han mostrado que modificaciones de la topografía superficial pueden provocar un cambio en la orientación de las células adheridas (McKee, C.T *et al.*, 2011).

Los métodos empleados para modificar las superficies de los biomateriales metálicos se pueden clasificar en métodos químicos o físicos, según el mecanismo de formación de la capa de óxido modificada. Para el titanio y sus aleaciones, los métodos químicos que se suelen emplear se basan principalmente en las reacciones químicas que se producen en la interfase entre el titanio y una disolución (Xuanyong Liu, *et al.*, 2004). Los más comunes son tratamientos realizados con ácidos para retirar la contaminación e incluso parte de la capa de óxido y así obtener una superficie limpia, tratamientos realizados con H_2O_2 que reacciona con la superficie del titanio produciendo geles de peróxido de titanio, deposición de películas delgadas por sol-gel, deposición de películas delgadas por evaporación térmica o adsorción y autoensamblado de biomoléculas. En principio, las modificaciones químicas que conducen a la funcionalización superficial controlada pueden aplicarse también a otros tipos de biomateriales tales como los polímeros (Ramakrishna, S. *et al.*, 2001). Por ejemplo, se han realizado estudios sobre el ácido poli-(láctico-co-glicólico) en los que se realiza una modificación de la nanoestructura de su superficie por ataque químico con NaOH, dando como resultado un material con nuevas características superficiales capaces de aumentar la actividad de diversos tipos de células (Miller, D.C. *et al.*, 2004).

Los métodos físicos más comunes que se utilizan para modificar las superficies del titanio y sus aleaciones y así obtener una topografía superficial específica son los métodos mecánicos, como el mecanizado, el pulido, el chorreado con partículas y los tratamientos realizados con láser (Xuanyong Liu, *et al.*, 2004). Además de estos métodos físicos hay otros, que también se pueden incluir en esta categoría. Uno de los más utilizados para la obtención de películas porosas es el spray térmico y para la obtención de películas densas y más duras se suele utilizar el bombardeo de la superficie con partículas energéticas (sputtering). También se consideran métodos físicos para la modificación de estas superficies la implantación iónica, la funcionalización con grupos amino, hidroxilo o carboxilo, mediante descargas gaseosas y la activación de la superficie mediante radiación ultravioleta, normalmente en el rango del ultravioleta C (UV-C).

La mayoría de estos tratamientos pueden modificar la composición química, la topografía o incluso el espesor de la capa de óxido superficial y por lo tanto las propiedades que esta confiere a la hora de integrarse el material en el medio que le rodea. En este sentido, la radiación UV-C es

capaz de modificar propiedades como la hidrofobicidad de superficies de titanio sin producir cambios en la composición, topografía o espesor de la capa de pasivado (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2008).

En el transcurso de esta tesis doctoral se han estudiado varias modificaciones físicas y químicas de la superficie del titanio o sus aleaciones. Se han elegido dos tratamientos físicos para las superficies de titanio y sus aleaciones, el primero de ellos es el tratamiento con luz ultravioleta y el segundo ha sido la modificación mediante grabado con láser de las superficies de titanio. Además de estas modificaciones físicas, en este trabajo se han estudiado superficies de titanio modificadas químicamente, mediante unión covalente de moléculas de origen orgánico, como los flavonoides o el ácido fítico.

1.4. CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES IMPLANTABLES

Ya que la interacción del biomaterial con el entorno biológico se produce a través de su superficie, un estudio detallado de sus propiedades puede ofrecer una visión de la naturaleza de estos eventos.

Como paso previo a la elección de la técnica de caracterización apropiada para estudiar una determinada propiedad de la superficie del biomaterial, es necesario tener en cuenta, tanto las características de la técnica, como las características inherentes asociadas a la superficie. En primer lugar, hay que considerar que la técnica aplicada puede provocar reacciones sobre la superficie estudiada y por lo tanto, modificarla o dañarla. Otro aspecto a tener en cuenta es que la superficie de cualquier material se contamina con mucha facilidad, por lo que las técnicas que se realizan en condiciones de ultra alto vacío (UHV) son muy útiles para retardar dicha contaminación. Además, puesto que existen diferencias entre las características de la superficie y del interior del material, las técnicas utilizadas para caracterizar la estructura y propiedades masivas de los materiales no suelen ser adecuadas para evaluar su superficie. Y por último, hay que considerar que la composición superficial no siempre permanece constante, ya que los átomos y moléculas que están cerca de la superficie pueden sufrir movimientos como respuesta al ambiente con el que entran en contacto. Por ejemplo, en respuesta a un entorno acuoso, una superficie anfífila (como las cadenas de algunos polímeros), puede invertir su estructura y orientar los grupos polares hacia fuera para interactuar con las moléculas de agua polares (Ratner, B.D. *et al.*, 1978).

Como ya se ha mencionado, algunas propiedades superficiales desempeñan un papel fundamental a la hora de evaluar el éxito de los biomateriales, como son la composición química de la superficie del material, la mojabilidad, la topografía y la carga superficial (Spriano, S. *et al.*, 2017). En la actualidad hay una gran variedad de instrumentos con capacidad para caracterizar estas propiedades de la superficie de los biomateriales (Ratner, B.D., 1993). Para el caso de la composición química de la superficie de los biomateriales (Kingshott, P., *et al.*, 2011), cabe destacar la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) (Callen, B.W., *et al.*, 1995), la espectrometría de masas (SIMS) y su variante utilizando la detección de iones por tiempo de vuelo (TOF-SIMS) (Belu, A.M. *et al.*,

2003). Para determinar la mojabilidad de la superficie de los biomateriales se utiliza la goniometría de ángulo de contacto (Vogler, E.A., 2001) y para caracterizar la topografía de las superficies las técnicas utilizadas con mayor frecuencia son (Morant, C. *et al.*, 2003) la microscopía de fuerza atómica (AFM), las técnicas de perfilometría e incluso la microscopía electrónica de barrido (SEM). Por último, para determinar la carga superficial de un material se utilizan técnicas electrocinéticas (Spriano, S. *et al.*, 2017).

El uso de una sola técnica de caracterización no proporciona toda la información necesaria sobre las propiedades analizadas en un material y por lo tanto, es habitual en este campo el uso de más de una técnica. Así por ejemplo, FTIR permite la identificación y el estudio de los grupos funcionales de las moléculas que componen el material, y la información que se obtiene de esta técnica se puede complementar con la obtenida mediante XPS y TOF-SIMS, que aportan la composición elemental, en el caso de ambas técnicas, y también la molecular, en el caso del TOF-SIMS. Otro ejemplo de técnicas complementarias serían el SEM y el AFM, donde el SEM puede ofrecer un variado rango de informaciones procedentes de la superficie de la muestra, dependiendo del detector disponible. Así, si el detector es de electrones secundarios, se obtiene una imagen en blanco y negro de la topografía de la superficie examinada. Y si el detector es de electrones retrodispersados, se verá una imagen de la superficie de menor resolución que la proporcionada por los electrones secundarios, pero en la que se van a distinguir distintos tonos de gris en función de que existan varias fases con distintos elementos, ya que el detector es sensible a las variaciones en el número atómico de los elementos presentes en la superficie. En el caso del AFM, la información obtenida proporciona datos sobre la topografía y sobre los cambios en composición de la superficie de la muestra analizada, independientemente de que el modo de trabajo sea por contacto continuo o por contacto intermitente.

Algunas de estas técnicas mencionadas en los párrafos anteriores son las que se han utilizado para la caracterización de las superficies de los biomateriales elegidos en el transcurso de esta tesis y serán desarrolladas en el siguiente capítulo.

1.5. OBJETIVOS

Para cualquier material, su superficie es la frontera a través de la cual entra en contacto con los medios que le rodean. El mojado, la adsorción, la adhesión de partículas, las reacciones químicas superficiales, la corrosión, etc. son procesos que comienzan en la superficie, pero que pueden afectar y dañar a la pieza de material al completo. Este mismo panorama describe a los materiales empleados en la fabricación de implantes, sondas y, en general, dispositivos médicos que finalmente terminan inmersos en el ambiente biológico. En estos casos, las propiedades de la superficie del material son críticas.

El propósito general de la investigación que se desarrolla en esta tesis doctoral es poner de manifiesto el potencial de las técnicas de caracterización superficial, principalmente XPS y TOF-SIMS, para tener un conocimiento detallado de las propiedades de las superficies de los biomateriales, concretamente del titanio y alguna de sus aleaciones. Para alcanzar este objetivo principal se van a aplicar dichas técnicas a estos materiales en distintas condiciones en las que

pueden encontrarse en el campo de la implantología ortopédica y dental. Concretamente, en el capítulo 3 se llevará a cabo un estudio detallado tanto de las propiedades físico-químicas de la superficie del titanio y las aleaciones consideradas, como de la composición de la capa de óxido crecida sobre Ti6Al4V. En el siguiente capítulo se evaluará la influencia de la hidrofobicidad del sustrato sobre las características de las capas adsorbidas de proteínas presentes en el suero fisiológico, albúmina, fibrinógeno y fibronectina, tanto de forma individual como competitiva. En el capítulo 5 se pretende identificar los posibles daños o modificaciones producidas en la superficie de dos implantes dentales por el envejecimiento tras distintos años de uso. Finalmente, en el capítulo 6, se muestra un estudio comparativo de las modificaciones superficiales que se producen sobre muestras de titanio y aleación, utilizando técnicas físicas y técnicas químicas que mejoran la osteointegración.

BIBLIOGRAFÍA

Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A. y Lindström, J. *Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.* Acta Orthopaedica, 52 (1981) 155-170.

Barrère, F., Mahmood, T.A., de Groot, K. y van Blitterswijk, C.A. *Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions.* Materials Science and Engineering R, 59 (2008) 38-71.

Belu, A.M., Graham, D.J. y Castner, D.G. *Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces.* Biomaterials, 24 (2003) 3635-3653.

Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., Schwartz, Z. *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response.* Biomaterials, 17 (1996) 137-146.

Callen, B.W., Sodhi, R.N.S., Griffithst, K. *Examination of clinical surface preparations on titanium and Ti6Al4V by X-ray photoelectron spectroscopy and nuclear reaction analysis.* Progress in Surface Science, 50 (1995) 269-279.

Chen, Q. y Thouas, G.A. *Metallic implant biomaterials.* Materials Science and Engineering R, 87 (2015) 1–57.

Ebrahimi, M., Botelho, M.G. y Dorozhkin, S.V. *Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research.* Materials Science and Engineering C, 71 (2017) 1293-1312.

Geetha, M., Singh, A.K., Asokamani, R. y Gogia, A.K. *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review.* Progress in Materials Science, 54 (2009) 397-425.

Gristina, A. *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.* Science, 237 (1987) 1588-1595.

Jäger, M., Zilkens, C., Zanger, K., Krauspe, R. *Significance of Nano- and Microtopography for Cell-Surface Interactions in Orthopaedic Implants.* Journal of Biomedicine and Biotechnology (2007) 69036.

Jagur-Grodzinski, J. *Biomedical application of functional polymers.* Reactive & Functional Polymers, 39 (1999) 99-138.

Kasemo, B. *Biological surface science.* Surface Science, 500 (2002) 656-677.

Kingshott, P., Andersson, G., McArthur, S.L., Griesser, H.J. *Surface modification and chemical surface analysis of biomaterials.* Current Opinion in Chemical Biology, 15 (2011) 667-676.

Manam, N.S., Harun, W.S.W, Shri, D.N.A., Ghani, S.A.C., Kurniawan, T., Ismail, M.H., Ibrahim, M.H.I. *Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review.* Journal of Alloys and Compounds, 701 (2017) 698-715.

McKee, C.T., Raghunathan, V.K., Nealey, P.F., Russell, P., Murphy, C.J. *Topographic Modulation of the Orientation and Shape of Cell Nuclei and Their Influence on the Measured Elastic Modulus of Epithelial Cells.* Biophysical Journal, 101 (2011) 2139-2146.

Miller, D.C., Thapa, A., Haberstroh, K.M., Webster, T.J. *Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly (lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features.* Biomaterials, 25 (2004) 53-61.

Morant, C., López, M.F., Gutiérrez, A., Jiménez, J.A. *AFM and SEM characterization of non-toxic vanadium-free Ti alloys used as biomaterials.* Applied Surface Science, 220 (2003) 79-87.

Nair, L.S. y Laurencin, C.T. *Biodegradable polymers as biomaterials.* Progress in Polymer Science, 32 (2007) 762-798.

Pacha-Olivenza, M.A., Gallardo-Moreno, A.M., Méndez-Vilas, A., Bruque, J.M., González-Carrasco, J.L. y González-Martín, M.L. *Effect of UV irradiation on the surface Gibbs energy of Ti6Al4V and thermally oxidized Ti6Al4V.* Journal of Colloid and Interface Science, 320 (2008) 117-124.

Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K.W. *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review.* Composites Science and Technology, 61 (2001) 1189-1224.

Ratner BD, Weathersby PK, Hoffman AS, Kelly MA, Scharpen LH. *Radiation-grafted hydrogels for biomaterial applications as studied by the ESCA technique.* Journal of Applied Polymer Science, 22 (1978) 643-664.

Ratner, B.D. *Characterization of Biomaterial Surfaces.* Cardiovascular Pathology, 2 (1993) 87-100.

Rodil, S.E. *Modificación superficial de biomateriales metálicos.* Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 29 (2009) 67-83.

Spriano, S., Chandra, V.S., Cochis, A., Uberti, F., Rimondini, L., Bertone, E., Vitale, A., Scolaro, C., Ferrari, M., Cirisano, F., Gautier di Confiengo, G., Ferraris, S. *How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials?* Materials Science and Engineering C, 74 (2017) 542-555.

Vogler, E.A. *How water wets biomaterial surfaces.* Water in Biomaterials Surface Science, John Wiley and Sons, 2001.

Vogler, E.A. *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces.* Advances in Colloid and Interface Science, 74 (1998) 69-117.

Wang, M., Chen, L.J., Ni, J., Weng, J. y Yue, C.Y. *Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for the tissue engineering.* Journal of materials science: Materials in Medicine, 12 (2001) 855-860.

Wei-Bor Tsai, Grunkemeier, J.M., Horbett, T.A. *Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene.* Journal of Biomedical Materials Research, 44 (1999) 130-139.

Williams, D.F. *On the mechanisms of biocompatibility.* Biomaterials, 29 (2008) 2941-2953.

Williams, D.F. *On the nature of biomaterials.* Biomaterials, 30 (2009) 5897-5909.

Xuanyong Liu, Paul K. Chu, Chuanxian Ding. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications.* Materials Science and Engineering R, 47 (2004) 49-121.

Yue Sa, Fang Yang, Joost R. de Wijn, Yining Wang, Joop G.C. Wolk , Jansen, J.A. *Physicochemical properties and mineralization assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with hydroxyapatite in simulated body fluid.* Materials Science and Engineering C, 61 (2016) 190-198.

WEBGRAFÍA

Página web número 1:

<http://www.elmundo.es/salud/2015/11/11/564247a346163feb2f8b462a.html>

Página web número 2:

<http://numbersmagazine.com/articulo.php?tit=infecion-en-implantes-humanos>

Página web número 3:

<http://geohabitar-ltda.blogspot.com.es/2012/08/electro galvanismo-bucal-implantes.html>

CAPÍTULO 2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.1. DETECCIÓN DE IONES SECUNDARIOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR TIEMPO DE VUELO (TOF-SIMS, de sus siglas en inglés, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry)

La detección de iones secundarios mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo es una técnica de análisis cualitativo, que proporciona información sobre elementos y moléculas presentes en la superficie de las muestras, en capas finas o interfases. La técnica se basa en la detección de iones secundarios que se emiten desde una superficie que ha sido bombardeada con un haz de iones primarios muy energéticos. Las muestras examinadas mediante esta técnica tienen que tolerar condiciones de ultra alto vacío (UHV), requisito necesario para evitar colisiones con las moléculas de aire de los iones primarios y secundarios en su trayectoria. Además, el mantenimiento de las muestras en condiciones de UHV durante el análisis previene la contaminación de la superficie de las mismas.

Como ya se he comentado en el párrafo anterior, la técnica de TOF-SIMS consiste en el bombardeo de una superficie sólida con un haz de iones primarios, obteniéndose así la emisión de partículas presentes en la superficie del sólido. La mayoría de las partículas emitidas son eléctricamente neutras, pero una pequeña proporción sale de la superficie del sólido cargada positiva o negativamente, en forma de iones atómicos o moleculares (iones secundarios) y pueden ser acelerados hasta el analizador de masas. En un análisis mediante TOF-SIMS, podemos encontrar cualquier ion de los elementos que estén presentes en la superficie de la muestra analizada, así como cualquier molécula ionizada estable que pueda formarse como combinación de esos átomos, aunque hay que tener en cuenta que algunas de esas moléculas pueden tener una probabilidad de formación demasiado baja para ser detectadas. La energía de los iones primarios, que suele estar en el rango de los keV, se transfiere a los átomos de la superficie del sólido por medio de una secuencia de colisiones elásticas en cascada, que son muy energéticas en comparación con las energías de enlace (Fig. 1). Esta energía que se transfiere en las colisiones es capaz de provocar la fragmentación de las moléculas superficiales, algunos de esos fragmentos se forman con una energía cinética suficiente como para superar la energía de unión superficial, siendo liberados de la superficie del sólido (Benninghoven, A., 1973). Sólo las partículas de las capas superiores (entre 1 y 2 nm de profundidad) van a recibir suficiente energía para superar la energía de unión superficial y escapar de la muestra. La zona más cercana al impacto de los iones primarios es la que recibe mayor energía y por lo tanto en ella se produce una gran fragmentación de partículas atómicas. A medida que nos alejamos del área de impacto de los iones primarios, y debido a la colisión en cascada que se produce, las colisiones se vuelven menos energéticas y esto resulta en una fragmentación menor, con producción de fragmentos moleculares mayores (Fig. 1). Tiene especial interés en los análisis de compuestos orgánicos la detección de moléculas de gran masa para obtener información sobre la estructura química del material analizado.

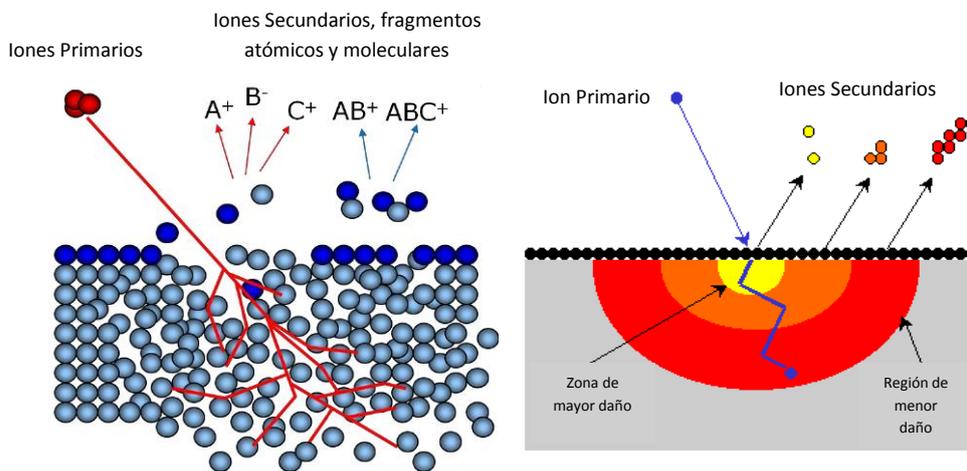


Figura 1. Representación del impacto de iones primarios sobre una superficie sólida y la posterior emisión de iones secundarios. La fragmentación producida en la zona cercana a la colisión produce partículas atómicas y a medida que nos alejamos de la zona de impacto, y debido a que las colisiones se vuelven menos energéticas, los fragmentos van aumentando de tamaño (Imágenes recuperadas de páginas web 1 y 2).

En TOF-SIMS los iones primarios se pueden producir de diversas formas, como por ejemplo mediante ionización de un cierto material por colisión de electrones, mediante ionización térmica, mediante ionización química o empleando una fuente de iones de metal líquido (LMIG), que es el caso del equipo utilizado en esta tesis (el cual opera con una fuente LMIG de Bi). La fuente LMIG (Forbest, R.G., 1997) (Fig. 2) opera por desorción de iones de un metal líquido (normalmente Al, Ga, In o Bi) bajo un fuerte campo eléctrico, con el fin de obtener un haz de iones finamente enfocado y de alta corriente iónica. A grandes rasgos, una aguja fina o capilar se introduce en un depósito de metal líquido, que forma una película sobre la superficie de la aguja. Aplicándole un campo eléctrico de suficiente intensidad, se consigue deformar la película líquida del ápice de la aguja en un saliente en forma cónica, donde los iones se producen por desorción de campo. Posteriormente, el haz de iones se hace pasar por una columna de lentes condensadoras, que focalizan el haz de iones sobre la superficie objetivo. Dependiendo del equipo, el haz de iones primarios puede hacerse incidir sobre la superficie de la muestra con un ángulo de inclinación, que está comprendido entre 0° y 60° respecto a la normal. Antes de que los iones primarios lleguen a la superficie de la muestra, estos son acelerados con una energía en el rango de los KeV.

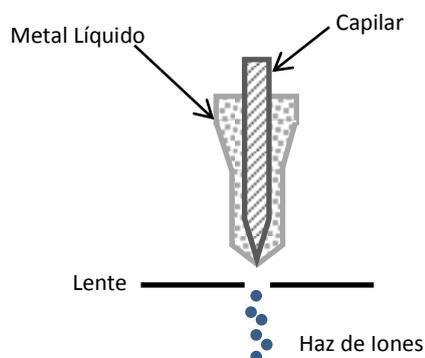


Figura 2. Esquema de la fuente de iones de metal líquido (LMIG).

Se ha comprobado que la naturaleza de la fuente de iones influye en los patrones de fragmentación. Por ello hay estudios que utilizan distintas fuentes de iones sobre una misma superficie para ver cuál es el tipo de ion incidente más apropiado para ella (Xu, J. *et al.*, 2004) (Kollmer, F., 2004). Los estudios realizados por J. Xu *et al.* (Xu, J. *et al.*, 2004) muestran que la cantidad de iones secundarios producida cuando la fuente de iones primarios es Ga^+ es muy inferior a la cantidad producida cuando la fuente de iones primarios es Cs^+ , utilizando una resina sintética como superficie objetivo. Resultado que concuerda con los obtenidos por F. Kollmer (Kollmer, F., 2004), quien hace un estudio de iones primarios monoatómicos (Ga^+ , Cs^+ , Au^+ y Bi^+) y poliatómicos (SF_5^+ , Au_n^+ , Bi_n^+ , C_{60}^+) sobre superficies orgánicas. Como resultado general en ese estudio se obtuvo que la eficiencia de formación de iones secundarios mejora a medida que aumenta la masa del ion monoatómico y además, se obtiene un aumento de la eficiencia adicional cuando se usan iones primarios poliatómicos. De acuerdo con esto, y teniendo en cuenta los iones primarios utilizados en el estudio de Kollmer, las mayores eficiencias de formación de iones secundarios se alcanzan utilizando como ion primario C_{60}^+ y la menor eficiencia con el Ga^+ . Sin embargo, el uso de C_{60}^+ presenta algunas limitaciones, ya que es muy complicado analizar con él áreas pequeñas debido al gran tamaño de la sección del haz de iones (3000 nm^2) que se genera con esta fuente. Como alternativa, se utiliza como haz de iones primarios Bi_3^{2+} , el cual produce haz de iones de sección de unos 100 nm^2 , que es menor incluso del producido por ejemplo, por un haz de iones de Au_3^+ , que estaría entorno a los 200 nm^2 (Kollmer, F., 2004).

Para limitar el análisis mediante TOF-SIMS a las capas superiores de la muestra, minimizar el daño que se pueda realizar a la misma y promover la desorción de grandes fragmentos orgánicos, los experimentos se realizan en el que se denomina modo estático (Kubicek, M. *et al.*, 2014). Es decir, empleando una dosis, D , de iones primarios inferior al límite estático, que se calcula relacionando el número medio de iones primarios (\bar{n}) que golpea un área A con la dosis de iones mediante la expresión:

$$DA = \bar{n} \quad 1$$

Si se asume que para modo estático $\bar{n} < 0,01$ iones y $A = 10 \text{ nm}^2$, entonces el límite estático sería $D < 10^{12}$ iones/ cm^2 . Esta baja densidad de iones primarios garantiza, estadísticamente, que cada ion primario va a golpear una superficie virgen de la muestra, que no esté dañada por un impacto anterior.

Durante el bombardeo de iones primarios en la superficie de la muestra, y debido a las propiedades de la misma, se puede producir una acumulación de carga, que puede reducir o incluso llegar a eliminar la señal de iones secundarios. Para neutralizar esta acumulación de carga en la superficie de la muestra durante el bombardeo, se aplican en la superficie electrones de baja potencia ($<20 \text{ eV}$) (mediante un *flood gun*) entre los pulsos de los iones primarios. La corriente y el voltaje de estos electrones deben ser lo suficientemente bajos para minimizar la emisión de iones estimulada por electrones, así como los daños que se puedan originar en la muestra.

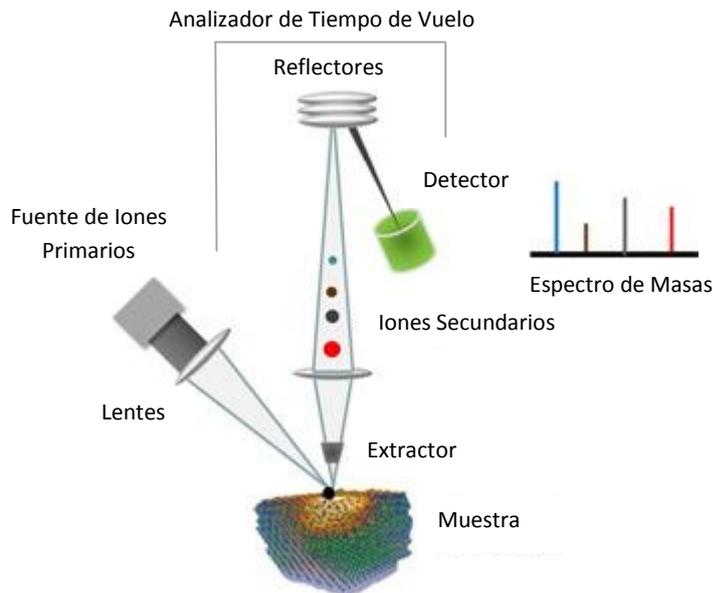


Figura 3. Esquema de la disposición del TOF-SIMS. La fuente de iones primarios, la muestra y el analizador de tiempo de vuelo están en condiciones de ultra alto vacío (UHV) (Imagen recuperada de Kim, Y.P. *et al.*, 2015).

La diferencia fundamental de esta técnica con respecto a la espectrometría de masas (SIMS) es que en TOF-SIMS los iones secundarios liberados de la superficie del sólido son acelerados, mediante un campo electrostático aplicado en el extractor, hasta el detector, para separarlos según su masa, dependiendo del tiempo que necesiten para recorrer una distancia determinada (Fig. 3) (Belu, A.M. *et al.*, 2003). En el analizador de tiempo de vuelo (Fig. 4) los iones secundarios son sometidos a un potencial eléctrico, que les confiere a todos ellos una misma diferencia de potencial, de tal forma que la energía vendrá dada por:

$$E = qV_0 = \frac{1}{2}mv^2 \quad 2$$

De esta ecuación (2) podemos obtener una relación inversamente proporcional entre la velocidad y la masa de los iones:

$$v = \sqrt{\frac{2qV_0}{m}} \quad 3$$

En la figura 4 se puede observar que el analizador posee un tubo para el vuelo de longitud L , que está libre de campo y por el que los iones se mueven a una velocidad constante hasta alcanzar el detector. Así, el tiempo que tarda un ion en atravesar el tubo de vuelo se puede obtener de la ecuación (3):

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2qV_0}} \quad 4$$

La carga de los iones secundarios equivale a $q = ze$, donde z es el número de carga y e la carga elemental y si sustituimos esto en la expresión (4), se obtiene la relación entre masa-carga, que en TOF-SIMS se suele expresar como m/z , con el tiempo de vuelo. Dado que el tiempo de

vuelo es proporcional a la raíz cuadrada de la masa del ion secundario, los iones más ligeros viajarán a una velocidad más rápida y llegarán al detector antes que los iones más pesados.

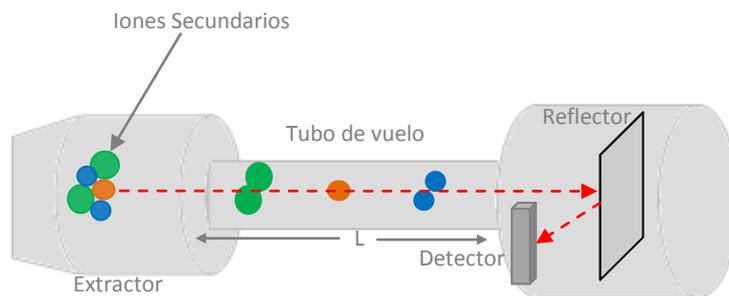


Figura 4. Esquema del analizador del tiempo de vuelo, donde los iones más pequeños tardan menos tiempo en recorrer la longitud del tubo de vuelo que los iones con mayor masa.

Como se ha mencionado anteriormente, los iones secundarios no son generados en un punto geométrico de la superficie de la muestra analizada, sino en un volumen, lo que da lugar a una cierta dispersión angular en las velocidades que alcanzan los iones en el proceso de aceleración. Este hecho puede producir que iones de la misma masa lleguen al detector a tiempos distintos. Esta dispersión angular de los iones secundarios puede compensarse utilizando elementos de enfoque tales como espejos iónicos, también llamados reflectores. Un reflector enfoca los iones secundarios con la misma masa a través de un campo eléctrico de retardo, dando como resultado una separación en las masas de los iones mejorada (Niehuis, E. *et al.*, 1987).

Los iones secundarios, una vez son enfocados por el reflector, golpean la unidad de detección, que para TOF-SIMS normalmente es de tipo multiplicador de electrones, de caja de Faraday o multicanal. En el caso del equipo utilizado en esta tesis, el detector empleado es un electromultiplicador, que se basa en el efecto cascada producido al impactar un determinado ión sobre una placa o dínodo. Al chocar los iones contra la placa, ésta emite una corriente de electrones que son acelerados hacia una segunda placa, de la que vuelven a arrancar electrones que son acelerados hacia una tercera placa y así en repetidas ocasiones (generalmente se utilizan entre 10 y 16 placas).

Mediante la relación masa-carga de los iones secundarios se obtienen los espectros de masas de iones positivos o negativos. Estos espectros consisten en la representación de m/z de cada ion en función del número de iones detectados para cada masa (se puede ver un ejemplo de espectro característico obtenido mediante TOF-SIMS en la Fig. 5).

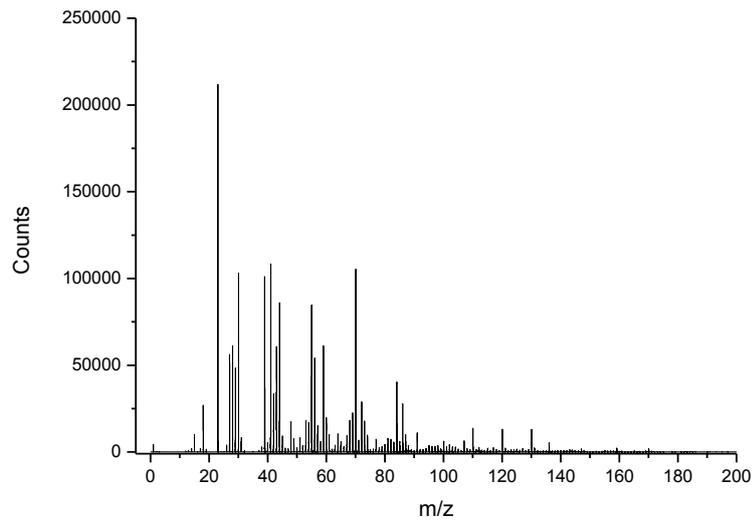


Figura 5. Espectro de masas de iones positivos de una muestra de Ti6Al4V con una capa orgánica adsorbida en su superficie.

Una vez que se obtiene el espectro con las medidas experimentales, el primer paso para analizar esos resultados es realizar una calibración del mismo para minimizar posibles desplazamientos que se puedan producir en los picos, eligiendo unos determinados iones, que dependen de si el espectro es de iones positivos o negativos. Para la calibración de espectros de iones positivos, se suelen elegir los iones H^+ , H_2^+ , H_3^+ , C^+ , CH^+ , CH_2^+ , CH_3^+ , $C_2H_3^+$, $C_3H_5^+$ y $C_7H_7^+$. Para la calibración de espectros de iones negativos, los iones seleccionados son H^- , C^- , CH^- , CH_2^- , OH^- , C_2^- , C_3^- , C_4^- , C_5^- y C_6^- . Los espectros de masas contienen un gran número de picos y una vez están calibrados, evaluando la relación masa-carga de cada uno de ellos, se puede determinar a qué ion corresponde. Los métodos utilizados para evaluar las señales TOF-SIMS son similares a los utilizados con la espectrometría de masas convencional. Una opción es comparar el espectro de masas de la muestra con espectros estándares usando bibliotecas espectrales (Briggs, D. *et al.*, 1989) o bases de datos (Surface Spectra Ltd, página web 3). En la actualidad la mayoría de los softwares proporcionados por las casas comerciales de fabricación de estos equipos disponen de una base de datos para la identificación de picos. Pero los espectros de masas resultantes de las medidas de TOF-SIMS son muy complejos. Por ejemplo en el caso de las proteínas, formadas por combinaciones de 20 aminoácidos y con pesos moleculares que pueden alcanzar hasta el millón de daltons, al ser bombardeadas pueden descomponerse en una enorme cantidad de fragmentos diferentes, visibles como picos en el espectro de masas (Fig. 5). Por este motivo, y para este tipo de muestras (Wagner, M. S. y Castner, D. G., 2001, 2003), es muy común utilizar análisis mediante componentes principales (PCA) (Graham, D.J. y Castner, D.G., 2012). Este método de análisis es un método estadístico de álgebra lineal cuyo objetivo es concentrar la información contenida en un conjunto de datos en un pequeño número de variables, perdiendo la menor cantidad de información posible (Wold, S. 1987).

Además de los espectros obtenidos en la superficie de las muestras, es posible obtener perfiles de profundidad mediante la aplicación de iones de baja energía, que para el equipo utilizado en esta tesis son de O^- o Cs^+ . En este caso, el equipo trabaja en modo de doble haz, de

tal forma que un haz de iones de baja energía se utiliza en primer lugar para arrasar un área determinada de la muestra y tras el arrase se emplea el haz de iones primarios, que se hace incidir en el fondo del cráter erosionado, obteniéndose así el espectro de masas a esa profundidad.

2.1.1. Análisis mediante componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales consiste en encontrar transformaciones ortogonales de las variables originales para conseguir un nuevo conjunto de variables independientes, denominadas componentes principales (PCs). Estas nuevas variables son combinación lineal de las componentes originales y se obtienen en orden decreciente de varianza de los datos (Jolliffe, I.T., 2002) (Wagner, M.S. y Castner, D.G., 2001). Se espera que, solo unas pocas de estas nuevas PCs (las primeras) recojan la mayor parte de la variabilidad o varianza de los datos, obteniéndose una reducción de la dimensión en los mismos. Una vez calculadas las PCs, se suelen representar estas nuevas variables, de tal forma que se puedan identificar patrones en datos, de tal forma que sus semejanzas y diferencias sean resaltadas.

Supongamos que se representa un espectro de masas por un vector columna \vec{x} , de longitud m y que contiene como elementos las intensidades de los m picos seleccionados del espectro. Si en la medida se dispone de n espectros, es posible construir una matriz X con los $n \times m$ datos originales, donde las filas (n) son las muestras (es decir, los espectros) y las columnas (m) las variables (es decir, los picos):

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{nm} \end{pmatrix} \quad 5$$

Mediante el análisis por PCA lo que se busca es una base para representar el conjunto de datos de una manera que concentre la información en sólo algunos de los vectores de la nueva base. Los vectores creados en la nueva base, deben ser combinación lineal de los antiguos, así cada una de las nuevas variables debe ser una combinación lineal de las m variables originales:

$$Y_k = a_{k1}x_1 + \cdots + a_{km}x_m = \sum a_{kj}x_j, k = 1, \cdots m \quad 6$$

donde a_{k1}, \dots, a_{km} son constantes numéricas. Las nuevas variables Y_k o componentes principales tienen que tener la varianza máxima en orden decreciente y además no estar correlacionadas entre sí. Estas PCs se obtienen diagonalizando la matriz de covarianzas S o la de correlaciones R de las variables medidas originalmente. Las constantes a_{k1}, \dots, a_{km} se obtienen con las coordenadas de los vectores propios asociados a los valores propios de S o R , ordenados de forma decreciente, que representan las varianzas de las PCs.

Por lo tanto en el análisis mediante PCA la nueva matriz de vectores, que se denomina como Y , se consigue mediante una matriz de transformación A , de tal forma que:

$$Y = AX \quad 7$$

donde A es una matriz ortogonal que va a proporcionar unos nuevos parámetros (componentes principales) que no están correlacionados, cuyas componentes son los vectores propios de la matriz de covarianza.

En muchas ocasiones es difícil encontrar el significado de las componentes principales como variables compuestas, por lo que el uso principal de esta técnica es la reducción de la dimensión del número de variables.

En los análisis mediante PCA, la representación gráfica se hace en un nuevo conjunto de ejes que viene dado por las componentes principales. Lo que se suele representar son los primeros dos o tres vectores de puntuaciones (scores) y vectores de carga (loading) (Fig. 6). En estas representaciones, las muestras que están más separadas a lo largo de estos nuevos ejes no son tan similares como las muestras que se agrupan juntas. Como puede observarse en la figura 6, donde se muestra la representación de las puntuaciones de los resultados obtenidos mediante un análisis mediante PCA, los puntos con la misma numeración están agrupados, lo que significa que son similares entre sí en esta nueva representación. En este ejemplo, el nuevo conjunto de ejes, representados por los PCs 1 y 2 agrupan el 92% de la varianza de este conjunto de datos. Normalmente, en la representación de un gráfico de puntuaciones bidimensional, es posible dibujar una elipse de probabilidad alrededor de un grupo de datos, donde el centro de esa elipse vendrá dado por el valor medio de esos datos, para estos ejes. Además las dos PCs utilizadas definirán las direcciones de los ejes de la elipse, donde PC1 dará la dirección de mayor varianza, que se corresponde con el eje mayor de la elipse.

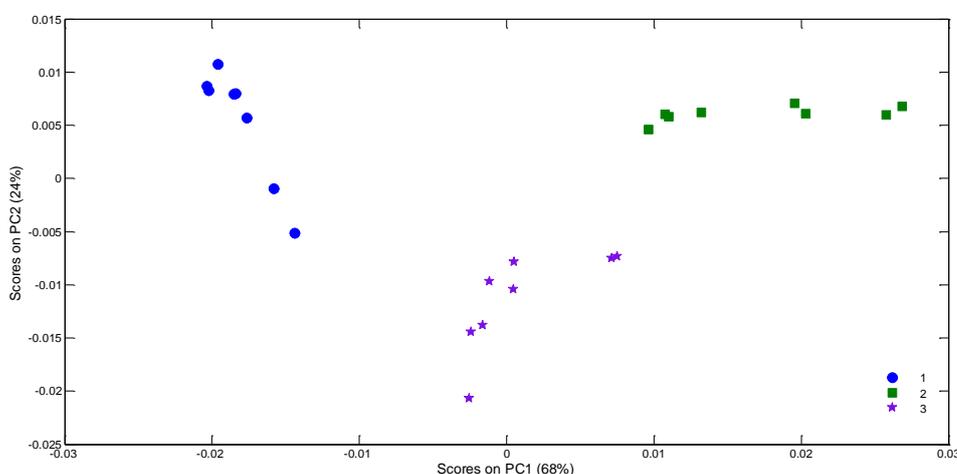


Figura 6. Resultados obtenidos mediante PCA para tres muestras con diferentes condiciones en la adsorción de proteínas representados en el gráfico de puntuaciones.

2.2. ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS, de sus siglas en inglés, X-ray photoelectron spectroscopy)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X es una técnica de caracterización superficial que proporciona información acerca de la composición atómica de la muestra y también sobre la estructura y el grado de oxidación de los elementos que están presentes en su superficie. La técnica se basa en la emisión de electrones de los átomos de la superficie del material gracias a la energía que reciben de fotones de rayos X que se hacen incidir sobre el mismo. A pesar de que los rayos X son altamente penetrantes en la materia, sólo se obtiene información con esta técnica de los primeros 2 – 3 nm de profundidad. Esta característica le viene conferida por el escaso recorrido libre medio de los electrones dentro de los sólidos, de modo que sólo aquellos electrones que han sido emitidos suficientemente cerca de la superficie de la muestra escapan del material y pueden ser por tanto detectados. Conforme nos vamos introduciendo en el material la probabilidad de escape de los electrones emitidos por los átomos va disminuyendo hasta hacerse prácticamente nula a unos 10 nm de profundidad.

El hecho de que sean electrones las partículas detectadas, hace que se tenga que operar en condiciones de ultra alto vacío (Ultra High Vacuum, UHV), para evitar la neutralización de los mismos por especies gaseosas presentes en el medio antes de alcanzar el detector.

La técnica XPS se fundamenta en el efecto fotoeléctrico, descubierto en 1887 por H. Hertz y descrito teóricamente por Einstein en 1905. Según detalla este efecto, una superficie expuesta a radiación electromagnética de frecuencia superior a cierta frecuencia umbral, dependiente del material, absorberá los fotones incidentes emitiendo electrones. Por lo tanto, esta técnica consiste en la excitación de los átomos de la superficie de un sólido mediante bombardeo de fotones de rayos X de energía conocida. De esta forma se consigue que los electrones de las capas más internas de esos átomos excitados sean extraídos de la superficie de la muestra a estudiar (Fig. 7) siempre que la energía de los fotones sea muy superior a la energía umbral necesaria para expulsar un electrón del átomo (Wagner, C.D., *et al.*, 1979). La relación entre las energías de los fotones de rayos X y de los electrones liberados viene dada por la ecuación de Einstein, que para el caso de sólidos es:

$$E_B = h\nu - E_K - \phi \quad 8$$

donde E_K es la energía cinética del electrón detectado, $h\nu$ la energía de los fotones de rayos X y ϕ la función trabajo del material, o energía mínima necesaria para arrancar un electrón de un sólido. E_B la energía de ligadura correspondiente al nivel atómico desde el cual el electrón fue emitido. Así, la medida de la energía cinética del fotoelectrón permite determinar su energía de ligadura, E_B , la cual es característica de cada elemento y nivel atómico.

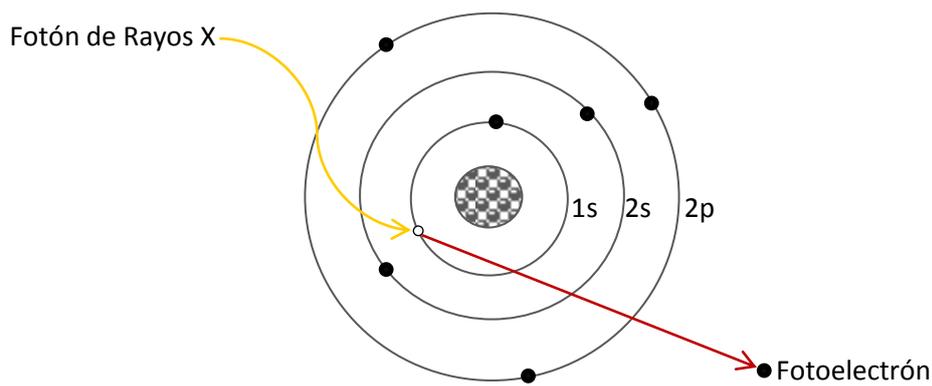


Figura 7. Representación de la emisión de electrones de las capas internas del átomo por impacto de fotones de rayos X.

Se puede considerar que la energía de ligadura es, de algún modo, una medida de la intensidad de la interacción entre el electrón y la carga nuclear, y por lo tanto la energía de ligadura sigue la energía de los niveles electrónicos, es decir, $E_B(1s) > E_B(2s) > E_B(2p) > E_B(3s)$, etc. Y además, la energía de ligadura de un orbital aumenta con el número atómico Z , así, por ejemplo $E_B(\text{Na}1s) < E_B(\text{Mg}1s) < E_B(\text{Al}1s)$.

Las vacantes creadas en las capas internas de los átomos de la superficie del sólido al emitirse un fotoelectrón, pueden ser ocupadas con electrones de niveles energéticos más altos dando lugar a la emisión de un fotón para compensar el balance energético entre los niveles. Este fotón creado puede ser absorbido por un electrón de los niveles menos energéticos del átomo, siendo este electrón también emitido (Electrón Auger) (Fig. 8).

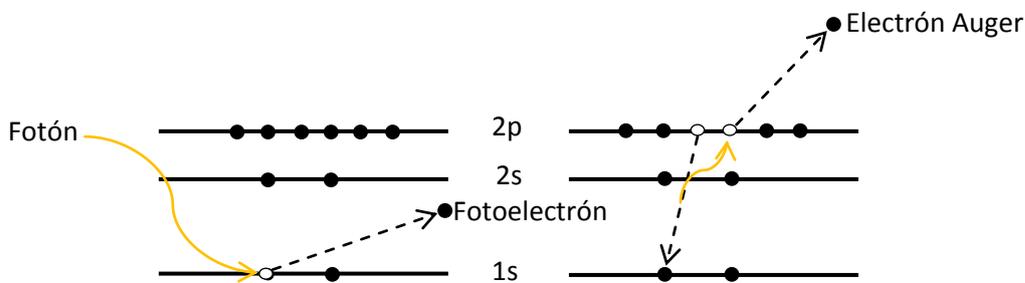


Figura 8. Diagrama esquemático del proceso de fotoemisión y de la subsiguiente emisión Auger.

Mediante la técnica XPS lo que se pretende es correlacionar las energías de ligadura medidas experimentalmente con las calculadas a partir de parámetros atómicos. Estrictamente hablando, E_B es la diferencia entre la energía del átomo después de la fotoionización y antes de ella, o sea, entre el estado final de $n-1$ electrones y el estado inicial de n electrones:

$$E_B = E_f(n - 1) - E_i(n) \quad 9$$

donde $E_f(n - 1)$ es la energía del estado final y $E_i(n)$ es la energía del estado inicial. Si no se tienen en cuenta los cambios producidos por la ionización en los orbitales del sistema, es decir, si no hay reordenamiento de los otros electrones en el átomo durante el proceso de fotoemisión, se puede simplemente igualar la energía de ligadura E_B con el negativo de la

energía del orbital del electrón emitido, $-\varepsilon_k$. Esta aproximación se denomina Teorema de Koopmans (Pankratov, O.A. y Povarov, P.P., 1989):

$$E_B \cong -\varepsilon_k \quad 10$$

Los valores de ε_k se pueden calcular usando el método de Hartree-Fock, el cual proporciona una buena aproximación para los niveles profundos. Sin embargo, generalmente, las energías de ligadura medidas experimentalmente en XPS son inferiores a las predichas por el teorema de Koopmans, lo que es una indicación de que los efectos de la configuración del estado inicial y del estado final influyen notablemente sobre el valor de las energías de ligadura, hecho que veremos a continuación.

Se entienden por efectos del estado inicial aquellos factores que afectan al estado energético de los electrones del átomo antes de que sea ionizado en un nivel interno por un fotón de rayos X, ya que, como se observa en la ecuación (9) la energía de dicho estado contribuye a la energía de ligadura. Se pueden describir como efectos del estado inicial el desplazamiento químico y la interacción espín-órbita. El efecto por desplazamiento químico aparece como consecuencia del cambio que se produce en la energía de enlace de un nivel atómico como consecuencia de la unión iónica o covalente del átomo en una molécula, por ello, el pico de fotoemisión recogido en el espectro XPS aparece desplazado de su posición teórica. Esto es, la transferencia de carga en los enlaces moleculares puede dejar a los átomos con carga parcial positiva (o negativa), conduciendo a un cambio hacia energías de enlace más altas (o bajas) asociadas con un aumento (o disminución) de la atracción coulombiana entre los electrones y el núcleo del átomo. Con respecto a la interacción espín-órbita, se entiende por tal a la interacción magnética entre el momento magnético de espín y el momento magnético orbital o, entre el espín de un electrón y su momento angular orbital. Esta interacción posee una magnitud que aumenta con el incremento del número atómico, y sólo se encuentra cuando en un ion se tiene una configuración electrónica con degeneración orbital. Por ejemplo, cuando un electrón es expulsado de una capa p completamente llena, el electrón desapareado restante puede tener su espín paralelo o antiparalelo a su momento angular orbital. Este hecho resulta en dos estados iónicos con momento angular total diferente. Las dos componentes del momento angular total serán observadas en el espectro fotoelectrónico separadas por cierta cantidad de energía. Además, la intensidad de cada componente es proporcional a $2j + 1$, tal que la relación de las intensidades de los picos $2p_{3/2}$ y $2p_{1/2}$ es 2:1.

Por otro lado, se entienden por efectos del estado final aquellos factores que afectan al estado de carga del átomo después que el fotón ha impactado contra el átomo o el fotoelectrón está abandonándolo. Los efectos del estado final que se reflejan en los espectros XPS son los efectos de relajación, los picos satélites *shake-up* y los multipletes. El proceso de fotoemisión deja un hueco localizado en el átomo que puede disiparse y tornarse deslocalizado debido a un proceso de difusión de carga. Este proceso de difusión de carga se llama relajación y es un proceso muy rápido en la mayoría de los elementos. Los picos satélites *shake-up* son estructuras que representan a los fotoelectrones que han perdido energía debido a la promoción de electrones de valencia desde un nivel de energía ocupado a un nivel de energía más alto desocupado. Puesto que la diferencia de energía entre un nivel y otro está cuantizada, la pérdida de energía cinética que experimentan los fotoelectrones posee un valor específico, y por ende,

los satélites *shake-up* aparecen desplazados una cantidad de energía determinada hacia energías de enlace ligeramente mayores a las del pico primario con el cual están relacionados. Por último, los multipletes son debidos a átomos que tienen un electrón desapareado en los niveles de valencia y en ellos la fotoemisión de un electrón de un orbital profundo puede causar dos estados finales diferentes, dependiendo de si los dos electrones desapareados se alinean con sus espines paralelos o antiparalelos.

Un espectro XPS (Fig. 9), que no es sino la representación del número de electrones registrados por el detector en función de la energía cinética (o de la energía de ligadura) del fotoelectrón emitido, permite determinar la composición química, exceptuando los elementos con $Z < 2$, de la superficie de forma cualitativa. En los espectros XPS se puede distinguir una estructura primaria de picos correspondientes a las energías orbitales de los elementos detectados en la superficie de las muestras o picos de fotoemisión (marcada en verde en la figura 9, *) y a las líneas Auger (marcada en naranja en la figura 9, #). Una estructura secundaria formada por picos de origen instrumental y del resto de procesos que ocurren junto al de emisión del fotoelectrón, que son en su mayoría debidos a los efectos del estado final (marcada en azul en la figura 9, +), y un fondo continuo debido a los fotoelectrones que han sufrido colisiones inelásticas tras la fotoemisión, y por lo tanto tienen una energía inferior a la que habrían tenido si hubiesen llegado al detector con una trayectoria sin choques.

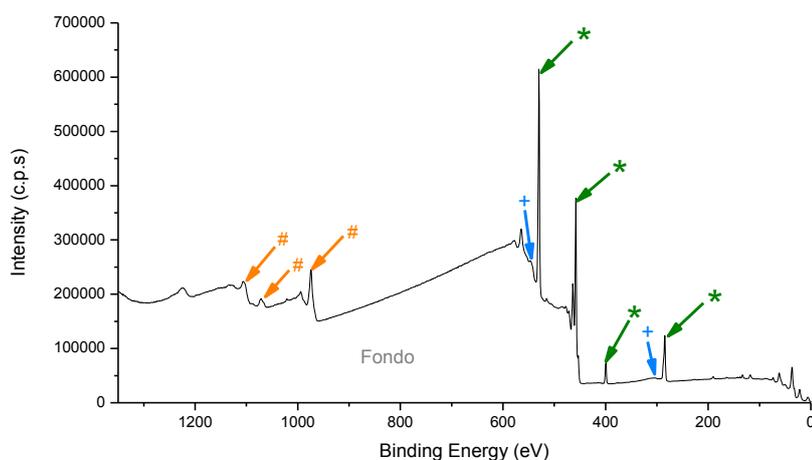


Figura 9. Ejemplo de un espectro XPS de una muestra de Ti con una capa orgánica adsorbida a su superficie, donde se puede distinguir la estructura característica de estos espectros.

Con los equipos de XPS, además de obtener un espectro general de la muestra, que suele ir de 0 a 1350 eV de energía de ligadura, es posible conseguir detalles de cada nivel electrónico mediante el registro del espectro en un rango estrecho de energías. Esto es lo que se conoce como espectros de alta resolución (Fig. 10). Con estos análisis focalizados se obtienen picos con mayor definición, que nos permiten determinar el estado químico de cada elemento, mediante un análisis por deconvolución (Carley, A.F. y Joyner, R.W., 1979). Para conseguir esta información se limita el intervalo de energías (espectros que cubren un rango de unos 10 eV, dependiendo de la anchura del pico) a la zona del espectro donde se encuentra el pico de interés. Además, se incrementa el número de datos obtenidos en cada intervalo de energía de

enlace, así como el número de acumulaciones en cada punto del espectro para obtener una mayor calidad de la señal.

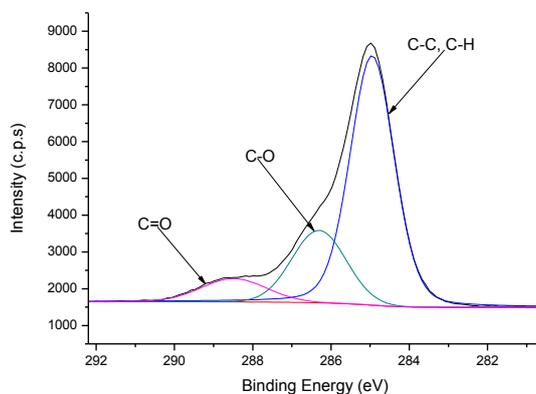


Figura 10. Ejemplo de espectro de alta resolución del pico del C1s y su análisis mediante deconvolución, obteniéndose así los posibles enlaces entre este elemento y el resto de elementos que están presentes en la superficie de la muestra analizada.

Tras obtener un espectro XPS experimental, el procedimiento a seguir para su análisis es en primer lugar realizar una calibración del espectro. Con esta calibración se pretende asignar correctamente las posiciones de los picos a los valores de la energía. Para ello se escoge de referencia un pico del que conozcamos su energía de enlace, y que sea, en la medida de lo posible, independiente de la muestra. En general, la mayoría de las muestras presentan una capa de contaminación ambiental, que se refleja en los espectros por la presencia de un pico de carbono correspondiente a su contaminación superficial. Este pico, que corresponde al nivel C1s, que se posiciona a 285 eV de energía de enlace, se utiliza para realizar la calibración. En segundo lugar se procede a extraer la línea base del fondo continuo y para ello se suelen utilizar algoritmos iterativos. Uno de los más utilizados es el método Shirley (Shirley, D.A., 1972) (Végh, J., 2006) que es el que se emplea en esta tesis. Este método considera la existencia de un fondo que, en cada punto, proviene exclusivamente de los electrones que, con energía cinética superior a la de ese punto, han sufrido dispersión inelástica. Una vez calibrado y extraída la línea base, se identifican cada uno de los picos presentes en el espectro, tanto los de la estructura primaria como los de la secundaria. A la hora de realizar una cuantificación de los elementos presentes en la superficie de la muestra sólo se valorarán los fotopicos o picos de fotoemisión, que como ya se ha mencionado forman parte de la estructura primaria del espectro.

Los equipos XPS están compuestos por una serie de elementos fundamentales (Fig. 11), como son la cámara de ultra alto vacío, la fuente de rayos X, el analizador de energía de electrones y el detector de electrones (Watts, J.F. y Wolstenholme, J., 2003). Como ya se ha indicado en el inicio de esta sección, los experimentos de XPS deben realizarse en condiciones de UHV y para ello se suelen combinar, en estos equipos, varias bombas de vacío, de tipo rotatorio, de difusión o turbomoleculares. Como fuente de rayos X, las más utilizadas son las líneas K α del Al y del Mg cuyas energías y anchuras de línea son 1486,6 eV y 0,85 eV para el Al y 1253,6 eV y 0,7 eV para el Mg. Ambas tienen la capacidad de ser lo suficientemente energéticas como para arrancar electrones de las capas más profundas del átomo de la mayoría de los elementos y tener la suficiente intensidad como para producir un flujo detectable de fotoelectrones. Estos

rayos X son producidos por el choque de un haz de electrones de alta energía (10 keV) contra un blanco, en el que tras el impacto de los electrones se crean vacantes en los niveles atómicos profundos y como consecuencia de esto los átomos quedan en estado excitado. Para disminuir la energía de ese estado, tal y como se ha explicado al comienzo de esta sección (Fig. 8), las vacantes serán ocupadas por electrones de niveles superiores, tras lo que se produce la emisión de electrones Auger y rayos X. Con respecto a los analizadores, los más utilizados en XPS son los de tipo hemisférico concéntrico, que constan de dos hemiesferas concéntricas, estando la externa conectada a un potencial negativo y la interna a un potencial positivo. Los electrones emitidos por la muestra entran al analizador donde la influencia del campo eléctrico, generado entre las dos hemiesferas, los obliga a seguir trayectorias curvas. La energía que idealmente ha de tener un haz de electrones que incida perpendicularmente a una rendija de entrada del analizador centrada y puntual para que describiendo una trayectoria circular alcance el detector viene dada por:

$$e\Delta V = E_0 \left(\frac{R_e}{R_i} - \frac{R_i}{R_e} \right) \quad 11$$

donde e es la carga del electrón, ΔV la diferencia de potencial entre las hemiesferas de radios R_e (exterior) y R_i (interior) y E_0 la energía de paso o de transmisión.

En la práctica, como ΔV , es complicado fijarlo con tanta precisión como se desee y rendijas de entrada puntuales implicarían unos conteos despreciables, se utiliza una mayor apertura de las rendijas (de entrada y salida), para conseguir que electrones con otras trayectorias diferentes a la circular alcancen el detector, aumentando así la tasa de conteo, aunque con una consiguiente dispersión ΔE en las energías E analizadas. Esta dispersión se describe como la anchura a media altura del espectro cuentas/energía.

Una vez los electrones pasan el sistema analizador, son contados. Uno de los medios más eficientes es mediante un detector multiplicador multicanal, que es el detector que tiene el equipo XPS utilizado en esta tesis. En este tipo de detectores se recubren sus paredes internas con un material que emite electrones secundarios al ser golpeado por un electrón y su funcionamiento es el mismo descrito para el detector multiplicador de electrones del equipo TOF-SIMS (pág. 4 de este capítulo).

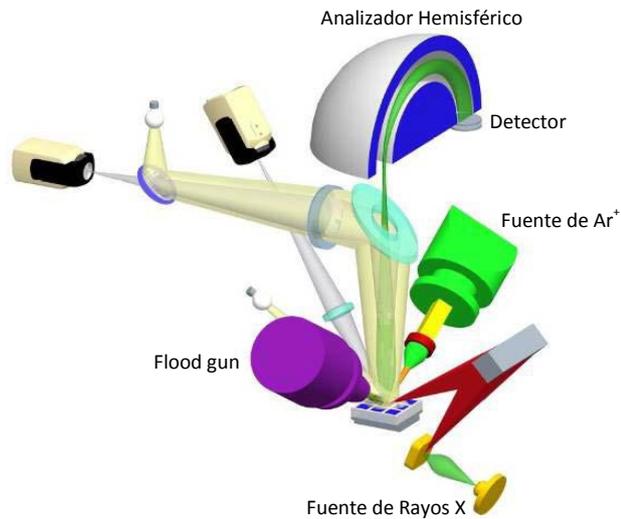


Figura 11. Esquema de la disposición del equipo XPS (Imagen recuperada de página web 4).

Además, al igual que el equipo de TOF-SIMS descrito, el equipo de XPS tiene incorporada una fuente iónica de baja energía, normalmente Ar^+ , y flujo elevado para obtener perfiles en profundidad en el análisis de las muestras. Y una fuente de electrones de baja potencia (*flood gun*) para neutralizar la acumulación de carga que se puede producir en la superficie de determinadas muestras.

3. GONIOMETRÍA DE ÁNGULO DE CONTACTO

Esta técnica de caracterización se usa para determinar la energía libre superficial de materiales sólidos mediante la obtención del ángulo de contacto que forma una gota de un líquido sobre su superficie. El ángulo de contacto (θ) es aquel que forma la tangente al contorno de la gota con el punto de equilibrio termodinámico entre la fase sólida (s), líquida (l) y vapor (v) del sistema objeto de estudio (Fig. 12).

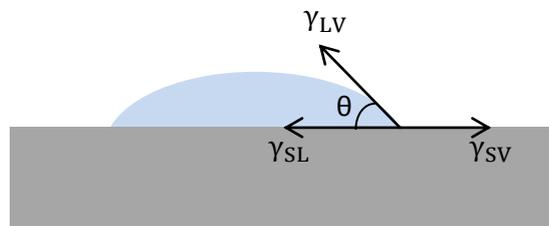


Figura 12. Ángulo de contacto de un líquido (θ) sobre una superficie sólida.

En equilibrio termodinámico, las tensiones interfaciales sólido-líquido (γ_{SL}), sólido-vapor (γ_{SV}) y líquido-vapor (γ_{LV}) se relacionan con el ángulo de contacto que forma una gota de un líquido sobre una superficie sólida, rígida y homogénea, mediante la ecuación de Young (Young, T., 1805):

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad 12$$

Como se indica en el párrafo anterior, la ecuación de Young requiere que las fases que intervienen en el cálculo de la tensión superficial del sólido estén en equilibrio termodinámico y por lo tanto, la fase gaseosa ha de ser vapor saturado del líquido. De este modo, sobre la superficie del sólido se formará una película adsorbida de este vapor, caracterizada por una presión superficial o presión de esparcimiento, π_e . Así la ecuación de Young pasa a ser:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} - \pi_e \quad 13$$

Con esta ecuación (13) Bangham y Razouk (Bangham, D.H. y Razouk, R.I., 1937) pusieron de manifiesto que en la ecuación de Young el término γ_{SV} no proporciona la tensión superficial del sólido (γ_S) sino la tensión interfacial del sólido en equilibrio con el vapor del líquido empleado para formar la gota. Normalmente se considera que la presión superficial (π_e) es nula o despreciable cuando se trata de líquidos que presentan un ángulo de contacto mayor que cero sobre sólidos de baja energía superficial.

De la ecuación de Young, por tanto, se puede obtener una relación entre la tensión superficial del sólido y la tensión interfacial sólido-líquido, a través de la medida del ángulo de contacto de una gota de un líquido sobre el sólido. El ángulo de contacto y la tensión superficial líquido-vapor se determinan de forma experimental. Así, en la ecuación de Young quedarían dos incógnitas, la tensión superficial del sólido y la tensión interfacial sólido-líquido, que no pueden ser calculadas de forma directa. Por este motivo se proponen una serie de modelos en los que la tensión superficial, tanto del sólido como del líquido, pueden ser expresadas como la suma de varias componentes. Cada una de estas componentes se relaciona con un tipo de interacciones o fuerzas moleculares. En estos modelos la tensión interfacial viene dada como una cierta función de estas componentes de las tensiones del sólido y del líquido.

Con lo expuesto en el párrafo anterior, la tensión superficial de cualquier material se describiría como la suma de unas componentes independientes, provenientes cada una de ellas de un tipo de interacción intermolecular diferente. Por un lado se pueden agrupar las contribuciones debido a las fuerzas dispersivas (γ^d) o de London, que son aquellas que surgen entre moléculas no polares, en las que pueden aparecer dipolos instantáneos temporales cuando se acercan las moléculas, que provocan fuerzas dipolo inducido-dipolo inducido, y por el otro aquellas debidas a fuerzas no dispersivas (γ^{nd}), que son las fuerzas dipolo-dipolo, ya sean entre dipolos permanentes o dipolo permanente-dipolo inducido, y puentes de hidrógeno.

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^{nd} \quad 14$$

Admitiendo esta aditividad de las componentes de la tensión superficial, se puede definir un material apolar como aquel que sólo tiene componente dispersiva y un material polar como aquél que tiene, tanto componente dispersiva como no dispersiva.

Teniendo en cuenta esta definición de tensión superficial en la ecuación de Young (12), se obtiene un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas. Por lo tanto serán necesarios los ángulos de contacto de dos líquidos, uno polar y otro apolar cuyas componentes de la tensión superficial se conozcan, para obtener una solución para la tensión superficial del sólido.

Pero solo el análisis basado en este tipo de componentes dispersivas y no dispersivas, y en consecuencia en las fuerzas intermoleculares que implican cada una de ellas, no explicaran satisfactoriamente el comportamiento de algunos sólidos especialmente en presencia de agua. Van Oss *et al.* proponen que estas discrepancias aparecen como consecuencia del posible carácter electrón-donador o electrón-aceptor, según el concepto de Lewis, que puede tener un compuesto, y que origina la posibilidad de un tipo de interacción asimétrica, de corto alcance, que exige que cada una de las moléculas que interaccionen tengan un comportamiento opuesto. Para explicar esta actuación, Van Oss-Chaudhury-Good (VOCG) (Van Oss, C.J. *et al.*, 1988) sugieren definir la tensión superficial como la suma de dos componentes. Una de esas componentes sería debida a interacciones Lifshitz-van der Waals, γ^{LW} , en la que se engloban las fuerzas de London, las dipolo-dipolo y las dipolo-dipolo inducido, y la otra a interacciones ácido-base, γ^{AB} . De modo que la tensión superficial total es:

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad 15$$

donde la componente ácido-base es el resultado de la combinación de los parámetros electrón-aceptor (γ^+) y electrón-donador (γ^-) de las moléculas polares:

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \cdot \gamma^-} \quad 16$$

Utilizando este modelo para la tensión interfacial para el caso de los sistemas sólido-líquido:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} - 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} - 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad 17$$

Esta ecuación, junto con la de Young (12), proporcionan un sistema de ecuaciones (18) con el que es posible calcular la tensión superficial del sólido a partir de sus componentes, γ_S^{LW} y γ_S^{AB} , midiendo los ángulos de contacto de tres líquidos diferentes de componentes y parámetros conocidos.

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad 18$$

La obtención de los ángulos de contacto de gotas de un líquido sobre superficies sólidas se realiza utilizando un goniómetro (Fig. 13), el cual está montado sobre un banco horizontal. Los componentes principales de este equipo son una fuente de iluminación, un sistema automático de deposición de gotas, un soporte móvil para muestras, que nos permite adecuar la altura y la posición de la misma para la deposición de la gota del líquido. Y una cámara para la adquisición de imágenes, conectada a un ordenador. Las imágenes captadas son usadas posteriormente para determinar el valor del ángulo de contacto, que en el caso de los estudios realizados en esta tesis se obtienen mediante el software proporcionado por la casa comercial del equipo (Drop Shape Analysis).



Figura 13. Imagen del goniómetro Krüss G20/DSA10, empleado en el transcurso de esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

Bangham, D.H. y Razouk, R.I. *Adsorption and the wettability of solid surfaces*. Transactions of the Faraday Society, 33 (1937) 1459-1463.

Belu, A.M., Graham, D.J. y Castner, D.G. *Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces*. Biomaterials, 24 (2003) 3635-3653.

Benninghoven, A. *Surface investigation of solids by the statical method of secondary ion mass spectroscopy (SIMS)*. Surface Science, 35 (1973) 427-457.

Briggs, D., Brown, A. y Vickerman, J.C. *Handbook of static secondary ion mass spectrometry (SIMS)*. UK: Wiley, (1989).

Carley, A.F. y Joyner, R.W. *The application of deconvolution methods in electron spectroscopy- A review*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 16 (1979) 1-23.

Forbest, R.G. *Understanding how the liquid-metal ion source works*. Vacuum, 48 (1997) 85-97.

Graham, D.J. y Castner, D.G. *Multivariate analysis of ToF-SIMS data from multicomponent systems: The Why, When, and How*. Biointerphases (2012) 7-49.

Jolliffe, I.T. *Principal component analysis*. Springer, New York, second edition, 2002.

Kim, Y.P., Shon, H.Y., Shin, S.K. y Lee, T.G. *Probing nanoparticles and nanoparticle-conjugated biomolecules using time-of-flight secondary ion mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 34 (2015) 237-247.

Kollmer, F. *Cluster primary ion bombardment of organic materials*. Applied Surface Science, 231-232 (2004) 153-158.

Kubicek, M., Holzlechner, G., Opitz, A.K., Larisegger, S., Hutter, H. y FleiglInstitute, J. *A novel ToF-SIMS operation mode for sub 100 nm lateral resolution: Application and performance*. Applied Surface Science, 289 (2014) 407- 416.

Niehuis, E., Heller, T., Feld, H. y Benninghoven, A. *Design and performance of a reflectron based time-of-flight secondary ion mass spectrometer with electrodynamic primary ion mass separation*. Journal of Vacuum Science & Technology, 5 (1987) 1243-1246.

Owens, D.K. y Wendt, R.C. *Estimation of the surface free energy of polymers*. Journal of Applied Polymer Science, 13 (1969) 1741-1747.

Pankratov, O.A. y Povarov, P.P. *Koopmans' theorem, one-electron levels and the ground state in the Hartree-Fock approximation*. Physics Letters A, 134 (1989) 339-342.

Shirley, D.A. *High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold.* Physical Review B, 5 (1972) 4709-4714.

Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K. y Good, R.J. *Interfacial Lifshitz-van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems.* Chemical Reviews, 88 (1988) 927-941.

Végh, J. *The Shirley background revised.* Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 151 (2006) 159-164.

Wagner, C.D., Riggs, W.M., Davis, L.E., Moulder, J.F y Muilenberg, G.E. *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy.* Perkin-Elmer Corporation, Physical Electronic Division, USA, 1979.

Wagner, M.S. y Castner, D.G. *Characterization of Adsorbed Protein Films by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis.* Langmuir, 17 (2001) 4649-4660.

Wagner, M.S., y Castner, D.G. *Characterization of adsorbed protein films using time-of-flight-secondary ion mass spectrometry and multivariate analysis.* Applied Surface Science, 203-204 (2003) 698-703.

Watts, J.F. y Wolstenholme, J. *An introduction to surface analysis by XPS and AES.* Ed. Wiley, England, 2003.

Wold, S. *Principal Component Analysis.* Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2 (1987) 37-52.

Wu, S. *Calculation of interfacial tension in polymer systems.* Journal of Polymer Science C, 34 (1971) 19-30.

Xu, J., Ostrowski, S., Szakal, C., Ewing, A.G. y Winograd, N. *ToF-SIMS imaging with cluster ion beams.* Applied Surface Science, 231-232 (2004) 159-163.

Young, T. *An Essay on the Cohesion of Fluids.* Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 95 (1805) 65-87.

WEBGRAFÍA

Página web número 1: https://fas.dsi.a-star.edu.sg/equipments/tof_sims.aspx

Página web número 2: https://www.researchgate.net/publication/229871790_ToFSIMS

Página web número 3: **Surface Spectra Ltd.**, www.surfacespectra.com

Página web número 4: <http://xpssimplified.com/index.php>

**CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES
EXTENSAS DE TITANIO Y ALEACIONES DE TITANIO
DE USO MÉDICO**

3. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES EXTENSAS DE TITANIO Y ALEACIONES DE TITANIO DE USO MÉDICO

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. El titanio y sus aleaciones

El titanio (Ti), y algunas de sus aleaciones, son probablemente los materiales metálicos más utilizados en sustituciones de tejidos duros, como huesos y dientes, ya que presentan unas propiedades mecánicas adecuadas, con un módulo de elasticidad más próximo al del hueso cortical que el acero quirúrgico o las aleaciones Cr-Co (Chen, Q. y Thouas, G.A., 2015) (Long, M. y Rack H. J., 1998) (Mitsuo Niomi, 1998). Además presentan una resistencia a la corrosión excelente, gracias a la muy buena adhesión de su capa de pasivado (Xuanyong Liu *et al.*, 2004).

El titanio es un metal de transición de número atómico 22, peso atómico 47,9 g/mol y cuya configuración electrónica es $1s^2 2s^2p^6 3s^2p^6d^2 4s^2$. La capa d incompleta hace del titanio un elemento muy reactivo, adoptando las valencias +2, +3 y +4, pudiendo formar soluciones sólidas con otros elementos sustitucionales. Su densidad es de $4,5 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$, lo que le confiere el ser uno de los metales más ligeros de los utilizados hasta ahora en el campo de los biomateriales, y su punto de fusión está alrededor de 1700°C . El titanio puro es un material rígido y dúctil, que presenta un gran módulo de elasticidad (105 GPa) y una elevada resistencia a la tracción (103 MPa) (Xuanyong Liu *et al.*, 2004).

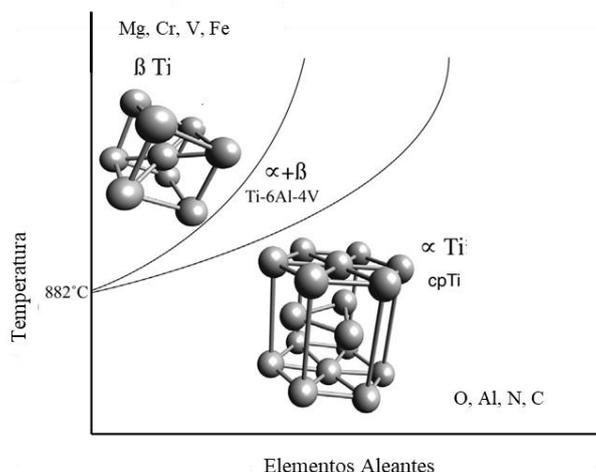


Figura 1. Estructuras cristalinas del Ti en función de la temperatura y de los elementos aleantes (Imagen recuperada de Prasad, S. *et al.*, 2015).

El titanio en estado puro es un material alotrópico, pudiendo existir en dos orientaciones cristalográficas. A temperatura ambiente presenta una estructura cristalina hexagonal compacta (fase α) cuya densidad es de $4,5 \text{ g/cm}^3$. Sin embargo, a temperaturas superiores a $882 \pm 2^\circ\text{C}$ sufre una transformación reversible a la estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) con una densidad de $4,4 \text{ g/cm}^3$ (Fig.1) (Leyens, C. y Peters, M., 2003). Las propiedades que presenta el titanio cuando se encuentra en fases diferentes no son iguales, por ejemplo, la fase α tiene

mayor resistencia a la deformación plástica, es menos dúctil y presenta una menor difusión si la comparamos con la fase β (Leyens, C. y Peters, M., 2003).

Como consecuencia de las técnicas utilizadas para su obtención, el titanio comercialmente puro (cp) siempre lleva asociada cierta cantidad de impurezas, que suelen ser de oxígeno, hierro, carbono, hidrógeno y nitrógeno. Dependiendo de las cantidades máximas de hierro y oxígeno que presente, el titanio cp se puede clasificar en cuatro grados distintos (Yoshiki Oshida, 2007). Para estos cuatro grados del Ti cp las cantidades de carbono tienen que ser inferiores al 0,10% y las de hidrógeno al 0,015%. El titanio de grado 1 es el de mayor pureza, contiene un máximo de 0,18 % de oxígeno y 0,20% de hierro. Como características de este grado, se pueden destacar que tiene una menor resistencia mecánica y una mejor ductilidad a temperatura ambiente que los otros grados de titanio. El titanio grado 2 contiene como máximo un 0,25% de oxígeno y un 0,30% de hierro. Este grado tiene un límite elástico mínimo garantizado de 275 MPa y buena ductilidad. También posee unas buenas propiedades al impacto a bajas temperaturas, así como una excelente resistencia al desgaste y a la corrosión por el agua del mar y atmósferas marinas. El titanio grado 3 contiene un máximo de 0,35% de oxígeno y 0,30% de hierro y posee una excelente resistencia a la corrosión en ambientes, desde altamente oxidantes hasta medianamente reductores. Por último, el titanio grado 4 es el que contiene un mayor porcentaje de impurezas, puede contener un máximo de 0,40% de oxígeno y 0,50% de hierro. Además, este grado posee los valores más altos de resistencia mecánica de los cuatro, tiene una buena ductilidad y su resistencia a la corrosión en agua salada es excelente. En algunas publicaciones aparecen otros grados del titanio (grado 5, grado 6, grado 7), pero estas ya se consideran aleaciones (Yoshiki Oshida, 2007).

A diferencia del acero inoxidable y de las aleaciones de cobalto, para los que el propósito fundamental de formar aleaciones es mejorar su resistencia a la corrosión (Chen, Q y Thouas, G.A., 2015), para el titanio, el principal motivo de formar aleaciones es mejorar sus propiedades mecánicas, ya que el titanio puro tiene una excelente resistencia a la corrosión por sí mismo. La temperatura de transformación entre la fase α y β del titanio está muy influenciada por los elementos aleantes que pueden estabilizar la fase α y β en condiciones distintas a las que se desarrollan de forma natural (Fig. 1). En este sentido, se tienen elementos como el Al, Ga, Ge, C, O y N que tienden a estabilizar la fase α y elementos como el Mo, Fe, Cr, Mn, V, Ta y Nb que tienden a estabilizar la fase β . Por consiguiente, dependiendo de las impurezas disueltas en el titanio y sus concentraciones relativas, se podrán obtener aleaciones tipo α , tipo β o, incluso, tipo $\alpha+\beta$ (si la fase α , la β , o ambas fases coexisten a temperatura ambiente) que abarcan un gran espectro de propiedades mecánicas. De forma particular, la aleación de tipo $\alpha+\beta$ más utilizada como material para la fabricación de implantes es la Ti6Al4V, también denominada titanio grado 5, la cual contiene un 90% en peso de titanio, un 6% de aluminio y un 4% de vanadio. Debido al excelente balance entre sus propiedades mecánicas, su resistencia a la corrosión y su buen comportamiento a temperaturas elevadas, esta aleación es particularmente popular en el sector de los biomateriales. De ella también debe destacarse su buena capacidad para ser trabajada mecánicamente y modificar sus propiedades mediante tratamientos térmicos.

Recientemente se está introduciendo el uso de la aleación Ti6Al7Nb en la fabricación de prótesis e implantes, debido a la menor toxicidad del niobio frente al vanadio (Challa, V.S.A. *et al.*, 2013). Algunos estudios aseguran que la resistencia a la corrosión de la aleación Ti6Al7Nb es

superior a la de la aleación Ti6Al4V (Khan, M.A. *et al.*, 1999), hecho que se atribuye a la formación de una capa pasiva más densa y estable en la superficie del Ti6Al7Nb, ya que se produce un fuerte enlace covalente entre el Ti y el Nb (Yu, S.Y. *et al.*, 2001).

Las aleaciones, con respecto al titanio puro, mejoran algunas de sus propiedades como su límite de fatiga, por lo que su uso se prefiere al del titanio para aplicaciones más exigentes desde el punto de vista mecánico. Pero con respecto a las características superficiales de ambos, se puede afirmar que tanto el Ti como sus aleaciones son muy similares en términos de morfología y topografía, aunque cabe mencionar que para las aleaciones aparecen algunos óxidos de los elementos aleantes en la capa de pasivado superficial.

3.1.1.1. Composición de la capa pasiva de los materiales de titanio

Tanto el titanio como sus aleaciones son materiales muy reactivos con respecto a la oxidación, así, en presencia de aire, estos reaccionan espontáneamente formando una fina capa de óxido en la superficie, de entre 3 y 7 nm de espesor (Xuanyong Liu *et al.*, 2004). Esta capa está compuesta mayoritariamente por dióxido de titanio (TiO₂) (Welsh, G. *et al.*, 1994), aunque en menor proporción también están presentes otros óxidos de titanio, como el TiO y el Ti₂O₃ (Carley, A.F. *et al.*, 1987). En la capa de pasivado que se forma espontáneamente en las superficies de titanio, el TiO₂ se encuentra, por norma general, en estado amorfo, aunque en algunas ocasiones, dependiendo del proceso de pasivado, puede encontrarse en estado cristalino.

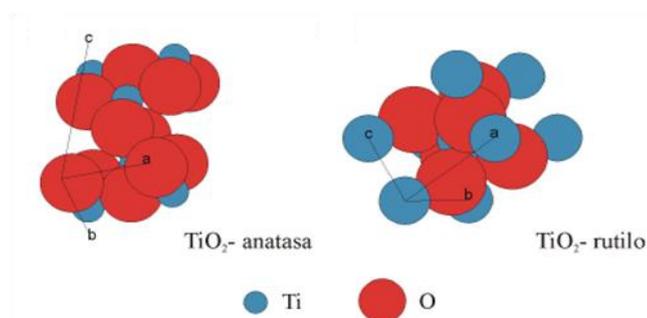


Figura 2. Estructuras cristalinas más habituales del TiO₂: anatasa y rutilo (Imagen recuperada de Hierro-Oliva, M. 2011).

El dióxido de titanio, también alotrópico, se encuentra de forma natural en tres fases cristalinas: brooquita (romboédrica), anatasa y rutilo (ambas tetragonales), las cuales, aunque tienen la misma composición química, poseen diferentes propiedades físicas, como por ejemplo que la anatasa no es tan dura y es menos densa que el rutilo. Los parámetros de red tienen un valor de $a=b=3.78 \text{ \AA}$, $c=9.50 \text{ \AA}$ y $a=b=4.58 \text{ \AA}$, $c=2.98 \text{ \AA}$ para la anatasa y el rutilo, respectivamente (Yoshiki Oshida, 2007) (Fig. 2). Para la brooquita los parámetros de red toman valores de $a=9.17 \text{ \AA}$, $b=5.43 \text{ \AA}$ y $c=5.13 \text{ \AA}$ (Yoshiki Oshida, 2007). De todas las fases del TiO₂, el rutilo es la única fase termodinámicamente estable a cualquier temperatura, mientras que las fases anatasa y brooquita son metaestables y se transforman a rutilo irreversiblemente por calentamiento (Nam H. Vu, *et al.*, 2012).

La capa de pasivado es muy estable, tanto química como estructuralmente, y esto influye directamente en las propiedades que caracterizan al titanio como material biocompatible, como son su excelente resistencia a la corrosión y su capacidad de repasivación. Esta última propiedad es de gran importancia, ya que durante la implantación, la capa de óxido puede arañarse o, incluso, destruirse por abrasión con el tejido duro. Cuando este hecho sucede, el óxido superficial se regenera inmediatamente en presencia de los fluidos corporales (Hanawa, T. *et al.*, 1997).

El TiO_2 es un óxido inerte que confiere al titanio y sus aleaciones mayor resistencia a la corrosión, limitando el intercambio de iones tanto desde el interior del material hacia el medio exterior como en sentido inverso. Esto resulta, por ejemplo, en una reducción de las reacciones inflamatorias asociadas a implantes y prótesis cuando se utiliza este material (Guillemot, F. *et al.*, 2003).

Como ya se ha mencionado, la capa pasiva en la superficie de los materiales de titanio está compuesta fundamentalmente por TiO_2 , pero también suelen estar presentes otros estados de oxidación del titanio, como el TiO y el Ti_2O_3 . Un caso especial sería la formación de la capa de pasivado en las aleaciones de titanio, en las que hay que tener en cuenta que pueden estar presentes en dicha capa óxidos de los elementos aleantes, aparte de los óxidos de titanio, que son los que se encuentran de forma mayoritaria. Por ejemplo, en la capa de óxido de la aleación de Ti6Al4V está presente, el óxido de aluminio Al_2O_3 (Milosev, I. *et al.*, 2000) (Ask, M. *et al.*, 1989) (Lee, W.H. y Hyun, C.Y., 2006). Pero no todos los estudios publicados observan vanadio en la capa de pasivado de esta aleación (Ask, M. *et al.*, 1989). En otras aleaciones de titanio, como Ti6Al7Nb , también se observan los elementos aleantes en la capa pasiva (Challa, V.S.-A. *et al.*, 2013). Algunos de estos elementos presentes en la capa de pasivado de las aleaciones, no son tan estables químicamente como los óxidos de titanio y pueden provocar toxicidad cuando pasan al medio fisiológico en los procesos de corrosión.

3.1.1.2. Propiedades físico-químicas de la capa de pasivado en materiales de titanio

Una propiedad singular del TiO_2 es su carácter semiconductor, el cual presenta una energía de salto de banda (*band gap* o ancho de banda) entre la banda de valencia y la de conducción con un valor de entre 3 y 3,3 eV (Tang, H. *et al.*, 1994), dependiendo de si la fase cristalina es anatasa o rutilo. Con lo cual, la fotoexcitación del semiconductor y la subsiguiente separación de un par electrón-hueco se producirá cuando los fotones incidentes sobre la superficie del mismo tengan una energía superior a los valores característicos del ancho de banda. Esto tiene como consecuencia que toda la radiación ultravioleta (UV) de longitud de onda igual o inferior a 400 nm tendrá energía suficiente para excitar al dióxido de titanio.

Por lo tanto, la presencia de dióxido de titanio en la capa pasiva confiere a los implantes de titanio y sus aleaciones una propiedad muy interesante y es la posibilidad de modificar su estado de hidrofobicidad mediante la iluminación con luz ultravioleta-C (UV-C).

La irradiación con UV-C de la superficie de los implantes de Ti produce una modificación de su estado hidrófobo a superhidrófilo y elimina la contaminación por hidrocarburos presentes en la superficie, sin modificar las propiedades del material (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2008)

(Wang, R. *et al.*, 1999). Estos cambios extremos en las propiedades superficiales muestran un efecto positivo sobre la unión y la proliferación de los osteoblastos con la superficie del implante, lo que lleva a mejorar en gran medida la oseointegración (Tomohiko Miyauchi *et al.*, 2010). Además, otros estudios muestran que los tratamientos UV en las superficies de Ti6Al4V reducen la adhesión bacteriana e incluso las permiten actuar como superficies bactericidas (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2013) (Gallardo-Moreno, A.M. *et al.*, 2009).

El efecto que produce la luz UV sobre el TiO₂ o efecto fotocatalítico (Fujishima, A. *et al.*, 2000) se basa en que la irradiación con energía por encima del valor del ancho de banda de un semiconductor produce la formación de pares electrón-hueco. Estos pares electrón-hueco pueden recombinarse o moverse a la superficie para reaccionar con las especies allí adsorbidas. En particular, el hueco de la banda de valencia puede reaccionar con moléculas de H₂O o iones hidróxido adsorbidos en la superficie y producir radicales hidroxilo (OH·), mientras que el electrón de la banda de conducción puede reducir O₂ para producir iones superóxido (O₂⁻). Tanto los iones superóxido como los radicales hidroxilo son extremadamente reactivos con los compuestos orgánicos con los que entran en contacto, lo que conduce a la degradación de la materia orgánica.

3.1.2. Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones

Existen un sinnúmero de metales y aleaciones pero son muy pocos los que pueden ser utilizados como biomateriales. El cuerpo humano presenta un ambiente corrosivo, por lo cual un biomaterial debe ser resistente a este ataque y en este sentido, como ya se ha indicado, el titanio y algunas de sus aleaciones presentan una gran resistencia a la corrosión en presencia de fluidos corporales, superior, por ejemplo, al acero inoxidable. Además también poseen buenas propiedades mecánicas y una aceptable tolerancia de los tejidos, lo que lo hace un material idóneo para ser implantado en el cuerpo humano (Barrere, F. *et al.*, 2008). Una característica particular del titanio es que es uno de los pocos materiales metálicos que provoca con una menor probabilidad la formación de un tejido fibroso que actúa de barrera cuando el material se coloca en contacto con el hueso sano. Esto permite al hueso crecer y llenar los poros superficiales del implante y obtener una sujeción más firme de la prótesis mejorando la regeneración del hueso afectado (Albrektsson, T. *et al.*, 1981).

En el campo de los materiales implantables, y más concretamente en traumatología, el titanio y sus aleaciones son utilizados en la construcción de componentes de prótesis articulares (como cadera, rodilla, hombro, columna vertebral, codo y muñeca). También se suelen utilizar en la elaboración de clavos, tornillos y placas de osteosíntesis para la recuperación de fracturas óseas (Geetha, M. *et al.*, 2009). En odontología, se emplean para la fabricación de tornillos para implantes dentales, así como alambres para uso en ortodoncia y también para la fabricación de miniplacas, mallas, tiras y tornillos de uso en cirugía maxilofacial. Estos materiales pueden, además, formar parte como componentes de válvulas cardíacas y de marcapasos (Bauer, S. *et al.*, 2013).

3.1.3. Objetivos de este capítulo

Como se ha puesto de manifiesto, la superficie del titanio y de sus aleaciones tienen un interés especial en el campo biomédico, puesto que son el lugar de encuentro del medio fisiológico con el implante. Por esta razón es necesario conocer con precisión las propiedades y características de estas superficies. En el presente capítulo se presenta un estudio detallado de la composición de la capa de óxido crecida sobre una muestra de la aleación de Ti6Al4V. Además, las características de la capa pasiva hacen que sus propiedades físico-químicas puedan modificarse con cierta facilidad, por lo que incluso los protocolos de limpieza de las superficies pueden ser determinantes sobre el grado de hidrofobicidad de las muestras. Por ello, en este capítulo también se analizan las propiedades de mojabilidad y tensión superficial, obtenidas mediante goniometría de ángulo de contacto, de muestras de titanio y aleaciones de titanio usadas como biomaterial tratadas según diferentes protocolos de limpieza y secado.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Titanio y aleaciones de titanio

En el desarrollo de los estudios realizados en este trabajo se han empleado probetas de titanio de un 99,6 % de pureza, que fueron suministradas por Goodfellow (Reino Unido) en forma de discos de 25 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Además de estas probetas de Ti, se han empleado probetas de dos aleaciones, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. Las probetas de Ti6Al4V se obtuvieron cortando discos de 2 mm de espesor y 25 mm de diámetro de una barra de la aleación. Del mismo modo se consiguieron las probetas de la aleación Ti6Al7Nb, pero en este caso el diámetro de la barra, y por tanto el de las probetas, fue de 22 mm. Las barras de ambas aleaciones fueron adquiridas en la compañía DKSH (Suiza) y cortadas en forma de discos por la compañía Segeda (España).

3.2.1.1. Pulido de las probetas

Para la caracterización superficial de las distintas muestras, las probetas de titanio y aleaciones de titanio se sometieron a un proceso de pulido en una de sus caras con acabado brillo espejo. Para ello se utilizó una pulidora Phoenix Beta con cabezal monitorizado Vector LC de la casa Buehler (Alemania).

El protocolo de pulido para obtener un acabado brillo espejo en estas muestras consistió en un proceso dividido en tres pasos. En el primero de ellos se pulieron las probetas durante 2 min, a 300 rpm con una fuerza de 20 N sobre un paño de lija P320 utilizando agua como lubricante. En el segundo paso las probetas se pulieron durante 10 min, a 150 rpm con una fuerza de 20 N sobre un paño UltraPad con pasta de diamante de 9 μm como agente abrasivo y con el lubricante MetaDi Fluid. Y por último, en el tercer paso las probetas se pulieron también durante 10 min, a 150 rpm con una fuerza de 20 N y sobre un paño Microcloth, al que se le añadió una disolución de sílice coloidal mezclada con H_2O_2 al 30 % (Fisher, UK) como agente abrasivo.

Todos los paños empleados en estos tres pasos, así como los agentes abrasivos y lubricantes fueron proporcionados por Buehler (Alemania).

3.2.1.2. Protocolo de limpieza de las probetas

Antes de realizar la caracterización de las muestras, todas las probetas de Ti, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb, que previamente habían sido pulidas, se sometieron a un tratamiento de limpieza para retirar los posibles restos de lubricantes y agentes abrasivos que fueron empleados en el proceso de pulido. El protocolo seguido consistió en sucesivos baños de ultrasonido con una duración de 10 min cada uno de ellos y utilizando en primer lugar agua destilada, en segundo lugar una solución de acetona al 70% (Panreac, España) y por último etanol puro (Panreac, España). Tras extraer las probetas del último baño, se les aplicó un chorro de etanol puro, manteniendo las probetas en posición vertical y se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.2.1.3. Homogeneización de la capa de pasivado en muestras de titanio siguiendo distintos protocolos de limpieza y secado

Aquellas probetas que se caracterizaron mediante goniometría de ángulo de contacto fueron sometidas a distintos protocolos de limpieza y secado hasta encontrar valores de ángulos de contacto reproducibles y con una desviación estándar pequeña (Hierro-Oliva, M. *et al.*, 2015).

Protocolo 1: consistió en frotar la superficie de las probetas con una gasa estéril de algodón impregnada en una solución de líquido antiséptico (Derquim DSF, Panreac, España), tras lo que las probetas se aclararon con abundante agua destilada. Posteriormente se realizaron los pasos descritos en el protocolo de limpieza mediante inmersión expuestos en el apartado 3.2.1.2. Una vez se concluyó con la limpieza de las probetas, estas se secaron con un chorro de nitrógeno y fueron depositadas en un desecador durante 60 min hasta ser caracterizadas mediante goniometría de ángulo de contacto.

Protocolo 2: consistió en la inmersión de las muestras en el líquido antiséptico (DSF), en el que se limpiaron mediante un baño de ultrasonido durante 10 min (sin frotar la superficie). Tras este tiempo las probetas se aclararon con abundante agua destilada y se siguieron los pasos de limpieza mediante inmersión descritos en el apartado 3.2.1.2. Posteriormente se realizaron dos procesos de secado, algunas de las probetas se secaron con una corriente de N₂ (como en el primer protocolo) y otras introduciéndolas en el horno a 120°C durante una hora. Se utilizaron cuatro muestras para cada condición de secado, de las cuales dos se mantuvieron durante 60 min en el desecador y las otras dos durante 120 min. Además, tras obtener los primeros datos depositando tres gotas de agua en cada superficie de las probetas, las gotas fueron retiradas con papel absorbente y las probetas fueron de nuevo limpiadas siguiendo este protocolo para volver a ser caracterizadas.

Protocolo 3: se aplicaron los procesos de limpieza y secado en ocho probetas, marcando cada una de las mismas con letras comprendidas entre la A y la H, de tal forma que las muestras no fueran seleccionadas aleatoriamente, tal y como sucede en el segundo protocolo. El tercer protocolo utilizado consistió en el mismo proceso de limpieza seguido en el segundo protocolo descrito en el párrafo anterior pero en este caso, el método de secado se llevó a cabo sólo

mediante nitrógeno. El tiempo en el que las muestras se mantuvieron en el desecador fue de 60 min y además, las muestras también fueron limpiadas y caracterizadas en dos ocasiones.

Protocolo 4: consistió en un único proceso de limpieza inicial, tal y como se describe en el apartado 3.2.1.2 de este capítulo, sin utilizar DSF. Tras la limpieza de las muestras, se realizó un proceso de pasivación controlada en medio acuoso para obtener una capa de óxido más homogénea sobre la superficie de las probetas de titanio. Para ello se introdujeron las probetas en agua destilada en el horno durante 24 h, 48 h o 72 h a 50 °C. Estas probetas, tras permanecer en las condiciones descritas, se extrajeron del recipiente con agua y se secaron en el horno a 120 °C durante una hora. Por último, se depositaron en el desecador para conseguir atemperarlas durante otra hora más. Además, algunas de las muestras que permanecieron durante 72 h en el horno se depositaron en el desecador durante 24 h para comprobar si el tiempo en el que las muestras lograban atemperarse influía en los resultados.

3.2.1.4. Tratamiento con luz ultravioleta (UV-C)

Durante el proceso experimental de esta tesis, algunas de las probetas de Ti, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb se sometieron a un tratamiento con luz ultravioleta (UV-C) para modificar su grado de hidrofobicidad (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2008). Para el proceso de irradiación de las probetas se empleó un tubo de descarga Philips TUV TL-D 15W SLV de vapor de mercurio a baja presión, con ampolla tubular de vidrio (suministrado por Philips Ibérica, S.A.). Este proceso se realizó en el interior de una cabina opaca, cerrada y en todo momento la radiación ultravioleta que recibieron las probetas se midió mediante un sensor conectado a un dosímetro UV-MAT (Opsytec Dr. Gröbel GmbH, Alemania). Para el estudio de la modificación de la hidrofobicidad frente al tiempo de irradiación se emplearon tiempos comprendidos entre 5 min y 4 horas, variando los intervalos según la respuesta de las muestras.

3.2.2. Técnicas de caracterización

3.2.2.1. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

En el desarrollo de esta tesis, la caracterización de las muestras mediante XPS se realizó con un equipo K-Alpha (Thermo Scientific) (Fig. 3). Este equipo posee una fuente de emisión de radiación monocromática $K\alpha$ del Al a 1486,68 eV, que opera a un voltaje de 12 KV y una corriente de 4,2 mA. El punto del haz incidente elegido para estas medidas tenía un tamaño de 300 μm , en disposición elipsoidal, y todas las medidas se realizaron en el interior de una cámara de ultra alto vacío, que opera a 10^{-6} Pa. Para la obtención de los espectros completos de las muestras analizadas se empleó una energía de paso constante para el analizador de 200 eV y se recogieron 10 escaneos para la obtención de cada uno de los espectros de cada una de las muestras. Para la recogida de picos de alta resolución, la energía de paso empleada fue de 50 eV y el número de barridos realizados para la obtención de cada pico dependió de la intensidad de cada uno de ellos, siendo de 75 escaneos para los picos más intensos, llegando hasta los 350 escaneos para los menos intensos. Además, sobre las muestras estudiadas en este trabajo se realizaron estudios en profundidad, aplicando un bombardeo de iones de Ar^+ de 3 KeV.



Figura 3. Equipo de XPS K-Alpha (Thermo Scientific).

El análisis de los espectros de XPS se realizó con el software Advantage, proporcionado por la casa comercial del equipo. La corrección de posibles desplazamientos en las energías de enlace de los elementos se hizo utilizando como referencia el pico del C1s, que está situado a 285 eV de energía. Para restar el fondo, tanto de los espectros generales como de los picos de alta resolución, se empleó el método de Shirley. Los picos de alta resolución se ajustaron utilizando una mezcla de curvas Gaussiana y Lorentziana con el software XPSpeak (version 4,1), el cual proporciona información sobre la posición de cada uno de los sub-picos, sobre su área y sobre la anchura a media altura (FWHM) y la relación Gaussiana/Lorentziana, teniendo en cuenta la asimetría de cada uno de los picos analizados. Estos datos permiten asignar cada uno de esos sub-picos a un estado químico de cada uno de los elementos que se analizan, comparando sus energías de ligadura con las que existen tabuladas (Página web 1 y 2).

3.2.2.2. Goniometría de ángulo de contacto

Para la caracterización superficial mediante goniometría de ángulo de contacto se utilizó un equipo Krüss G20/DSA10 (Alemania) (Fig.4). Con este equipo se midieron los ángulos de contacto de las muestras depositando gotas de agua (θ_A), formamida (θ_F) (Fluka, Alemania) y diiodometano (θ_D) (Fluka, Alemania) a una velocidad de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y con un volumen de 5 μl , 6 μl y 2 μl , respectivamente. Para las medidas de la modificación de la hidrofobicidad frente al tiempo

de irradiación, se depositaron gotas de agua sobre las superficies de las muestras estudiadas con el mismo volumen y a la misma velocidad que para la experiencia descrita anteriormente.

Una vez se forman las gotas sobre la superficie de las muestras y tras esperar 15 s para asegurar el equilibrio entre las tres fases, se tomaron imágenes mediante el programa Drop Shape Analysis (proporcionado por la casa comercial del equipo), con el que se pueden determinar los ángulos de contacto que se forman entre el líquido y la superficie del sólido. Para obtener la tensión superficial de cada una de las muestras se utilizó el modelo VOGG, empleando un programa que nos permite calcular el sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas y sus errores asociados, creado con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Donoso Morcillo, M.G., 2004).



Figura 4. Goniómetro Krüss G20/DSA10.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Análisis del crecimiento de la capa de óxido en la superficie de la aleación Ti6Al4V bajo condiciones de ultra alto vacío (UHV)

Como ya se ha indicado en apartados anteriores de este capítulo, para las aleaciones de titanio hay que tener en cuenta que en la capa de pasivado pueden estar presentes óxidos de los elementos aleantes, aparte de los óxidos de titanio. La presencia de estos óxidos puede ser la causa de diferencias en el comportamiento entre el titanio y sus aleaciones ante determinados estímulos externos. Según estudios publicados, en la capa de óxido de la aleación de Ti6Al4V está presente, por norma general, el óxido de aluminio Al_2O_3 (Milosev, I. *et al.*, 2000) (Ask, M. *et al.*, 1989) (Lee, W.H. y Hyun, C.Y., 2006). Con respecto al vanadio existen diferentes resultados acerca de su presencia en esta capa. Por ejemplo, al hacer un estudio en profundidad de estas muestras, M. Ask *et al.* (Ask, M. *et al.*, 1989) no detectaron la presencia de V en las capas más externas de la aleación Ti6Al4V, pero sí que lo encontraron en las capas más internas de pasivado. Por otro lado, Lee y Hyun (Lee, W.H. y Hyun, C.Y., 2006) detectaron vanadio en la superficie de Ti6Al4V sin necesidad de realizar estudios en profundidad. Estas discrepancias hacen que resulte de interés realizar un estudio de la distribución de los óxidos en la capa de pasivado de la aleación Ti6Al4V, observando su crecimiento desde la superficie metálica.

Debido a la rápida oxidación del titanio en contacto con el aire, no es sencillo hacer un seguimiento del crecimiento de la capa de pasivado, por este motivo se consideró como la mejor elección la cámara de UHV para realizar este estudio, debido a que la disponibilidad de oxígeno en su interior es escasa, aunque se sabe que el titanio y sus aleaciones pueden disolver oxígeno en una gran cantidad, hasta un 33 % en porcentaje atómico en el caso del titanio (Leyens, C. y Peters, M., 2003), y que parte de este oxígeno se puede difundir hasta la superficie. Puesto que no es posible disponer de muestras sin capa de pasivado, para realizar el seguimiento del proceso de oxidación se procedió a eliminar, en la medida de lo posible, toda la capa de óxido de pasivado de la muestra arrasando con el cañón de Ar^+ en el interior de la cámara de UHV del equipo XPS, para después permitir la reoxidación, lenta, en la cámara del XPS. Como paso previo al diseño del experimento, se observó la evolución del pico del oxígeno mientras la superficie de la aleación era bombardeada con iones de Ar^+ durante un periodo de tiempo de hasta 7000 s. Este estudio previo determinó que para obtener la superficie metálica limpia de la capa de óxido era necesario un tiempo de arrase de 6600 s. Para este tiempo de arrase se recogieron los espectros de alta resolución de los picos de Ti2p, Al2p, O1s y V2p, que se presentan en la figura 5. Estos espectros muestran que la superficie metálica, tras el bombardeo con iones Ar^+ , está compuesta fundamentalmente por titanio, aunque se pueden observar en menor cantidad los elementos aleantes, aluminio y vanadio.

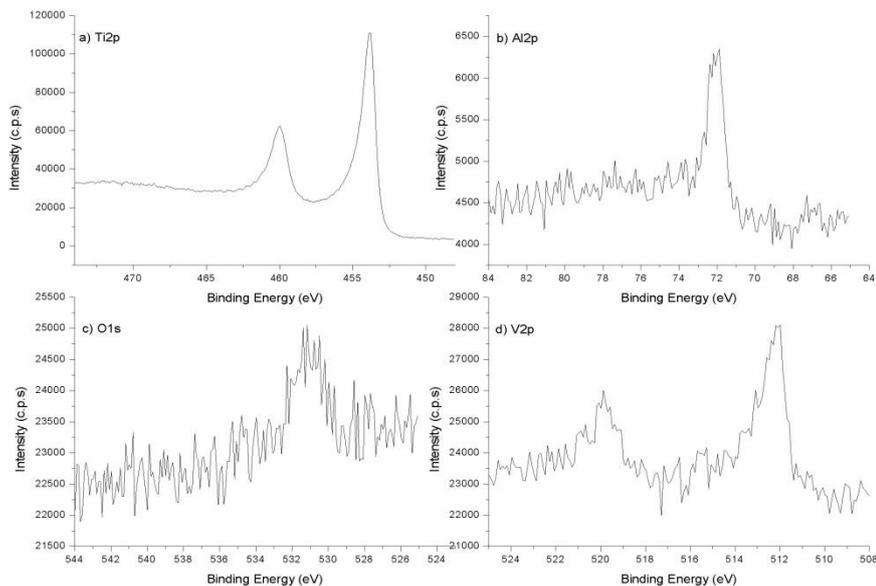


Figura 5. Espectros de los picos de alta resolución obtenidos en la superficie de la aleación Ti6Al4V tras 6600 s de bombardeo con iones Ar^+ : a) pico del Ti2p, b) pico del Al2p, c) pico del O1s y d) pico del V2p.

Es de esperar que una vez que comience la oxidación espontánea de esta superficie limpia, la composición vaya cambiando. Con el fin de poder observar dichos cambios, se recogieron espectros de alta resolución para los picos de Ti2p, Al2p, O1s y V2p, después de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 280, 310 y 1440 minutos tras finalizar el arrase con argón.

La figura 6 recoge los espectros de alta resolución tomados a cada uno de los tiempos de envejecimiento del pico del Ti2p. En este caso, todos los espectros están compuestos de dos picos debido al desdoblamiento espín-órbita ($\text{Ti}2p_{3/2}$ y $\text{Ti}2p_{1/2}$). Se puede observar en esta figura que el centro del pico $\text{Ti}2p_{3/2}$ se sitúa a una energía de enlace de 453,9 eV, con una separación del pico $\text{Ti}2p_{1/2}$ de 6,2 eV, valores de energía de enlace que se corresponden con el titanio metálico (Carley, A.F. *et al.*, 1987). Sin embargo la forma de los espectros se va modificando con el transcurso del tiempo. En el espectro obtenido tras finalizar el arrase (Fig.5) los dos picos del desdoblamiento spin-órbita aparecen centrados y no deformados, lo que indica que el titanio presente en este nivel de la superficie está mayoritariamente en forma metálica. Esto corrobora la práctica ausencia de oxígeno en esta superficie.

A medida que aumenta el tiempo de envejecimiento, se pueden observar cambios en la forma de los dos picos del Ti2p (Fig.6), que se marcan con flechas para señalar la aparición de cierta convexidad en ellos y que se va haciendo más prominente en los espectros recogidos para tiempos superiores. Con esta deformación del pico del Ti2p, las contribuciones de los niveles electrónicos del titanio metálico no son suficientes para ajustar el espectro de alta resolución recogido experimentalmente, lo que sugiere que el titanio se encuentra presente también en forma de óxido. Para analizar estos cambios se realizaron ajustes mediante deconvolución para todos los tiempos de recogida de este pico, observando que existen contribuciones a la capa de

óxido de titanio en los estados Ti^{2+} , Ti^{3+} y Ti^{4+} , hecho que concuerda con otras publicaciones (Carley, A.F. *et al.*, 1987) (Biesinger, M.C. *et al.*, 2010). Como ejemplo de la deconvolución realizada para estos picos se muestra el espectro recogido a 1440 min en la figura 7, donde se presentan todos los estados de oxidación del titanio que tienen contribución en este análisis.

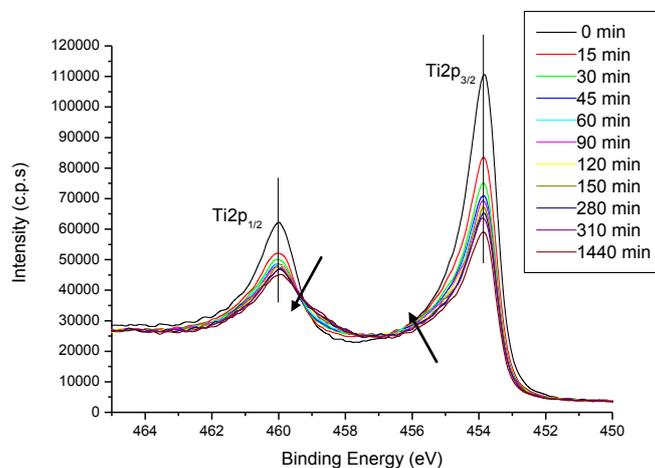


Figura 6. Espectro de alta resolución para el pico del Ti2p obtenido mediante XPS recogido a distintos tiempos. Las flechas indican cambios en la forma del pico producidos en el proceso de oxidación.

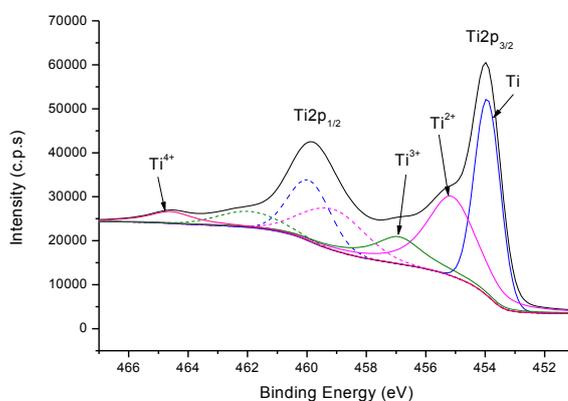


Figura 7. Deconvolución del pico del Ti2p recogido a 1440 min tras el bombardeo con iones Ar^+ . En él se aprecian todas las contribuciones de los estados oxidados del titanio.

Este análisis muestra que la contribución de menor energía de enlace al pico del $Ti2p_{3/2}$ es la del titanio metálico, que está situada a 453,9 eV. También se aprecia otra contribución al pico $Ti2p_{3/2}$ situada a una energía de enlace de 455,0 eV, que está relacionada con el estado Ti^{2+} , que correspondería al titanio en el óxido TiO , y una última contribución a mayor energía de enlace, 456,9 eV, asociada con el estado Ti^{3+} asociado al óxido Ti_2O_3 . Además, las posiciones de los picos que contribuyen al $Ti2p_{1/2}$ están desplazadas con respecto a los picos $Ti2p_{3/2}$ a +6,0, +5,0 y +5,0 eV para el Ti , TiO y Ti_2O_3 , respectivamente. También hay una contribución adicional situada a 464,5 eV de energía de enlace, que aparece en los picos de alta resolución recogidos a partir de 250 min, que indica la presencia del pico $Ti^{4+}2p_{1/2}$ (TiO_2). Probablemente la parte del

desdoblamiento espín-órbita de este último pico, $Ti^{4+}2p_{3/2}$, esté solapada por el resto de contribuciones. En todos los casos, las energías de enlace correspondientes a los picos obtenidos mediante deconvolución del pico experimental de Ti 2p concuerdan con los datos publicados en los estudios realizados por Carley, A.F. *et al.* en 1987 y por Biesinger, M.C. *et al.* en 2010.

Puesto que en los espectros de alta resolución para el pico del Ti2p (Fig. 6) se observa que a medida que avanza el tiempo, hay cambios relevantes en la intensidad de los picos resultantes de la deconvolución, es posible obtener una visión más clara de estos cambios analizando el cambio de las intensidades relativas de cada uno de ellos respecto al pico Ti2p. Para ello se ha dividido la intensidad absoluta de cada uno de los picos obtenidos en la deconvolución entre la intensidad total del pico Ti2p. En la figura 8 se muestra la intensidad relativa de cada uno de los picos que resultan de la deconvolución del Ti2p en función del tiempo transcurrido desde el arranque.

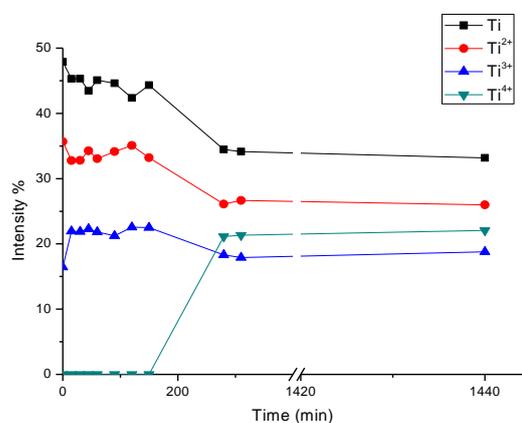


Figura 8. Intensidad relativa de los distintos estados de oxidación del titanio obtenidos tras la deconvolución del pico del Ti2p en función del tiempo. Las intensidades relativas se expresan en función de la intensidad total del pico del Ti.

Durante los primeros 15 minutos, la intensidad relativa de Ti^{3+} aumenta rápidamente (Fig. 8), mientras que las intensidades relativas de titanio metálico (Ti) y Ti^{2+} disminuyen. Entre los 15 y los 150 min no se aprecian cambios en las intensidades relativas de ninguno de los estados de oxidación del titanio y es a partir de los 250 min cuando aparece la contribución del Ti^{4+} . Debe resaltarse que como consecuencia de la contribución de Ti^{4+} , el porcentaje asociado a los otros estados de oxidación del titanio disminuye, sin embargo la contribución relativa de Ti / Ti^{2+} o Ti / Ti^{3+} o Ti^{2+} / Ti^{3+} continúa siendo similar durante todo el tiempo estudiado.

Esta progresión en la aparición de óxidos, de modo que las primeras contribuciones a la capa de óxido de titanio sean las del TiO y del Ti_2O_3 concuerda con los resultados obtenidos por E. McCafferty y J.P. Wightman (McCafferty, E. y Wightman, J.P., 1999). En dichos estudios se afirma que los óxidos deficientes de oxígeno, TiO y Ti_2O_3 , se forman en la interfase óxido/metal, mientras que el TiO_2 se forma preferentemente en la interfase óxido/gas.

Para el caso del aluminio, en la figura 9 se presenta el pico de alta resolución obtenido para el orbital Al2p transcurridos distintos tiempos después del arrase con argón. En este pico es visible una contribución mayoritaria situada a una energía de enlace de 72,1 eV, que se corresponde con el aluminio metálico (Al^0) (Milosev, I. *et al.*, 2008). En esta misma figura se puede observar otra contribución situada a +2,0 eV con respecto al aluminio metálico, que está relacionada con el estado Al^{3+} (Al_2O_3). Es apreciable un desplazamiento en el pico del Al metálico de 0.11 eV a energía más baja, que no está relacionado con ningún cambio químico en ese elemento, si no que es consecuencia de la medida experimental, como por ejemplo una deficiencia en la corrección de carga (Bolt, P.H. *et al.*, 1995). Los resultados encontrados en el presente estudio están en línea con los estudios presentados por I. Milosev *et al.* (Milosev, I. *et al.*, 2000) que ponen de manifiesto que el Al_2O_3 presente en la capa de óxido del Ti6Al4V se localiza en la capa externa más cercana a la interfase óxido/gas.

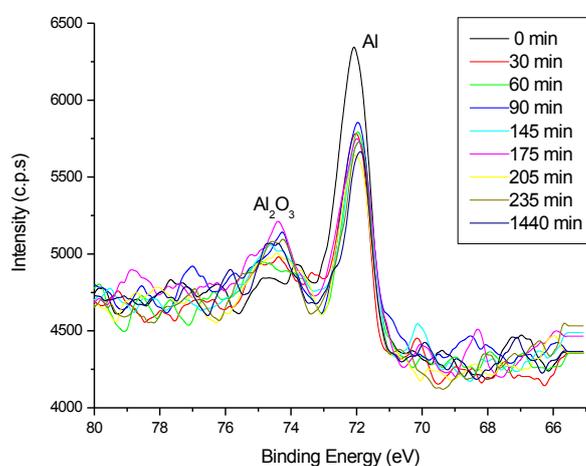


Figura 9. Espectro de alta resolución para el pico del Al2p obtenido mediante XPS recogido a distintos tiempos tras el bombardeo con iones Ar^+ .

Con respecto al vanadio presente en la aleación Ti6Al4V, los espectros de alta resolución recogidos tras el bombardeo con iones Ar^+ (Fig. 10) no permiten obtener ninguna información concluyente sobre este elemento, ya que la cantidad detectada no es suficiente para realizar una deconvolución aceptable en este pico. Se puede resaltar en el espectro recogido en la superficie metálica limpia ($t=0$ min) un pico más definido que para el resto de tiempos, que está situado a una energía de enlace de 512,2 eV, que se corresponde con el vanadio metálico (Milosev, I. *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta la poca resolución obtenida para este pico, no es posible obtener la contribución de ninguna de las formas de óxido de vanadio, ya que sus energías de enlace deberían estar situadas a 513,8 eV para el V_2O_3 , 516,3 eV para el VO_2 y 516,9 eV para el V_2O_5 , de acuerdo con los datos que existen tabulados (página web 1).

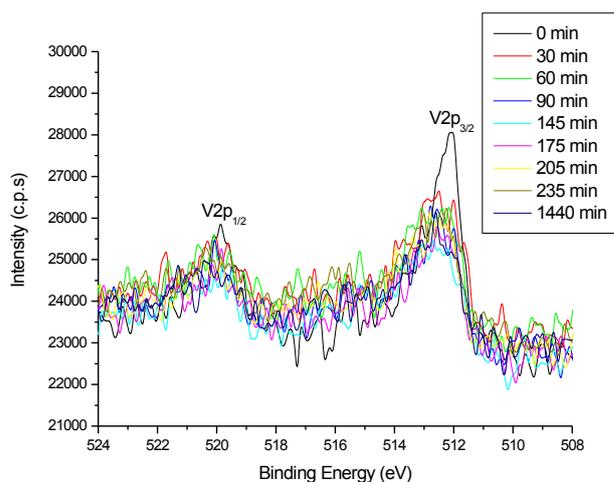


Figura 10. Espectro de alta resolución para el pico del V2p obtenido mediante XPS recogido a distintos tiempos tras el bombardeo con iones Ar^+ .

Por último, el análisis de la forma y la posición del pico del oxígeno en función del tiempo (Fig. 11) complementan la información proporcionada por los espectros de los picos del Ti2p y Al2p. Se observa claramente en la figura 11 como la intensidad del pico del O1s aumenta en función del tiempo, de una forma similar a lo presentado por Azoulay *et al.* (Azoulay, A. *et al.*, 1997) en su estudio de interacción del oxígeno con diferentes superficies de titanio.

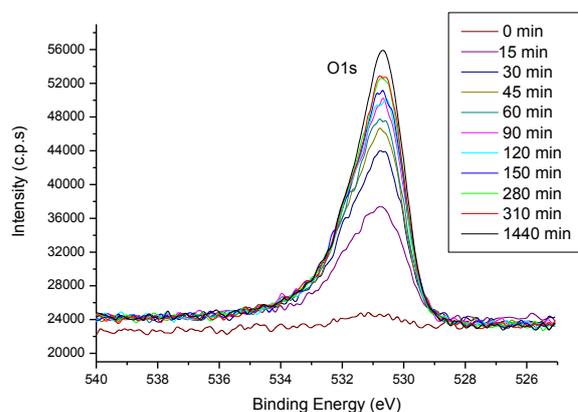


Figura 11. Espectro de alta resolución para el pico del O1s obtenido mediante XPS recogido a distintos tiempos tras el bombardeo con iones Ar^+ .

Además del cambio en intensidad, este pico presenta cambios en su forma en el transcurso del tiempo y para tratar de discernir las posibles contribuciones al pico del O1s, se realizaron ajustes mediante deconvolución para todos los tiempos de recogida de este espectro. Teniendo en cuenta la posición y la forma de este pico se obtienen dos contribuciones, una de ellas situada a 530,4 eV de energía de enlace y relacionada con la unión Ti-O y la otra situada a 531,5 eV y asociada a la unión Al-O (Bolt, P.H. *et al.*, 1995). En la figura 12 se presenta esta deconvolución de los espectros del pico del O1s obtenidos transcurridos 15 min y 24 h desde el

bombardeo con iones de Ar^+ de la superficie de la muestra de Ti6Al4V . Además, en esta figura se observa un desplazamiento de ambas contribuciones a menores energías de enlace a medida que avanza el tiempo, hecho que puede estar relacionado con los desplazamientos químicos provocados por una mayor absorción de oxígeno por parte de los elementos metálicos, según los estudios publicados por Kuznetsov *et al.* (Kuznetsov, M.V. *et al.*, 1992).

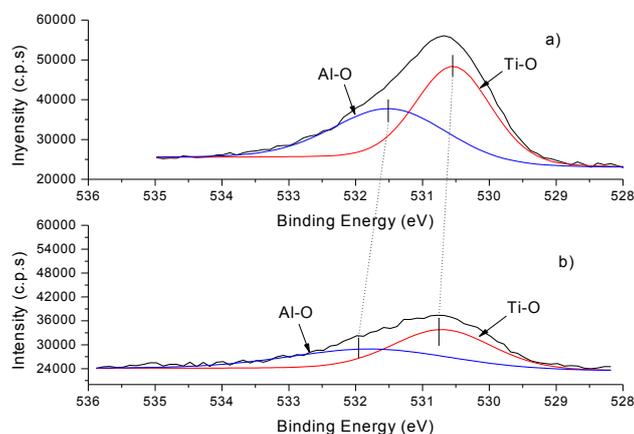


Figura 12. Deconvolución del pico del O1s transcurridos a) 1440 min y b) 15 min desde el bombardeo con iones Ar^+ .

En la figura 13 se presenta la evolución de la intensidad relativa de los picos Ti2p , O1s y Al2p en función del tiempo. En este caso, el cálculo de la intensidad relativa se hizo en función de la intensidad total. En el instante inicial, tras el bombardeo con iones Ar^+ ($t=0$ min), la contribución del oxígeno es muy baja, pero se observa un rápido aumento transcurridos unos pocos minutos, tras los que la intensidad de oxígeno continúa aumentando pero suavemente hasta las 24 h. El Ti sigue un comportamiento opuesto al del oxígeno. En el caso del aluminio, debido a la baja intensidad detectada en comparación con los otros dos elementos, no es posible apreciar cambios con respecto al tiempo.

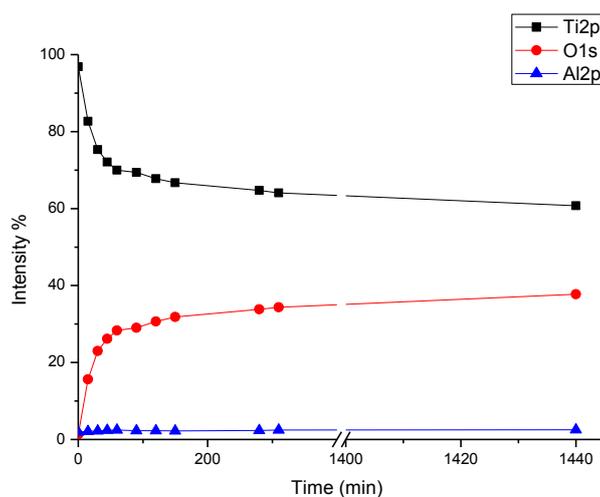


Figura 13. Evolución de la intensidad relativa de los picos de Ti2p , O1s y Al2p en función del tiempo.

En cualquier caso, los resultados obtenidos indican que las muestras de Ti6Al4V que se han analizado en esta tesis tienen una capa de pasivado cuya composición varía gradualmente desde su interfase con la aleación metálica hacia el exterior, siendo más rica en óxidos deficientes en oxígeno en el interior. La parte más externa está compuesta fundamentalmente por TiO₂, con una presencia de Al₂O₃, pero sin haberse detectado ningún óxido de vanadio.

3.3.2. Caracterización de la superficie de titanio y aleaciones de titanio mediante goniometría de ángulo de contacto

Como se ha probado en el apartado anterior, la capa más externa de óxido de la aleación Ti6Al4V es mayoritariamente dióxido de titanio, muy similar a la capa de pasivado del titanio sin aleantes. Sin embargo, cuando se caracteriza la mojabilidad o la energía libre superficial de estos materiales se observan comportamientos muy diferentes. Según los datos publicados en diversos estudios hay una gran variabilidad para los valores de los ángulos de contacto en estas muestras. Si atendemos a la bibliografía, se presentan valores del ángulo de contacto para el agua sobre la superficie de probetas de Ti6Al4V que están comprendidos entre los 40° y los 80° (MacDonald, D.E., *et al.*, 2004) (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2008). Además, en medidas experimentales realizadas con anterioridad, se pudo observar sobre una misma muestra una gran dispersión en los valores del ángulo de contacto de agua. Por estos motivos, es fundamental fijar un procedimiento para limpiar y acondicionar el titanio y sus aleaciones antes de cualquier uso posterior que proporcione superficies con propiedades, como su energía libre superficial o su hidrofobicidad, homogéneas, idénticas y reproducibles. Puesto que el ángulo de contacto es muy sensible a las propiedades de la superficie, se busca un procedimiento de preparación de las muestras que nos proporcione reproducibilidad en la medida de los ángulos de contacto agua, tanto para una misma muestra como en muestras distintas, como paso previo a la caracterización de dichas superficies.

Para conseguir el tratamiento que lleve a una capa de pasivado homogénea sobre las superficies de titanio se estudiaron los ángulos de contacto de gotas de agua, siguiendo los diferentes protocolos de limpieza y secado detallados en el apartado 2.1.3 de este capítulo. La elección de dichos protocolos se basó en información obtenida de la bibliografía (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2008) (Park, J.H. *et al.*, 2012), realizando modificaciones sobre los mismos, teniendo en cuenta que hay estudios que aseguran que la película pasiva de las superficies de Ti podría deteriorarse o dañarse con movimientos de cizallamiento muy débiles, incluso por el roce con tejidos blandos (Lilley, P.A. *et al.*, 1992).

Todos los protocolos de limpieza aplicados en las probetas de titanio y aleaciones de titanio se realizaron tras el pulido hasta acabado brillo espejo descrito en el apartado 2.1.1 de este capítulo. Para la selección del tratamiento que proporcione reproducibilidad en la medida de los ángulos de contacto se escogieron probetas de la aleación Ti6Al4V para realizar los experimentos.

Los valores obtenidos para el ángulo de contacto de una gota de agua sobre la superficie de las probetas sometidas al primer protocolo de limpieza y secado presentaron una gran dispersión, obteniéndose ángulos de contacto que iban desde los 46° hasta los 73°. Esta variación en los ángulos de contacto obtenidos se relacionó con las alteraciones que pudiera

causar el frotado de las probetas en la formación de la capa de óxido superficial (Lilley, P.A. *et al.*, 1992).

Tras los resultados obtenidos con el primer protocolo de limpieza, se decidió retirar el proceso de frotado de la superficie de las probetas en el segundo protocolo de limpieza y secado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14, representando los datos mediante diagramas de cajas, en color blanco aquellos datos obtenidos para las muestras depositadas 60 min en el desecador y en gris aquellas depositadas durante 120 min. Cada rectángulo o caja está delimitado por el primer y el tercer cuartil (rango intercuartílico), y en el interior de estas se representa mediante una línea el segundo cuartil, que se corresponde con la mediana y por un punto el valor medio. Los asteriscos representan valores atípicos y las barras que acompañan a las cajas, o bigotes, hacen referencia a los percentiles 5 y 95. El eje de abscisas de la figura 14 se divide entre los diferentes secados aplicados a las muestras, N_2 u horno, y entre el número de veces que se le aplica a las muestras el proceso de limpieza (número 1 cuando los datos se obtienen tras un primer proceso de limpieza y número 2 cuando se someten al proceso de limpieza una segunda vez).

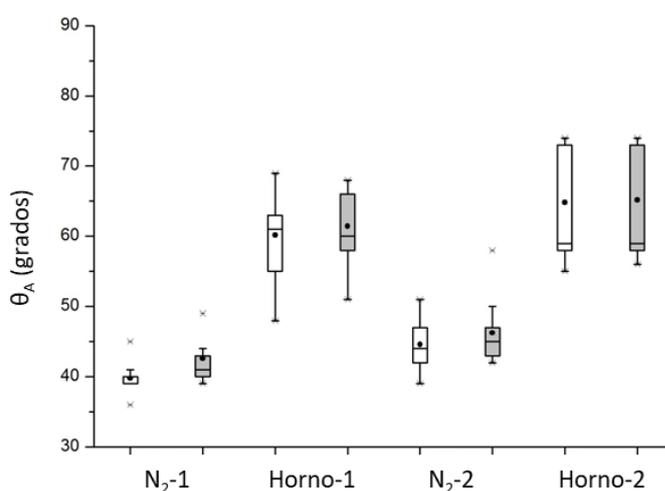


Figura 14. Distribución de los datos obtenidos en las muestras limpiadas mediante el segundo protocolo utilizado. Las probetas se secaron con nitrógeno (N_2) o en el horno a 120°C (Horno). Los números 1 y 2 indican si los datos son obtenidos tras un primer proceso de limpieza (1) o tras un segundo proceso de limpieza (2). Los colores blanco y gris de las cajas de los resultados representan a los datos obtenidos para las muestras depositadas 60 min en el desecador (blanco) o 120 min (gris).

En la figura 14 se puede comprobar que con el segundo protocolo de limpieza, tanto los valores de los ángulos de contacto como la dispersión de los mismos son mayores para las muestras secadas en el horno que para las muestras secadas con N_2 . Se obtiene un valor medio de los ángulo de contacto de entre 60° y 65° para las muestras secadas en el horno y de entre 40° y 45° para las muestras secadas con N_2 . Este hecho puede deberse a que las muestras introducidas en el horno para secarse se recubren de una capa de contaminación en el transcurso de este proceso que incrementa su hidrofobicidad. También se puede observar en la figura 14 que tanto los valores del ángulo de contacto como la dispersión de los mismos aumentan levemente para las muestras que han sido sometidas al proceso de limpieza por segunda vez.

Para el segundo protocolo de limpieza y secado, las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente. Sin embargo, aunque todas las muestras fueron obtenidas troceando una misma barra de la aleación, se podría considerar que las diferencias observadas estuvieran relacionadas con diferencias en el material. Con el fin de comprobar si la variabilidad en los resultados observados se debía o no a posibles diferencias entre las muestras, se realizaron experimentos asociando en todo momento la muestra utilizada con los resultados obtenidos. De esta forma, se marcaron ocho probetas de Ti6Al4V, de la A a la H, y sobre ellas se midieron los ángulos de contacto de gotas de agua siguiendo el tercer protocolo de limpieza y secado (figura 15). En esta figura también se utiliza la numeración 1 o 2, dependiendo del número de veces al que fueron sometidas las muestras al proceso de limpieza.

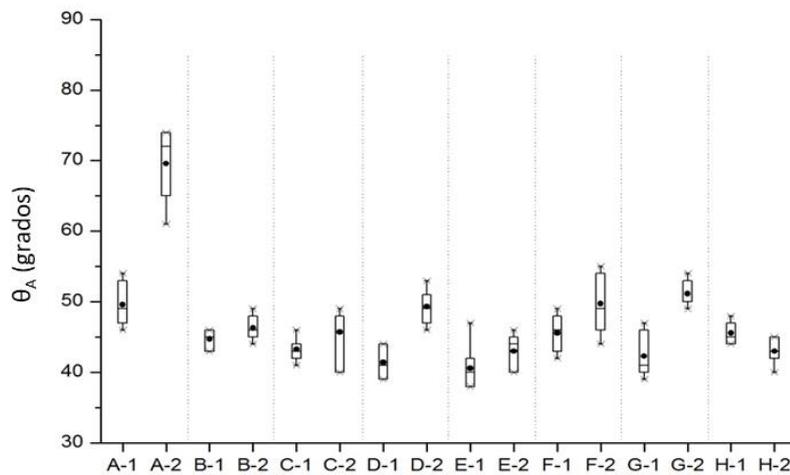


Figura 15. Representación de los ángulos de contacto medidos siguiendo el tercer protocolo. Las letras de la A a la H representan cada una de las ocho muestras analizadas y los número 1 y 2 indican si los datos se obtienen tras la primera limpieza (1) o tras una segunda (2).

Se observa de nuevo, a excepción de la muestra H, que el segundo lavado siempre aumenta los ángulos de contacto medios. Después del primer proceso de limpieza (1) los ángulos de contacto están comprendidos entre 38° y 48° en las muestras que van desde la B hasta la H, y para la muestra A se obtienen ángulos de contacto que van de 47° a 54°. Esta dispersión entre los datos obtenidos en muestras distintas llevaría a un aumento significativo de la dispersión del promedio de todos los valores de los ángulos de contacto. Después del segundo proceso de limpieza, los ángulos de contacto para las muestras que van desde la B hasta la H están comprendidos entre 40° y 55° y para la muestra A entre 61° y 74°.

Puesto que también para las muestras sometidas al tercer protocolo de limpieza y secado se observó una gran dispersión en los datos obtenidos en distintas muestras, se diseñó un cuarto protocolo de limpieza y secado para promover la pasivación controlada en medio acuoso de las muestras de la aleación de titanio, con objeto de obtener una capa de óxido más homogénea sobre la superficie del Ti6Al4V, para minimizar la posible contribución de las características del material a la superficie externa y a las desviaciones producidas por las irregularidades asociadas por ejemplo, a diferencias en las condiciones ambientales. Los resultados obtenidos tras someter a las probetas a este cuarto protocolo de limpieza y secado se muestran en la figura 16.

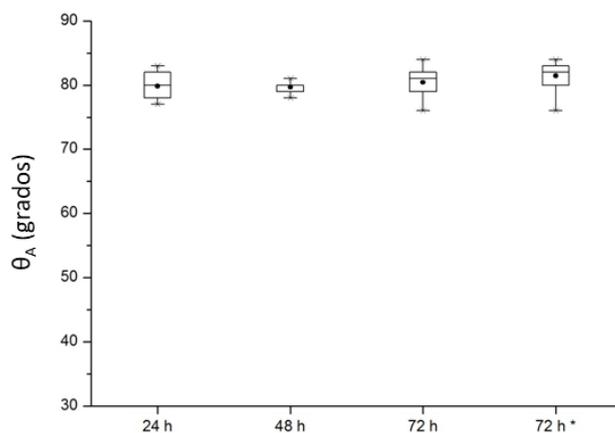


Figura 16. Representación de los ángulos de contacto medidos siguiendo el cuarto protocolo de limpieza y secado. El eje de abscisas muestra los tiempos en los que las muestras estuvieron sometidas a la pasivación en medio acuoso y la marca 72 h* hace referencia al conjunto de muestras que estuvieron depositadas en el desecador durante 24 h.

Las muestras sometidas al cuarto protocolo de limpieza y pulido, presentan valores medios estables de los ángulos de contacto independientemente del tiempo en el que las muestras han estado introducidas en el horno. Además, la distribución de los datos es muy similar en todos los casos, con la menor dispersión para el tiempo de 48 h. También es interesante señalar que el valor medio de los ángulos de contacto es de unos 80°, valor superior a cualquiera de los obtenidos con otros protocolos de limpieza y secado. Se entiende, por lo tanto, que es probable que este procedimiento permita una capa pasiva más gruesa y uniforme sobre la superficie del Ti6Al4V y por consiguiente una menor dispersión en los ángulos de contacto. Por esta razón se seleccionó este protocolo para ser empleado en los siguientes procedimientos experimentales.

Una vez conseguido el protocolo a través del cual se obtienen resultados de los ángulos de contacto reproducibles, independientemente de la muestra seleccionada y menos dispersos, se procedió a la evaluación de la tensión superficial mediante goniometría de ángulo de contacto de las muestras de titanio, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. Los datos para cada una de ellas se presentan en la tabla 1, en la que se incluyen los valores de los ángulos de contacto para el agua (θ_A), la formamida (θ_F) y el diiodometano (θ_D), medidos sobre la superficie de las probetas de Ti, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. También se muestran en la misma tabla las componentes Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) y ácido-base (γ^{AB}) de la tensión superficial, los parámetros electrón-aceptor (γ^+) y electrón-donador (γ^-) y la tensión superficial total (γ_S) del sólido, calculadas mediante el modelo VOGC calculados según la ecuación 18 del capítulo 2 de esta tesis.

Tabla 1. Valores de los ángulos de contacto para el agua (θ_A), la formamida (θ_F) y el diiodometano (θ_D) obtenidos sobre la superficie de las probetas de Ti, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. También se muestran en la tabla las componentes Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) y ácido-base (γ^{AB}) de la tensión superficial, los parámetros electrón-aceptor (γ^+) y electrón-donador (γ^-) y la tensión superficial total (γ_S) del sólido, calculadas mediante el modelo VOCCG.

	θ_A (Grados)	θ_F (Grados)	θ_D (Grados)	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	γ_S (mJ/m ²)
Ti	80±3	59±2	49±3	31,2±1,3	4,3±1,9	0,7±0,3	6,5±2,6	35,5±3,1
Ti6Al4V	77±1	56±1	39±3	36,1±1,4	3,1±1,0	0,3±0,2	7,3±1,0	39,2±2,5
Ti6Al7Nb	62±3	46±2	38±1	34,5±0,8	8,2±2,2	1,0±0,3	17,5±3,8	42,7±2,9

Para los tres líquidos utilizados, los valores de los ángulos de contacto medidos siguen, en general, la secuencia Ti > Ti6Al4V > Ti6Al7Nb. En concreto, el ángulo de contacto del agua indica que las superficies de Ti y Ti6Al4V son más hidrófobas frente a la superficie de Ti6Al7Nb, cuyo ángulo de contacto es aproximadamente 15° menor que para las otras dos muestras. Este comportamiento del ángulo de contacto del agua se observa también con la formamida. En contraste, el diiodometano ofrece ángulos similares sobre las dos aleaciones y aproximadamente 10° inferiores al que presenta sobre el Ti.

Los cálculos realizados a partir de estos ángulos según el modelo VOCCG muestran que las componentes Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) de la superficie de las aleaciones son similares entre sí y superiores a la del Ti. Sin embargo, la componente ácido-base (γ^{AB}) de la aleación Ti6Al7Nb prácticamente duplica a la de las otras muestras, principalmente debido al valor del parámetro γ^- . Como consecuencia, la energía libre superficial sigue la secuencia Ti6Al7Nb ≥ Ti6Al4V ≥ Ti, aunque comprendida en el estrecho margen entre 35,5±3,1 y 42,7±2,9 mJ/m².

Como ya se ha mencionado anteriormente, la irradiación con UV-C de la superficie de las aleaciones de Ti produce una modificación de su estado hidrófobo a superhidrófilo. Por ello se estudió el efecto de la radiación ultravioleta sobre la hidrofobicidad de la superficie del Ti y las aleaciones de titanio seleccionadas en función del tiempo de exposición a la radiación UV-C, y por tanto también de la dosis de radiación recibida, mediante goniometría del ángulo de contacto del agua. En la tabla 2 se han incluido los valores de los ángulos de contacto del agua sobre las aleaciones y sobre la superficie de titanio sometido a diferentes dosis de irradiación con luz UV-C. Antes de ser tratadas (t=0 min), todas las muestras presentaban un carácter hidrófobo, con un ángulo de contacto para el agua que comprendido entre aproximadamente 60° y 80°. A medida que aumentó el tiempo de irradiación, las superficies de las muestras cambiaron de hidrófobas a hidrófilas, pero a velocidades diferentes (Fig. 17). La disminución del ángulo de contacto del agua en la muestras de Ti6Al4V es más lenta que para las otras muestras y no llega a cero, dentro del error experimental, hasta los 240 min, mientras que para el Ti y el Ti6Al7Nb se hace cero a los 60 min de exposición. Es destacable el hecho de que la aleación Ti6Al7Nb consigue ser superhidrofílica antes que la aleación Ti6Al4V.

Tabla 2. Valores de los ángulos de contacto para el agua (grados) obtenidos sobre la superficie de las probetas de Ti, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb sometidas a distintos tiempos de irradiación con luz UV-C. También se muestran los valores de la dosis de radiación recibida a cada tiempo.

	TIEMPOS DE IRRADIACIÓN (min)/DOSIS RECIBIDA (J/cm ²)							
	0/0	15/2,023	30/4,358	60/8,321	90/12,680	120/16,792	240/33,634	360/51,125
Ti	81±4	51±3	18±1	0	0	0	0	0
Ti6Al4V	77±4	56±3	21±1	17±1	11±1	8±1	0	0
Ti6Al7Nb	62±3	49±3	56±3	0	0	0	0	0

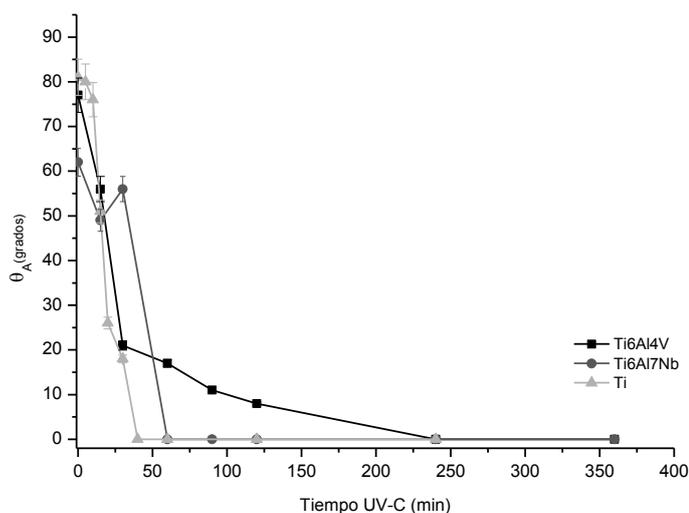


Figura 17. Evolución del ángulo de contacto del agua (θ_A) frente al tiempo de irradiación en las probetas de Ti, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb.

A pesar de ser el TiO_2 el compuesto predominante en las capas de óxido superficial que cubre todas las probetas, no todas tienen el mismo comportamiento frente a la dosis de radiación de luz UV-C recibida. Las diferencias observadas entre las muestras analizadas deben ser, por lo tanto, consecuencia de los elementos aleantes presentes en las capas de pasivado.

BIBLIOGRAFÍA

Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A., Lindström, J. *Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man.* Acta Orthopaedica Scandinavica, 52:2 (1981) 155-170.

Ask, M., Lausmaa, J., Kasemo, B. *Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide films on Ti6Al4V.* Applied Surface Science, 35 (1989) 283-301.

Azoulay, A., Shamir, N., Fromm, E., Mintz, M.H. *The initial interactions of oxygen with polycrystalline titanium surfaces.* Surface Science, 370 (1997) 1-16.

Barrere, F., Mahmood, T.A., de Groot, K., van Blitterswijk, C.A. *Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions.* Materials Science and Engineering R, 59 (2008) 38-71.

Bauer, S., Schmuki, P., von der Mark, K., Park, J. *Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces.* Progress in Materials Science, 58 (2013) 261-326.

Biesinger, M.C., Lau, L.W.M., Gerson, A.R., Smart, R. St.C. *Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn.* Applied Surface Science, 257 (2010) 887-898.

Bolt, P.H., Grotenhuis, E., Geus, J.W., Habraken, F.H.P.M. *The interaction of thin NiO layers with single crystalline α -Al₂O₃ (1120) substrates.* Surface Science, 329 (1995) 227-240.

Carley, A.F., Chalker, P.R., Riviere, J.C., Roberts, M.W. *The Identification and Characterisation of Mixed Oxidation States at Oxidised Titanium Surfaces by Analysis of X-Ray Photoelectron Spectra.* Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1, 83 (1987) 351-370.

Challa, V.S.A., Mali, S., Misra, R.D.K. *Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V.* Journal of Biomedical Materials Research A, 101 A (2013) 2083-2089.

Chen, Q. y Thouas, G.A. *Metallic implant biomaterials.* Materials Science and Engineering R, 87 (2015) 1-57.

Donoso Morcillo, M.G. *Energía libre superficial de biomateriales metálicos: Diferentes aproximaciones a partir de la goniometría de ángulo de contacto.* Trabajo de grado, Universidad de Extremadura (2004).

Fujishima, A., Rao, T.N., Tryk, D.A. *Titanium dioxide photocatalysis.* Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 1 (2000) 1-21.

Gallardo-Moreno, A.M., Pacha-Olivenza, M.A., Saldaña, L., Pérez-Giraldo, C., Bruque, J.M., Vilaboa, N., González-Martín, M.L. *In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-*

chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. Acta Biomaterialia, 5 (2009) 181–192.

Geetha, M., Singh, A.K., Asokamani, R., Gogia, A.K. *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. Progress in Materials Science*, 54 (2009) 397-425.

Guillemot, F., Prima, F., Tokarev, V.N., Belin, C., Porté-Durrieu, M.C., Gloriant, T., Baquey, CH. Lazare, S. *Ultraviolet laser surface treatment for biomedical applications of β titanium alloys: morphological and structural characterization. Applied Physics A*, 77 (2003) 899-904.

Hanawa, T., Asami, K., Asaoka, K. *Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid. Journal of Biomedical Materials Research*, 40 (1997) 530-538.

Hierro-Oliva, M. *TFM: Iniciación en el estudio de las propiedades ópticas del biomaterial Ti6Al4V a través de la elipsometría espectral. Universidad de Extremadura*, 2011.

Hierro-Oliva, M., Gallardo-Moreno, A.M., Rodríguez-Cano, A., Morales Bruque, J., González-Martín, M.L. *Experimental approach towards the water contact angle value on the biomaterial alloy Ti6Al4V. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, vol. LXX, 1, (2015) 1-13.*

Khan, M.A., Williams, R.L., Williams, D.F. *Conjoint corrosion and wear in titanium alloys. Biomaterials*, 20 (1999) 765-772.

Kuznetsov, M.V., Zhuravlev, J.F., Gubanov, V.A. *XPS analysis of adsorption of oxygen molecules on the surface of Ti and TiN, films in vacuum. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 58 (1992) 169-176.

Lee, W.H. y Hyun, C.Y. *XPS study of porous dental implants fabricated by electro-discharge-sintering of spherical Ti–6Al–4V powders in a vacuum atmosphere. Applied Surface Science*, 252 (2006) 4250-4256.

Leyens, C. y Peters, M. *Titanium and Titanium Alloys: Fundamentals and Applications. WILEY-VCH, Alemania*, 2003.

Lilley, P.A., Walker, P.S., Blunn, G.W. *Wear of titanium by soft tissue. Transaction of the 4th World Biomaterials Congress, Berlin*, pp. 227-230, (1992).

Long, M. y Rack H. J. *Titanium alloys in total joint replacement-a materials science perspective. Biomaterials*, 19 (1998) 1621-1639.

MacDonald, D.E., Rapuano, B.E., Deo, N., Stranick, M., Somasundaran, P., Boskey, A.L. *Thermal and chemical modification of titanium–aluminum–vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. Biomaterials*, 25 (2004) 3135-3146.

McCafferty, E. y Wightman, J.P. *An X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium. Applied Surface Science*, 143 (1999) 92-100.

Milosev, I., Kosec, T., Strehblow, H.H. *XPS and EIS study of the passive film formed on orthopaedic Ti-6Al-7Nb alloy in Hank's physiological solution.* *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 3547-3558.

Milosev, I., Metikos-Hukovic, M., Strehblow, H.H. *Passive film on orthopaedic TiAlV alloy formed in physiological solution investigated by X-ray photoelectron spectroscopy.* *Biomaterials*, 21 (2000) 2103-2113.

Mitsuo Niinomi. *Mechanical properties of biomedical titanium alloys.* *Materials Science and Engineering A*, 243 (1998) 231-236.

Nam H. Vu, Hieu V. Le, Thi M. Cao, Viet V. Pham, Hung M. Le, Duc Nguyen-Manh. *Anatase-rutile phase transformation of titanium dioxide bulk material: a DFT + U approach.* *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24 (2012) 1-10.

Pacha-Olivenza, M.A., Gallardo-Moreno, A.M., Méndez-Vilas, A., Bruque, J.M., González-Carrasco, J.L. y González-Martín, M.L. *Effect of UV irradiation on the surface Gibbs energy of Ti6Al4V and thermally oxidized Ti6Al4V.* *Journal of Colloid and Interface Science*, 320 (2008) 117-124.

Pacha-Olivenza, M.A., Gallardo-Moreno, A.M., Vadillo-Rodríguez, V., González-Martín, M.L., Pérez-Giraldo, C., Galván, J.C. *Electrochemical analysis of the UV treated bactericidal Ti6Al4V surfaces.* *Materials Science and Engineering C*, 33 (2013) 1789-1794.

Park, J.H., Olivares-Navarrete, R., Baier, R.E., Meyer, A.E., Tannenbaum, R., Boyan, B.D., Schwartz, Z. *Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response.* *Acta Biomaterialia*, 8 (2012) 1966-1975.

Prasad, S., Ehrensberger, M., Prasad Gibson, M., Kim, H., Monaco Jr, E.A. *Biomaterial properties of titanium in dentistry.* *Journal of Oral Biosciences*, 57 (2015) 192-199.

Tang, H., Prasad, K., Sanjines, R., Schmid, P.E., Levy, F. *Electrical and optical properties of TiO₂ anatase thin films.* *Journal of Applied Physics*, 75 (1994) 2042-2047.

Tomohiko Miyauchi, Masahiro Yamada, Akiko Yamamoto, Fuminori Iwasa, Tetsuo Suzawa, Ryutaro Kamijo, Kazuyoshi Baba, Takahiro Ogawa. *The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photofunctionalized nanoscale TiO₂ layers on biomaterials surfaces.* *Biomaterials*, 31 (2010) 3827-3839.

Wang, R., Sakai, N., Fujishima, A., Watanabe, T., Hashimoto, K. *Studies of Surface Wettability Conversion on TiO₂ Single-Crystal Surfaces.* *Journal of Physical Chemistry B*, 103 (1999) 2188-2194.

Welsh, G., Boyer, R. y Collins, E.W. *Material properties Handbook: Titanium alloys.* ASM Ohio, USA, 1994.

Xuanyong Liu, Paul K. Chu, Chuanxian Ding. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications.* Materials Science and Engineering R, 47 (2004) 49–121.

Yoshiki Oshida. *Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials.* Elsevier, Gran Bretaña, 2007.

Yu, S.Y., Scully, J.R., Vitus, C.M. *Influence of niobium and zirconium alloying additions on the anodic dissolution behavior of activated titanium in HCl solutions.* Journal of The Electrochemical Society, 148 (2001) 68-78.

WEBGRAFÍA

Página web número 1: **NIST Standard Reference Database.** <http://srdata.nist.gov/xps/>

Página web número 2: **XPS International.** <http://www.xpsdata.com/>

**CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE
PROTEÍNAS EN SUPERFICIES EXTENSAS DE
ALEACIONES DE TITANIO**

4. EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS EN SUPERFICIES EXTENSAS DE ALEACIONES DE TITANIO

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Proteínas

Las proteínas son biomoléculas formadas fundamentalmente por cadenas lineales de aminoácidos, unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Están presentes, con un alto porcentaje (constituyen el 80 % del protoplasma deshidratado de toda célula), en la composición de los organismos vivos. Las proteínas son macromoléculas complejas, de tamaños en un rango amplio que va desde unos pocos miles de daltons a más de un millón (Peña, A., *et al.*, 2004). En su composición siempre aparecen el carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y además, la mayoría de las proteínas contienen azufre y fósforo. Presentan una superficie muy heterogénea en la que las cargas eléctricas no están distribuidas uniformemente y con dominios con distinto grado de hidrofobicidad.

Aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades básicas que forman las proteínas. La composición química general que presentan es un grupo amino ($-NH_2$), básico, y otro carboxilo ($-COOH$), ácido, en la misma molécula. Las moléculas que pueden actuar como ácido o como base se denominan anfóteras. Por tener un grupo $-COOH$, los aminoácidos pueden disociarse dando protones (H^+); y por tener un grupo $-NH_2$ básico, puede captarlos. Estos dos grupos están unidos a su vez un carbono α ($-C-$) (Fig. 1), que a su vez se une a un átomo de hidrógeno y a un grupo químico variable, denominado radical ($-R$).

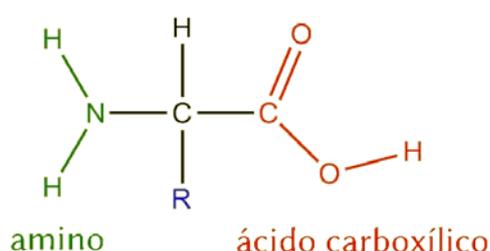


Figura 1. Fórmula general de los aminoácidos (Imagen recuperada de página web 1).

Existen cientos de radicales por lo que se conocen cientos de aminoácidos diferentes, pero sólo 20 forman parte de las proteínas. Cada uno de estos 20 aminoácidos viene caracterizado por su radical R (Fig. 2). Estos 20 aminoácidos pueden distribuirse de forma diferente en cuanto a número, clase y orden y de ello deriva la gran diversidad de las proteínas.

AMINOÁCIDOS

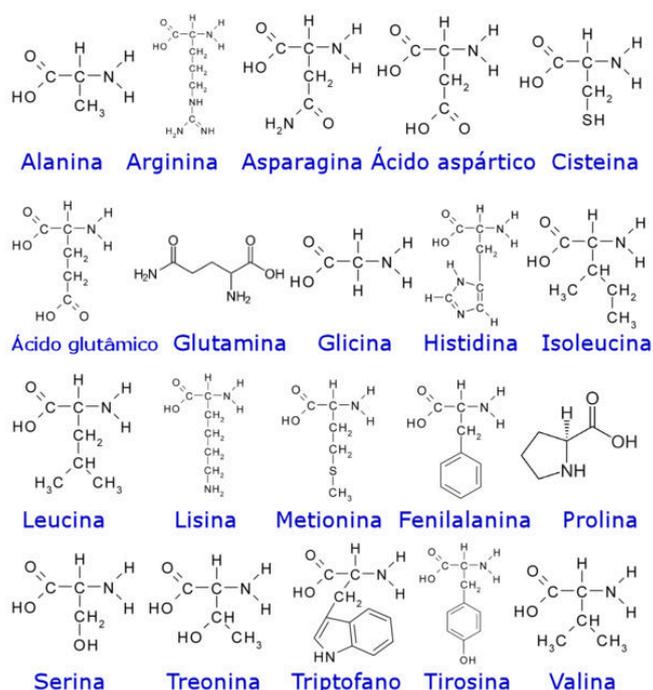


Figura 2. Fórmula de los 20 aminoácidos que componen las proteínas (Imagen recuperada de página web 2)

Como ya se ha indicado, en las proteínas, los aminoácidos se encuentran unidos linealmente por medio de uniones peptídicas. Estas uniones se forman por la reacción entre el grupo carboxilo del primer aminoácido con el grupo amino del segundo aminoácido, formando un enlace CO-NH con la pérdida de una molécula de agua. Cuando se unen dos aminoácidos de esta manera, se forma un péptido, y el enlace que los mantiene unidos se denomina enlace peptídico. De acuerdo con el número de aminoácidos que formen el péptido, este se llama di., tri., tetra., etc., o polipéptido, cuando la cadena está formada por más de 10 aminoácidos. Las proteínas son polipéptidos formados por más de 100 aminoácidos.

La estructura más básica en la composición de proteínas, la estructura primaria (Fig. 3), consiste en una secuencia de aminoácidos, donde el número de esos estos, la clase y el orden (secuencia) en el que están dispuestos en la cadena proteica son característicos de cada proteína. Como consecuencia del establecimiento de enlaces peptídicos entre los distintos aminoácidos que forman la proteína se origina una cadena principal, donde los átomos implicados en el enlace peptídico se encuentran situados en un mismo plano y constituyen una estructura rígida que no puede girar libremente sin que se rompan enlaces covalentes. Sin embargo, sí es posible la rotación libre alrededor del carbono α y, por lo tanto, de un aminoácido respecto de otro en un péptido. La cadena polipeptídica puede adoptar, fundamentalmente, dos disposiciones en el espacio de entre el número ilimitado que, en teoría, podría tomar, debido al libre giro del carbono α de los aminoácidos, estas son la conformación α -hélice y la conformación β , a las que se conoce como estructura secundaria de las proteínas (Fig. 3). La conformación α -hélice se produce por el enrollamiento de la cadena polipeptídica sobre un eje imaginario, donde los grupos R de los distintos aminoácidos se sitúan hacia afuera,

sobresaliendo de la estructura helicoidal. Esta estructura se mantiene estable debido al enfrentamiento de los grupos CO y NH (Baker, E.N. y Hubbard, R.E., 1984) de los enlaces peptídicos que se produce en cada vuelta o espiral de la hélice, acercándose a una distancia suficientemente cercana para que se establezca un enlace de puente de hidrógeno. Aunque este enlace es débil, la existencia de muchos de ellos hace que la hélice se estabilice. La conformación β o hoja- β es la que adopta la cadena polipeptídica que se extiende en zigzag. Si una cadena se dispone adyacente a la otra, se pueden mantener unidas de forma estable, formando enlaces de puente de hidrógeno entre ambas (Chothia, C., 1984). Cuando la estructura secundaria se pliega sobre sí misma y adquiere una forma globular, se forma la estructura terciaria de las proteínas, que sería la distribución tridimensional de todos los átomos que la constituyen (Fig. 3). Esta estructura se mantiene estable debido a las interacciones que se producen entre los distintos grupos de los radicales R (entre los que se pueden encontrar, enlaces disulfuro y enlaces por puentes de hidrógeno), que se acercan unos a otros como consecuencia del plegado de la cadena. De la estructura terciaria derivan las propiedades biológicas de las proteínas, puesto que la disposición en el espacio de los diferentes grupos funcionales, condiciona su capacidad de interacción con otros grupos. Por último, la estructura cuaternaria de las proteínas se forma mediante la unión de enlaces débiles de varias cadenas de aminoácidos con estructura terciaria para formar un complejo proteico (Fig. 3).

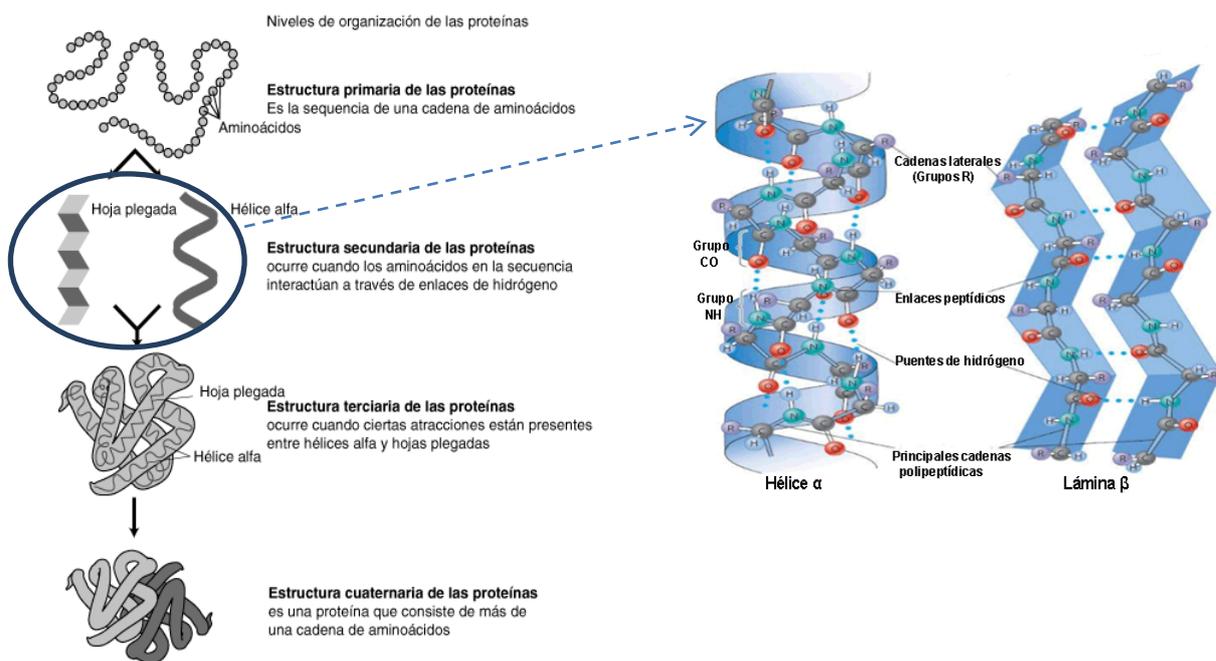


Figura 3. Niveles de organización de las proteínas, donde se puede observar de forma ampliada las dos conformaciones de la estructura secundaria (Imágenes recuperadas de páginas web 3 y 4).

Para la realización de los estudios de adsorción de proteínas en superficies sólidas descritos en este capítulo, se han seleccionado dos proteínas presentes en la sangre, como son la albúmina y el fibrinógeno. Y otra proteína presente en gran variedad de células y que por lo tanto participa en las reacciones bioquímicas de diversos procesos fisiológicos y patológicos, que es la fibronectina. En los siguientes apartados se va a ampliar la información acerca de cada una de ellas.

4.1.1.1. Albúmina de suero humano (HSA)

Es una proteína de transporte globular, muy abundante en el plasma sanguíneo (constituye aproximadamente el 60% de las proteínas plasmáticas) y su principal tarea es mantener la presión osmótica. Su punto isoeléctrico corresponde a un pH de 4.6 aproximadamente. El HSA es la proteína más pequeña que se encuentra en la sangre (peso molecular de 66 kDa), con unas dimensiones de aproximadamente 4 nm x 4 nm x 14 nm (Wehmeyer, J.L., *et al.* 2010) en forma de corazón (Fig. 4) en condiciones fisiológicas. Dependiendo del valor del pH del medio en el que se encuentra, la forma de la albúmina puede variar de forma reversible; se encuentra con la forma básica de corazón para pH entre 4.3 y 8, pasando a una disposición con forma de corazón más abierta para pH entre 2.7 y 4.3. Y para pH por debajo de 2.7 y por encima de 8, adopta una forma completamente extendida (Carter, D.C. y Ho, J.X., 1994). La albúmina de suero humano está compuesta por cadenas de 585 aminoácidos, entre los que se encuentran mayoritariamente la alanina, cisteína, lisina, leucina y ácido glutámico y además, contiene 17 enlaces disulfuro. Esta proteína tiene carga eléctrica negativa, lo que contribuye a que no traspase algunas membranas del organismo que tienen la misma carga eléctrica (Peters, T. 1985).

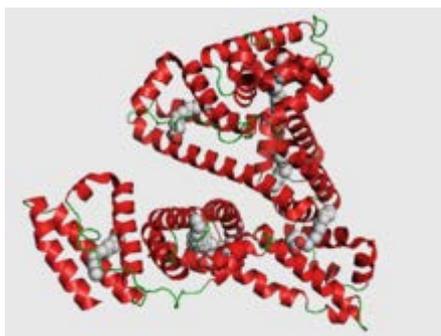


Figura 4. Molécula de albúmina (Imagen recuperada de página web 5).

4.1.1.2. Fibrinógeno (Fng)

El fibrinógeno es una proteína implicada en la coagulación en cascada de la sangre y consecuentemente en la adhesión celular y la biocompatibilidad. Es la proteína plasmática menos soluble y por acción de la trombina pasa a ser convertida en fibrina insoluble. Tiene unas dimensiones de aproximadamente 45 nm de longitud y 9 nm de diámetro, de estructura elipsoidal y su peso es de 340 kDa. Debido a su estructura, puede ser adsorbida en las dos orientaciones posibles con respecto a la superficie, es decir, por la parte más alargada o por el extremo. Si la adsorción en la superficie sólida se produce por el extremo, la cantidad de proteína adsorbida es menor que si la adsorción se produce por la parte más alargada. El fibrinógeno es una molécula fibrilar, que en sus extremos tiene cargas fuertemente negativas. Su punto isoeléctrico corresponde a un pH de 5.5. La molécula de esta proteína está compuesta por tres pares de cadenas de polipéptidos diferentes ($A\alpha$, $B\beta$ y γ , en la figura 5) unidas por puentes disulfuro en un dominio central E (Lauricella, A.M., 2007). La cadena $A\alpha$ contiene 610 aminoácidos, 461 la cadena $B\beta$ y 411 aminoácidos la cadena γ (Weisel, J.W., 2005). Las secuencias de aminoácidos de las tres cadenas son homólogas, aunque se encuentran

diferencias importantes entre ellas, por ejemplo hay 8, 11 y 10 moléculas de cisteína en las cadenas $A\alpha$, $B\beta$ y γ , respectivamente.

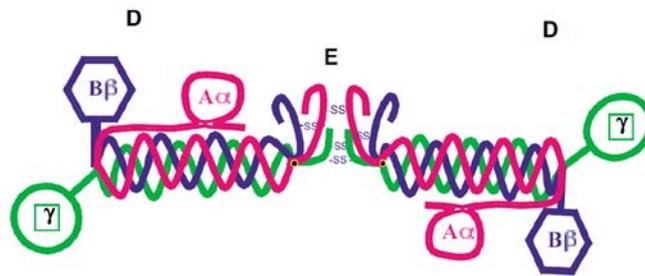


Figura 5. Representación esquemática de la molécula de fibrinógeno, en la que cada color representa una cadena polipeptídica diferente ($A\alpha$, $B\beta$ y γ) (Imagen recuperada de Lauricella, A.M., 2007).

4.1.1.3. Fibronectina (Fn)

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva presente en forma soluble en plasma e insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. Su función adhesiva le permite desempeñar diferentes papeles en diversas funciones biológicas, como la ayuda en la cicatrización de heridas y la estabilización de coágulos. Está formada por una molécula asimétrica compuesta por dos subunidades similares de 140 nm de longitud y 220 kDa cada una, unidas por puentes disulfuro, formando un dímero, con un grupo N-amino terminal en cada subunidad (Fig. 6). Además, cada una de estas subunidades puede dividirse en varios dominios funcionales en los que se pueden fijar diferentes moléculas y células.

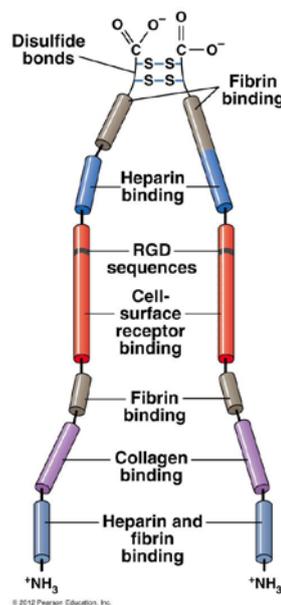


Figura 6. Esquema de la molécula de fibronectina (Imagen recuperada de página web 6).

La fibronectina contiene aproximadamente 2300 aminoácidos, entre los que se encuentran la serina, glicina y alanina. Su punto isoeléctrico corresponde a un pH de entre 5.5 y 6.3 (Hynes, R.O. y Yamada, K.M., 19982). La forma que presenta la Fn puede variar, cambiando de una

estructura compacta a una extendida dependiendo del pH y de la fuerza iónica de la solución. En condiciones fisiológicas la fibronectina plasmática adopta una conformación compacta, asimétrica en forma de disco, pasando a una estructura más extendida que aparece tanto a alta fuerza iónica como para pH extremos (Potts, J.R. y Campbell, L.D., 1994).

4.1.2. Adsorción de proteínas

La adsorción de proteínas es un proceso muy complejo, dependiente del tiempo, donde ocurren una serie de sucesos físico-químicos de manera simultánea o en cascada. Las proteínas poseen una alta afinidad por las interfases y su adsorción normalmente se produce de forma muy rápida, pudiéndose observar una cobertura de la superficie prácticamente completa transcurridos unos pocos segundos después de poner en contacto la superficie con la solución. Las interacciones conocidas que ocurren en la adsorción de proteínas son en su mayoría interacciones no covalentes, es decir, enlaces mediante puentes de H, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (los dominios no polares de la molécula evitan las regiones polares de la superficie del material o viceversa).

Incluso después de haber alcanzado una cobertura superficial completa, la capa de proteínas adsorbidas presenta un comportamiento dinámico debido a los cambios conformacionales y procesos de reordenamiento que se producen en estas (Tsapikouni, T. S. y Missirlis, Y. F., 2008). La interacción de las proteínas con las superficies de los biomateriales es diferente dependiendo de la presencia de una única proteína o de soluciones de mezclas de proteínas, debido a la competencia en la adsorción entre ellas.

Todas estas características del proceso de adsorción de proteínas hacen que las propiedades físicas y químicas de la superficie del sustrato influyan directamente en las propiedades de la capa adsorbida. Las principales características de una superficie que intervienen directamente en el proceso de adsorción, como ya se ha mencionado en el primer capítulo de esta tesis, son la composición química, la topografía, el potencial eléctrico, la hidrofobicidad y la energía libre superficial (Spriano, S. *et al.*, 2017) (Rabe, M. *et al.*, 2011). Muchas de estas características superficiales han sido estudiadas para diferentes tipos de proteínas y de superficies, así los estudios presentados por Larbi Filali (Filali, L., *et al.* 2016) proponen que las superficies hidrófilas de silicio amorfo tienen una mayor adsorción de albúmina que las hidrófobas. A. Sethuraman *et al.* (Sethuraman, A. *et al.* 2004) obtienen resultados similares a los obtenidos por Larbi Filali *et al.*, realizando estudios de adsorción de siete proteínas globulares sobre ocho sustratos sólidos compuestos por monocapas autoensambladas (SAM). Cabe mencionar el trabajo presentado por Wei-Bor Tsai (Wei-Bor Tsai *et al.* 1999) donde utilizan poliestireno como ejemplo de material hidrófobo para estudiar el papel que juega el fibrinógeno en la adhesión de plaquetas. Otros estudios demuestran que la misma composición química pero con diferentes microestructuras superficiales puede dar como resultado un comportamiento de adsorción muy diferente (Zhongwei Wang, *et al.*, 2017). Con respecto a superficies de titanio, uno de los estudios más actuales es el propuesto por Ying-Sui Sun (Ying-Sui Sun *et al.* 2016), donde observan que la modificación de la superficie del titanio utilizando genipina para la inmovilización de proteína ósea mejora la hidrofiliidad de la superficie y la adsorción de albúmina en la misma.

La hidrofobicidad superficial es uno de los parámetros que afectan en mayor medida a la respuesta biológica de un material implantado, ya que afecta tanto a la adsorción de proteínas como a la adhesión de células y bacterias (Lee, J.H. y Lee, H.B., 1998) (Pacha-Olivenza, M.A. *et al.*, 2013). Por norma general, se considera que en las superficies hidrófobas se produce una mayor adsorción de proteínas que en las superficies hidrófilas. Esto es debido a que en la adsorción de proteínas se producen interacciones hidrofóbicas (Schmidt D.R., *et al.* 2009), en contraste con las fuerzas repulsivas que surgen de las moléculas de agua fuertemente unidas a las superficies hidrófilas (Ostuni, E. *et al.* 2001). Pero algunos de los estudios presentados en el párrafo anterior defienden el comportamiento contrario en la adsorción de proteínas, ya que observan una mayor adsorción de proteínas en superficies hidrófilas. En estas superficies, es de esperar que la adsorción de proteínas se rija por interacciones electrostáticas y además, se prevé que pueda favorecer los reordenamientos estructurales (Norde, W. 1995). Por norma general, los dominios polares (hidrófilos) de las proteínas tienden a adsorberse a superficies polares, mientras que los dominios hidrófobos tienden a adsorberse en superficies hidrófobas.

4.1.2.1. Adsorción competitiva de proteínas

En los fluidos corporales se detectan una gran cantidad de proteínas y esto hace que la capa de proteínas adsorbidas en la superficie de los biomateriales implantados en el cuerpo humano sea compleja. Hay muchos estudios sobre adhesión de una única proteína en biomateriales (Silva-Bermudez, P. y Rodil, S.E. 2013), pero el comportamiento de la adhesión competitiva de proteínas no se puede predecir de la adsorción de una única proteína ya que la presencia de una proteína puede reducir la adsorción de otra. Este efecto se conoce como la secuencia de Vroman (Vroman, L. y Adams, A. L., 1969) (Hirsh, S. L. *et al.*, 2013) donde inicialmente las proteínas más pequeñas y más abundantes se difunden rápidamente a la superficie y son adsorbidas, para después ser desplazadas por proteínas menos abundantes y más activas.

Son muchos los factores que afectan notablemente a la adsorción competitiva de proteínas, como son, la composición química de la superficie, el pH de la solución, la velocidad de despliegue de la proteína en la superficie y el tiempo de resistencia de la proteína en la interfase (Brash, J.L. y Horbett, T.A., 1995). Además, en la adsorción competitiva de proteínas la disposición y orientación que sufren las mismas en la capa adsorbida son muy importantes para determinar la respuesta biológica de un biomaterial (Rabe, M. *et al.*, 2011). Jinku kim (Jinku Kim, 2016) ha desarrollado una tecnología experimental basada en el intercambio de hidrógeno/deuterio combinada con la espectrometría de masas para investigar los cambios en la disposición de las proteínas en capas adsorbidas.

Para estudiar la adsorción de varias proteínas sobre biomateriales se utilizan distintas técnicas de análisis, como se verá en el siguiente apartado de forma más desarrollada (Silva-Bermudez, P. y Rodil, S.E. 2013). Un ejemplo de ello son los trabajos propuestos por P. Ying *et al.* (Ying, P. *et al.*, 2004), donde estudian mediante elipsometría la adsorción competitiva de colágeno y albúmina en superficies de silicio con diferentes grados de hidrofobicidad. En ellos se muestra que la adsorción de colágeno proveniente de una mezcla de proteínas disminuye, a medida que la de albúmina aumenta, con el aumento de la hidrofobicidad de la superficie.

4.1.3. Caracterización de capas de proteínas adsorbidas en biomateriales metálicos

El estudio de las interacciones a nivel molecular entre los materiales sintéticos y los sistemas biológicos sigue teniendo mucha importancia en los campos de investigación relacionados con los biomateriales, ya que existe una influencia directa entre la estructura del material y la respuesta de los organismos que componen los fluidos fisiológicos. Como se ha mencionado en los capítulos previos y en este mismo, son muchos los aspectos que hay que someter a estudio para adquirir una amplia comprensión sobre los fenómenos de adsorción de proteínas. Es por este motivo por el que se utilizan diferentes técnicas para proporcionar información complementaria sobre los diferentes aspectos fisicoquímicos que envuelven estos fenómenos. Algunas de las técnicas más empleadas para el estudio de capas de proteínas adsorbidas en materiales metálicos son la Elipsometría Espectroscópica (SE), la Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM), la Espectroscopía Infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR), la Espectroscopía Foelectrónica de Rayos X (XPS), la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) o la Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo (TOF-SIMS).

El uso más extendido de la SE es el estudio de la cinética de adsorción en tiempo real de proteínas en la interfase sólido-líquido, siendo posible obtener el valor del espesor y los parámetros ópticos de la capa de proteínas adsorbidas (Arwin, H., 2011) (Lousinian, S. y Logothetidis, S., 2008) (Elwing, H., 1998). Sin embargo una limitación muy importante en esta técnica es que para la obtención de estos resultados se requiere un conocimiento amplio a nivel de composición de la muestra. Para obtener una cuantificación de la cantidad de proteínas adsorbidas se suele utilizar QCM (Vörös, J., 2004) y mediante AFM se puede estudiar el espesor de la capa de proteínas adsorbidas, así como sus fuerzas de unión a la superficie (Agnihotri, A. y Siedlecki, C.A. 2004). Una de las pocas técnicas que permiten la identificación de detalles estructurales y conformacionales de las proteínas adsorbidas es FTIR, ya que es una técnica capaz de detectar los cambios en las estructuras secundarias de las proteínas (Tunc, S. *et al.* 2005). Pero esta técnica tiene un uso limitado en el análisis de disoluciones con varias proteínas porque los espectros en estos casos pueden llegar a ser muy complicado y difíciles de resolver.

Además de las técnicas descritas en el párrafo anterior, las técnicas de XPS y TOF-SIMS son métodos muy potentes para caracterizar capas de proteínas adsorbidas sobre superficies de biomateriales debido a su especificidad química y a su sensibilidad superficial, permitiendo detectar muy bajas cantidades de proteínas. En este campo, cabe destacar a D.G. Casnert, con multitud de trabajos presentados sobre caracterización de superficies en contacto con biomoléculas mediante las técnicas citadas (Wagner, M.S. y Castner, D.G., 2001) (Michel, R. y Castner, D.G., 2006) (Belu, A.M. *et al.* 2003). Mediante TOF-SIMS también es posible estudiar la orientación y conformación de la capa de proteínas, observando las modificaciones en la intensidad de los iones secundarios de cada aminoácido, tal y como lo hacen Caren D. Tidwell *et al.* (Tidwell, C.D. *et al.* 2001) en sus estudios de caracterización de albúmina y fibronectina en superficies de titanio, oro y politetrafluoroetileno. Debido a la complejidad de los espectros de masas de las proteínas, se utilizan técnicas de análisis de componentes principales (PCA) para obtener una mejor interpretación de los resultados obtenidos mediante TOF-SIMS. Wagner y

Castner desarrollan esta técnica de análisis estadístico en muchas de sus publicaciones con diferentes proteínas y sustratos (Wagner, M. S. y Castner, D. G., 2001, 2003) (Sanni, O.D. *et al.* 2002). Por otro lado, mediante los resultados obtenidos utilizando la técnica de XPS se pueden obtener, además de la composición de la capa que se encuentra adsorbida en la superficie del biomaterial, los enlaces mediante los cuales las proteínas se unen al sustrato o entre sí. Numerosos investigadores vienen utilizando esta técnica para estudiar las interacciones que se producen entre la capa de proteínas y el biomaterial, como por ejemplo Sundgren *et al.* (Sundgren, J.E. *et al.*, 1986) quienes estudian la adsorción de fibrinógeno en superficies de oro y titanio. En este trabajo relacionan los cambios en intensidad y forma del pico del C1s, observados con respecto a la muestra de referencia, con la adsorción de fibrinógeno.

4.1.4. Objetivos de este capítulo

En este capítulo se presenta el estudio de la adsorción de tres proteínas diferentes, albúmina, fibrinógeno y fibronectina, en superficies de las aleaciones de titanio, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. Además, se propone un cambio en la hidrofobicidad de estas superficies mediante irradiación con luz UV-C, para ver los posibles efectos que éste produce en la adsorción de estas proteínas. Por último, se evalúa la adsorción competitiva entre las tres proteínas seleccionadas sobre las superficies de aleación de titanio con diferentes grados de hidrofobicidad.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

4.2.1. Descripción de sustratos y medios

La adsorción de proteínas estudiada en este capítulo se realizó sobre superficies de las aleaciones Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. Las características de ambos materiales y las técnicas empleadas para el pulido y la limpieza de los mismos han sido descritas con detalle en el capítulo anterior. Para la modificación de la hidrofobicidad de la superficie de estas aleaciones se emplearon tiempos de 2 y 15 horas de irradiación con luz UV-C, utilizando el mismo proceso descrito también en el capítulo anterior.

Las proteínas utilizadas fueron suministradas por Sigma-Aldrich (Alemania), en el caso de la albúmina y el fibrinógeno en formato de polvo liofilizado y en el caso de la fibronectina en una suspensión al 0,1 %.

Las disoluciones de proteínas se realizaron utilizando como medio un tampón fosfato salino (PBS), el cual se prepara a partir de un tampón fosfato potásico (KPi, que consiste en una disolución de K_2HPO_4 (43,5 g/l) y KH_2PO_4 (34,0 g/l) en agua destilada) al que se le añaden 8,76 g/l de NaCl.

4.2.2. Adsorción de proteínas

La adsorción de proteínas sobre las superficies de las aleaciones de titanio se realizó depositando sobre las probetas 1 ml de disolución de proteínas de distintas concentraciones (10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 80 μ g/ml y 100 μ g/ml) a 37° C. Las muestras se incubaron a esa temperatura

durante 2 horas, tras lo cual, todas ellas se aclararon con agua destilada para retirar los restos de proteínas y sales que pudieran quedar sobre la superficie sin adsorberse al material, y por último se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente ser caracterizadas.

Para los estudios de adsorción competitiva de dos proteínas se prepararon disoluciones de las dos proteínas seleccionadas (albúmina y fibrinógeno) en distinta proporción de volumen (75:25 y 25:75), siendo la concentración final de las disoluciones 30 $\mu\text{g/ml}$. Las disoluciones de las tres proteínas se hicieron manteniendo una concentración de fibronectina de 10 $\mu\text{g/ml}$ y variando la mezcla de albúmina-fibrinógeno en distintos porcentajes. Se tomaron cuatro variaciones de mezcla de proteínas posibles. La primera disolución se realizó con una mezcla 50:50 en la disolución de Fn y la disolución de HSA, sin añadir nada de Fng. La segunda disolución se hizo mezclando el 50% de disolución de Fn y el otro 50% con la mezcla de HSA-Fng con una proporción de volumen 75:25. La tercera disolución se elaboró con una mezcla 50:50 entre la disolución de Fn y la mezcla de HSA-Fng con una proporción de volumen entre ellos de 25:75. Por último, la cuarta disolución se realizó mezclando la disolución de Fn y de Fng en una proporción 50:50, sin añadir nada de HSA.

El proceso de adsorción de las distintas mezclas de proteínas sobre las aleaciones de titanio se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para una sola proteína.

4.2.3. Técnicas de caracterización

4.2.3.1. Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo (TOF-SIMS)

Para los análisis de caracterización superficial realizados mediante TOF-SIMS se empleó un equipo TOF-SIMS⁵ (ION TOF, Alemania) (Fig. 7) que está equipado con un cañón de iones primarios de Bi_n^{q+} , con $n=1-7$ y $q=1-2$. Este cañón opera a 25q keV (25 keV para los iones con carga individual y 50 keV para los iones doblemente cargados) y a un ángulo de incidencia de 45° con respecto a la horizontal de la muestra. Para el caso de las muestras con proteínas adsorbidas en la superficie se utilizó Bi_3^{2+} , que tiene una intensidad de 0,2 pA y está más indicado para muestras orgánicas (Kollmer, F. 2004) y las medidas se realizaron en modo estático. El área analizada fue de 200 x 200 μm^2 con una densidad iónica de recogida por encima de 1E^{12} iones/ cm^2 en cada espectro y se midieron de 4 a 8 puntos en las superficies de cada muestra, dependiendo de la homogeneidad de las mismas. Todas las medidas se realizaron en el interior de una cámara de ultra alto vacío a una presión de $1,8\text{E}^{-9}$ mbar. La energía de extracción aplicada a los iones secundarios fue de 10 kV. Para obtener los espectros de masas de las muestras con proteínas adsorbidas se recogieron los iones positivos y se realizó una calibración de espectros con los siguientes iones: H^+ , H_2^+ , CH_3^+ , C_2H_3^+ , C_3H_5^+ y C_7H_7^+ .

El análisis de componentes principales se desarrolló con un paquete de herramientas para Matlab llamado NESAC/BIO Toolbox, creado y proporcionado amablemente por el Dr. Dan Graham. Para el desarrollo de esta tesis ha sido fundamental su aportación y por lo tanto agradezco al profesor Dan Graham el paquete de datos NESAC / BIO, que ha sido utilizado en este estudio, así como a la subvención NI-002027 del NIH que ha permitido su desarrollo.



Figura 7. Equipo TOF-SIMS⁵ (ION TOF)

4.2.3.2. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La caracterización de las muestras mediante XPS se realizó con un equipo K-Alpha (Thermo Scientific), que ya ha sido descrito en el capítulo anterior. El punto del haz incidente elegido para estas medidas tenía un tamaño de 400 μm , en disposición elipsoidal, y todas las medidas se realizaron en el interior de una cámara de ultra alto vacío, que una vez activado el flood gun operaba a $1,9\text{E}^{-7}$ mbar.

El análisis de los espectros de XPS y el tratamiento de los datos obtenidos mediante esta técnica se realizaron siguiendo el mismo proceso ya explicado en el capítulo anterior (en el apartado 3.2.2.1).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Estimación del rango de concentraciones de la disolución de proteínas para los análisis mediante TOF-SIMS

En primer lugar se realizaron experimentos que abarcaban un rango desde los 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta los 2 mg/ml en la concentración de proteínas para determinar la sensibilidad del equipo TOF-SIMS en la detección de las señales en este tipo de medidas. Para ello se utilizaron disoluciones de HSA en PBS de concentraciones de 5, 10, 30, 80, 100, 1000 y 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La

adsorción se realizó sobre probetas de Ti6Al4V tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos de este capítulo. Se incluyó como referencia una muestra patrón de la aleación de titanio sumergida en PBS sin proteína.

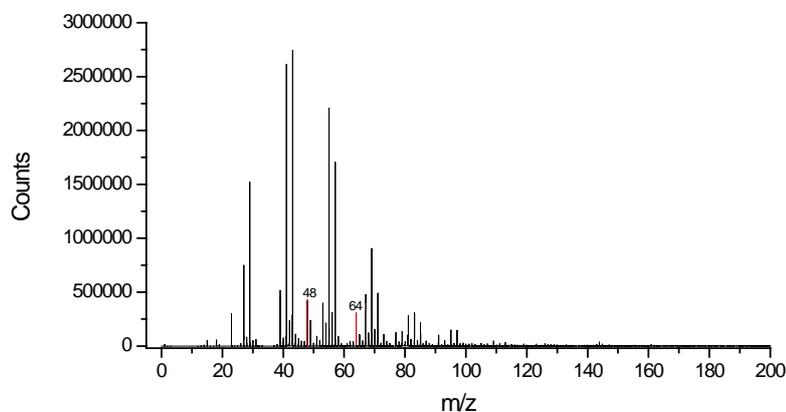


Figura 8. Espectro TOF-SIMS de iones positivos de la muestra patrón (Ti6Al4V+PBS). Los picos relacionados con el ion titanio (Ti^+ , $m/z=48$) y el ion óxido de titanio (TiO^+ , $m/z=64$) se muestran marcados en rojo.

En la figura 8 se presenta el espectro de iones positivos de la muestra de Ti6Al4V sumergida en PBS. Este espectro contiene los picos característicos de este material, como son el pico asociado al ion titanio (Ti^+ , con $m/z=48$) y a un ion óxido de titanio (TiO^+ , con $m/z=64$), representados en la figura 8 en rojo. Además, se pueden observar en esta figura isótopos de estos picos, como el ^{49}Ti ($m/z=49$) o el ^{49}TiO ($m/z=65$), así como numerosos picos relacionados con hidrocarburos (C_nH_m^+ , CH_m^+ con $m/z=14-16$, C_2H_m^+ con $m/z=28-31$, C_3H_m^+ con $m/z=39-41$, C_4H_m^+ con $m/z=47-51$, C_5H_m^+ con $m/z=62-66$) y con elementos presentes en el PBS (Na^+ con $m/z=23$, K^+ con $m/z=39$, KNaH^+ con $m/z=63$).

Los espectros de iones positivos obtenidos en las superficies sobre las que se realizó la adsorción de las disoluciones de proteínas se muestran en las figuras 9 y 10 para las distintas concentraciones. En estos espectros se detectan multitud de picos asociados a la proteína, que están relacionados con cada uno de los fragmentos de los aminoácidos que la componen (Tabla 1). Se han marcado en azul en las figuras 9 y 10 los picos correspondientes a algunos de los aminoácidos con mayor peso en su composición, que para el caso del HSA son la alanina (Ala con $m/z=44$), la prolina (Pro con $m/z=70$), el ácido glutámico (Glu con $m/z=84$) y la leucina (Leu con $m/z=86$). En estos espectros, también se siguen apreciando los picos más característicos relacionados con el sustrato (marcados en rojo en las figuras 9 y 10).

Tabla 1. Iones positivos de los fragmentos de los aminoácidos que componen las proteínas.

AMINOÁCIDO	ION POSITIVO (m/z)
Ácido Aspártico (Asp)	$C_3H_6NO_2^+$ (88,047)
Ácido Glutámico (Glu)	$C_4H_6NO^+$ (84,051), $C_4H_8NO_2^+$ (102,064)
Alanina (Ala)	$C_2H_4N^+$ (42,036), $C_2H_6N^+$ (44,052)
Arginina (Arg)	$CH_3N_2^+$ (43,055), $CH_5N_3^+$ (59,050), $C_2H_7N_3^+$ (73,068), $C_4H_{10}N_3^+$ (100,092), $C_4H_{11}N_3^+$ (101,094), $C_5H_{10}N_3^+$ (112,095), $C_5H_{11}N_4^+$ (127,107)
Asparagina (Asn)	$C_3H_4NO^+$ (70,032), $C_3H_7N_2O^+$ (87,063), $C_3H_6NO_2^+$ (88,047), $C_4H_4NO_2^+$ (98,030)
Cisteína (Cys)	CHS^+ (44,978), $C_2H_6NS^+$ (76,028)
Fenilalanina (Phe)	$C_8H_{10}N^+$ (120,090), $C_9H_7O^+$ (131,044), $C_9H_8O^+$ (132,056)
Glicina (Gly)	CH_2N^+ (28,020), CH_4N^+ (30,036)
Glutamina (Gln)	$C_4H_6NO^+$ (84,051)
Histidina (His)	$C_4H_5N_2^+$ (81,048), $C_4H_6N_2^+$ (82,058), $C_5H_8N_3^+$ (110,084)
Isoleucina (Ile)	$C_5H_{12}N^+$ (86,107)
Leucina (Leu)	$C_5H_{10}N^+$ (84,090), $C_5H_{12}N^+$ (86,107)
Lisina (Lys)	$C_3H_6N^+$ (56,051), $C_5H_{10}N^+$ (84,090)
Metionina (Met)	$C_2H_5S^+$ (61,013), $C_4H_{10}SN^+$ (104,059)
Prolina (Pro)	$C_4H_6N^+$ (68,054), $C_4H_8N^+$ (70,072)
Serina (Ser)	$C_2H_4NO^+$ (58,033), $C_2H_6NO^+$ (60,047), $C_3H_3O_2^+$ (71,015)
Tirosina (Tyr)	$C_7H_7O^+$ (107,056), $C_8H_{10}NO^+$ (136,090)
Treonina (Thr)	$C_4H_5O^+$ (69,038), $C_3H_8NO^+$ (74,067)
Triptófano (Trp)	$C_9H_8N^+$ (130,071), $C_{11}H_8NO^+$ (170,059)
Valina (Val)	$C_4H_{10}N^+$ (72,087), $C_5H_7O^+$ (83,054)

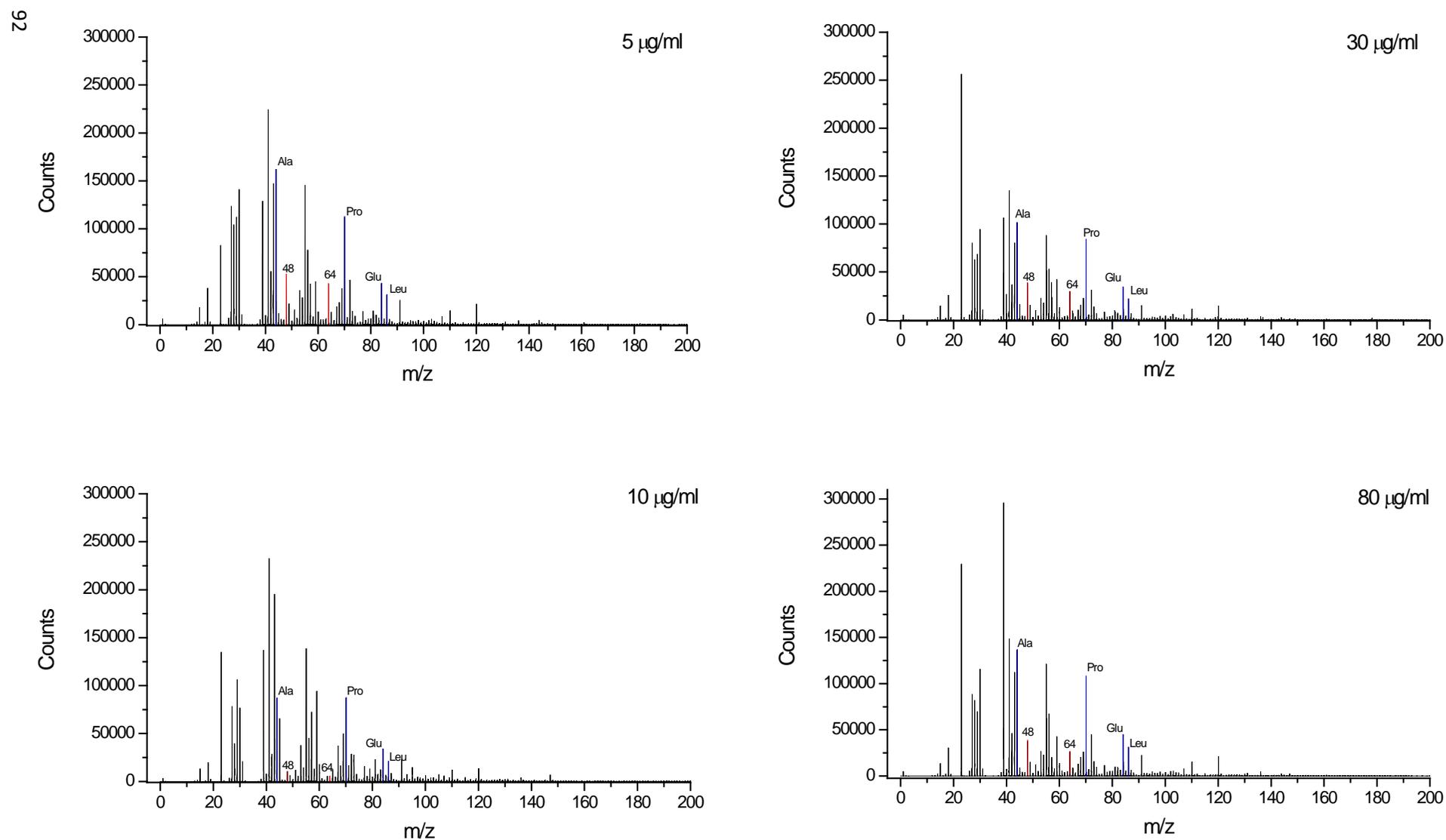


Figura 9. Espectros de iones positivo para las capas de proteína adsorbidas de concentraciones 5, 10, 30 y 80 µg/ml. Los picos relacionados con el ion titanio (Ti^+ , $m/z=48$) y el ion óxido de titanio (TiO^+ , $m/z=64$) se muestran marcados en rojo. Los picos relacionados con la alanina (Ala con $m/z=44$), prolina (Pro con $m/z=70$), ácido glutámico (Glu con $m/z=84$) y leucina (Leu con $m/z=86$) se encuentran marcados en azul.

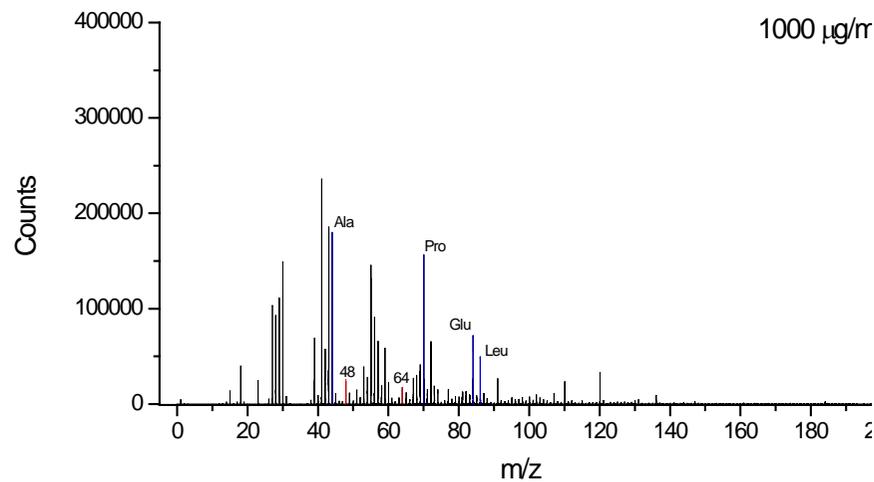
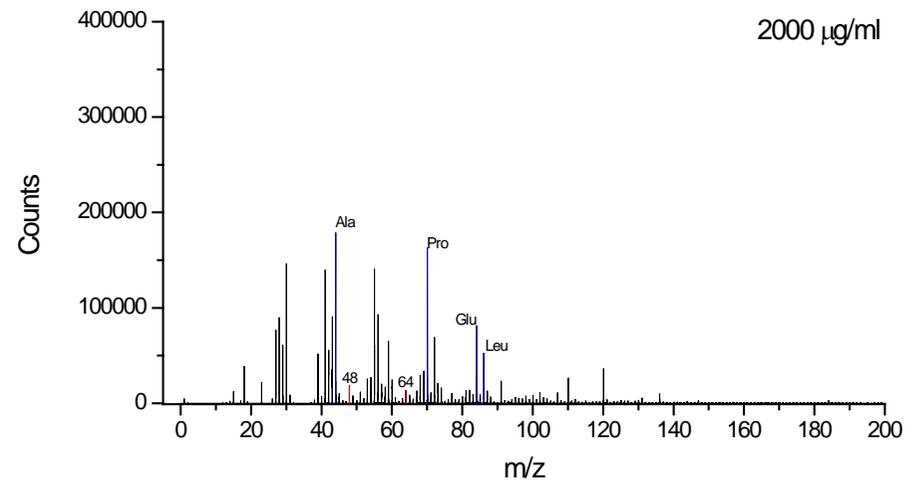
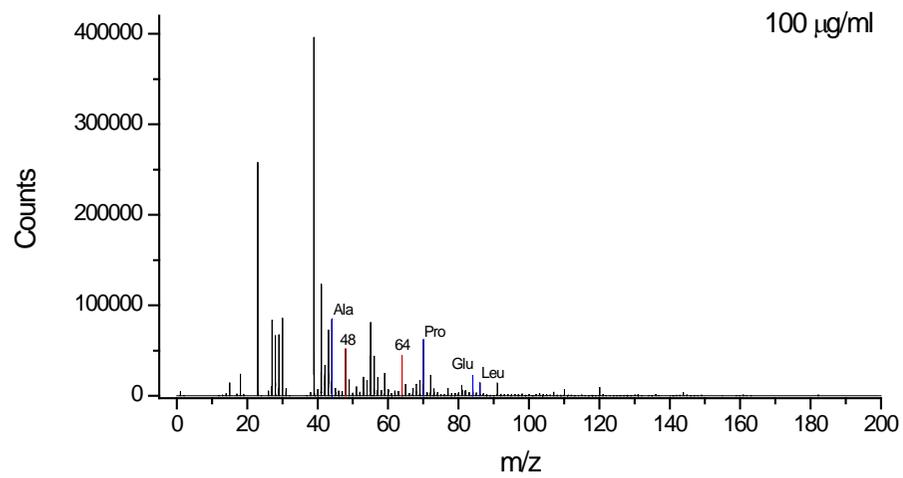


Figura 10. Espectros de iones positivo para las capas de proteínas adsorbidas de concentraciones 100, 1000 y 2000 µg/ml. Los picos relacionados con el ion titanio (Ti^+ , $m/z=48$) y el ion óxido de titanio (TiO^+ , $m/z=64$) se muestran marcados en rojo. Los picos relacionados con la alanina (Ala con $m/z=44$), prolina (Pro con $m/z=70$), ácido glutámico (Glu con $m/z=84$) y leucina (Leu con $m/z=86$) se encuentran marcados en azul.

Debido al enorme número de picos que se obtienen en un espectro TOF-SIMS, resulta dificultoso poder hacer comparaciones entre ellos sin reducir el número de picos a estudiar. Por este motivo, es muy útil representar la evolución de la intensidad normalizada de un solo pico característico de la muestra analizada en función de la variable que se quiera estudiar. Es decir, para poder comparar los resultados de TOF-SIMS de las medidas de las capas de proteínas adsorbidas en función de la concentración, se escogió un fragmento de un aminoácido que está presente en la composición de la proteína en una proporción elevada y que tenga una intensidad de señal aceptable para esta proteína en particular. En el caso de la albúmina de suero humano se eligió la alanina (Ala con $m/z = 44$), que corresponde a un 10,60 % del total de su composición (Wagner, M.S. y Castner, D.G., 2001). La normalización de este pico se llevó a cabo según lo descrito por Henry *et al.* (Henry, M., *et al.* 2003), esto es dividiendo la intensidad de la señal del fragmento seleccionado (I_{Ala}) por la suma de la intensidad de ese fragmento y la intensidad del pico del sustrato (en este caso es el del Ti^+ , I_{Ti} , con $m/z=48$). La relación entre la intensidad del pico correspondiente a la alanina normalizado y la concentración de la capa de proteína adsorbida se presenta en la figura 11. En ella se puede observar que el valor de la intensidad del punto correspondiente a la muestra patrón (representado en el 0 del eje de concentración de proteína) está por debajo de los obtenidos para el resto de concentraciones. A partir de los 5 $\mu\text{g/ml}$, la intensidad aumenta con la concentración hasta 1 mg/ml, donde se mantiene constante hasta los 2 mg/ml. Esto hecho puede deberse a que se produce una saturación en la señal que detecta el equipo. La concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ proporciona una elevada dispersión en los resultados obtenidos en comparación con otras concentraciones, resultando muy complicada la obtención de conclusiones. Además, presenta una dificultad añadida en los errores cometidos en la preparación de las disoluciones frente a las concentraciones más altas. Por lo tanto, para el resto de medidas realizadas con el TOF-SIMS se decidió trabajar en el rango de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$, excluyendo las concentraciones de 5, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$, para tener la certeza de que no se llegaba a la saturación de la señal del equipo y obtener unos resultados menos dispersos.

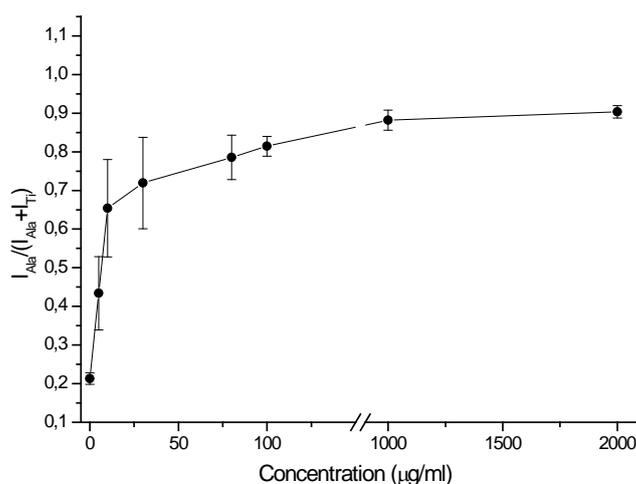


Figura 11. Relación entre la intensidad del fragmento del aminoácido seleccionado (I_{Ala}) y la suma de su intensidad y la intensidad del pico del sustrato (I_{Ti}), representada frente a la concentración de la disolución de HSA.

4.3.2. Caracterización de la capa de una única proteína adsorbida sobre superficies de Ti6Al4V y Ti6Al7Nb con distinto grado de hidrofobicidad

La caracterización de la capa de una única proteína adsorbida sobre las superficies de las dos aleaciones de titanio seleccionadas se realizó mediante TOF-SIMS para muestras preparadas a partir de disoluciones de HSA y Fng de concentraciones 10, 30, 80 y 100 µg/ml y exclusivamente sobre Ti6Al4V para la adsorción de fibronectina.

Puesto que los espectros de masas que se obtienen para muestras con capas adsorbidas son muy complejos, se presentan exclusivamente los resultados de una serie de iones que corresponden a fragmentos de algunos de los aminoácidos presentes de forma mayoritaria en la composición de las proteínas seleccionadas en este estudio (Tabla 2). Junto con los fragmentos de aminoácidos se han incluido los resultados correspondientes al ion Ti^+ , que se utilizó en la normalización de las intensidades, como se ha visto en el apartado anterior.

Tabla 2. Iones positivos de los fragmentos del sustrato y de los aminoácidos seleccionados para el análisis de la capa de proteínas adsorbida.

Ion	m/z	Ion	m/z
CH_4N^+ (Gly)	30,036	$C_4H_5N_2^+$ (His)	81,048
$C_2H_6N^+$ (Ala)	44,052	$C_4H_6NO^+$ (Glu)	84,051
Ti^+	47,948	$C_5H_{12}N^+$ (Leu)	86,107
$C_4H_5O^+$ (Thr)	69,038	$C_3H_7N_2O^+$ (Asn)	87,067
$C_4H_8N^+$ (Pro)	70,072	$C_3H_6NO_2^+$ (Asp)	88,047
$C_4H_{10}N^+$ (Val)	72,087	$C_4H_{10}N_3^+$ (Arg)	100,092

En las figuras 12 y 13 se ha representado el área corregida, es decir eliminando la línea base de cada pico de los iones seleccionados frente a la relación m/z, obtenidos de las diferentes capas adsorbidas de HSA sobre ambas aleaciones y tiempos de irradiación con UV-C. En estas figuras se puede observar que en general, la cantidad de proteína adsorbida es mayor para las muestras no tratadas con luz UV-C que para las que han sido sometidas a tratamiento para modificar su hidrofobicidad, excepto para la muestra de Ti6Al4V con una capa de HSA adsorbida de 100 µg/ml de concentración. Para esta muestra los datos obtenidos en la superficie sin tratamiento y tras ser sometido a irradiación UV-C durante 15 h son prácticamente iguales excepto en el caso de la prolina. Si atendemos a las superficies que han sido sometidas a irradiación con luz UV-C, se observa que en todos los casos el tratamiento de 2 h de irradiación disminuye la cantidad de proteína adsorbida sobre las superficies de Ti6Al4V y Ti6Al7Nb. Sin embargo, las muestras que fueron irradiadas durante 15 h presentan una adsorción intermedia entre la obtenida sobre las aleaciones sin irradiar y las irradiadas durante 2 h, a pesar de que la hidrofobicidad en las superficies tratadas 2h y 15h con UV-C es idéntica, tal y como se probó en el capítulo 3 a través de las medidas del ángulo de contacto del agua. Cabe destacar que el comportamiento del ion titanio en función del tiempo de irradiación del sustrato es diferente al de los fragmentos de los aminoácidos, detectándose una mayor cantidad de iones en los sustratos que han sido irradiados con luz UV-C durante 2 h que en los no irradiados o los irradiados 15 h. En general, las diferencias de comportamiento entre las muestras, dependiendo del tiempo de irradiación, son mayores entre las no irradiadas y las irradiadas 2h, que entre las muestras sin irradiar y las irradiadas 15 h.

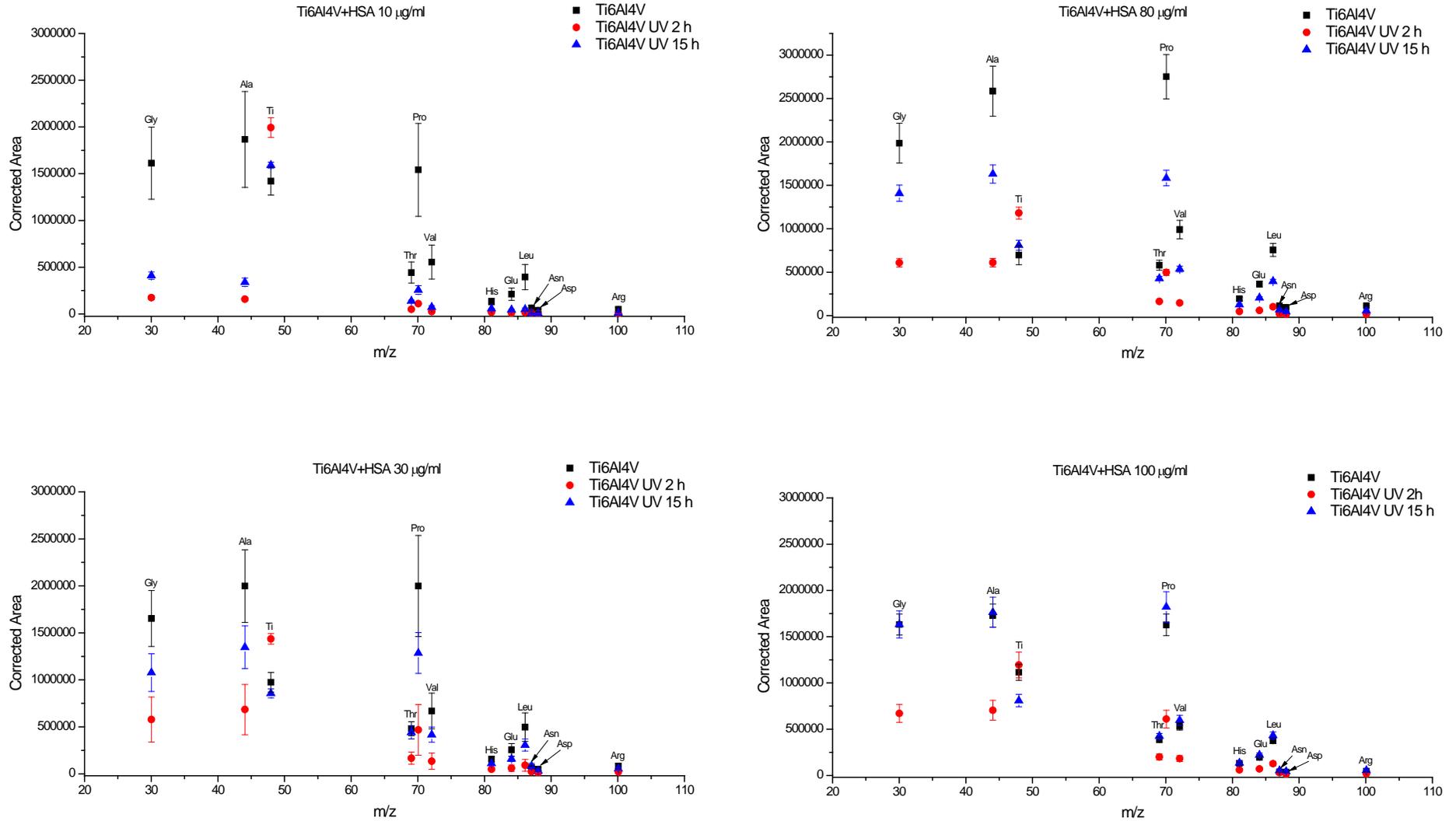


Figura 12. Fragmentos del sustrato y de aminoácidos detectados en las capas de HSA adsorbidas de concentraciones 10, 30, 80 y 100 µg/ml sobre superficies de Ti6Al4V con distintos grados de hidrofobicidad.

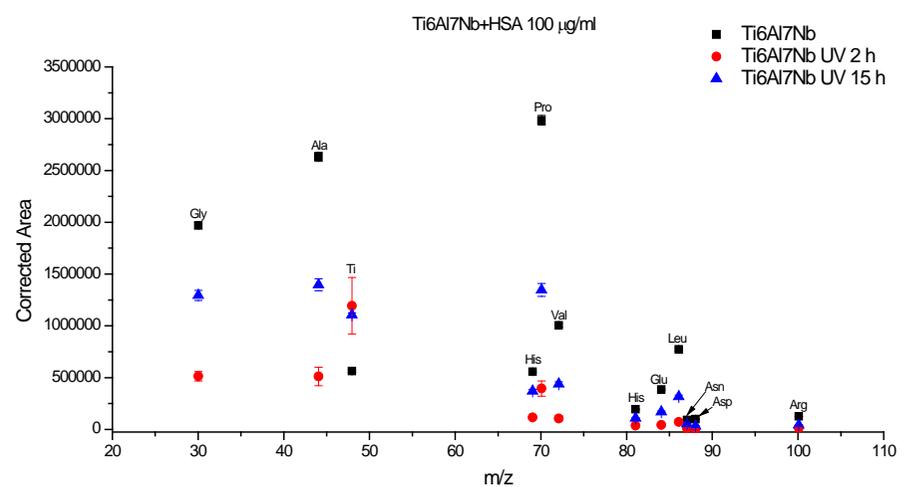
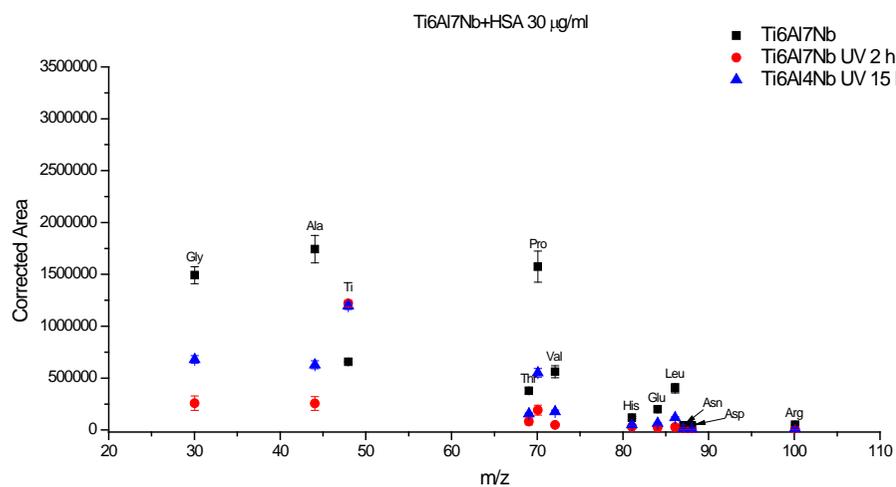
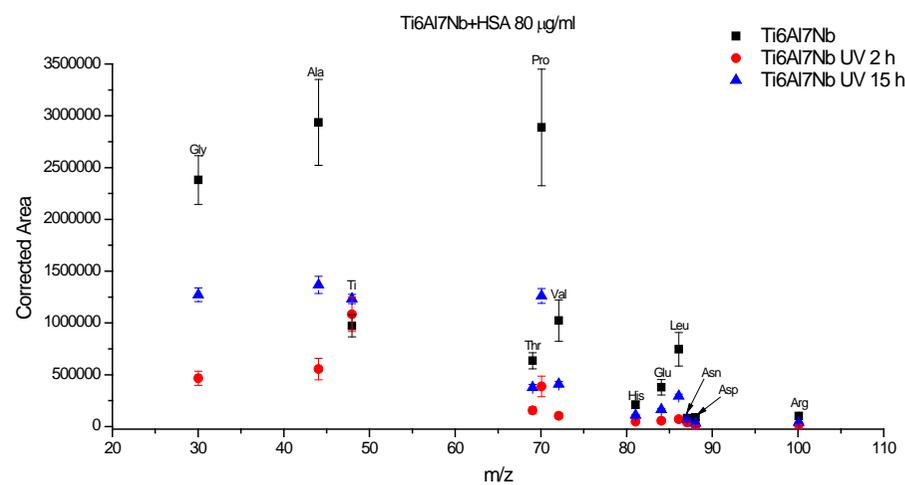
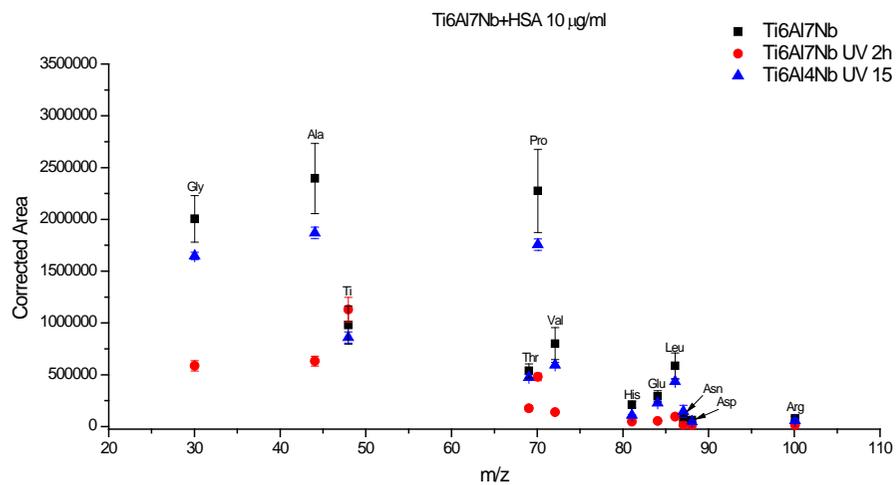


Figura 13. Fragmentos del sustrato y de aminoácidos detectados en las capas de HSA adsorbidas de concentraciones 10, 30, 80 y 100 µg/ml sobre superficies de Ti6Al7Nb con distintos grados de hidrofobicidad.

La evaluación de la cantidad adsorbida de cada proteína en función de la concentración para cada uno de los sustratos se realizó calculando la relación entre la intensidad de uno de los aminoácidos característicos de la proteína y el pico característico del sustrato, tal y como se explica en el apartado anterior de este capítulo. En este caso, el aminoácido característico de la proteína seleccionado fue la prolina (Pro, $m/z=70$), ya que es muy abundante en todas las proteínas utilizadas. Al igual que en el apartado anterior, el pico característico del sustrato es el del ion titanio (Ti^+ , $m/z=48$). Los resultados obtenidos para la albúmina y las dos aleaciones de titanio seleccionadas se presentan en las figuras 14 y 15.

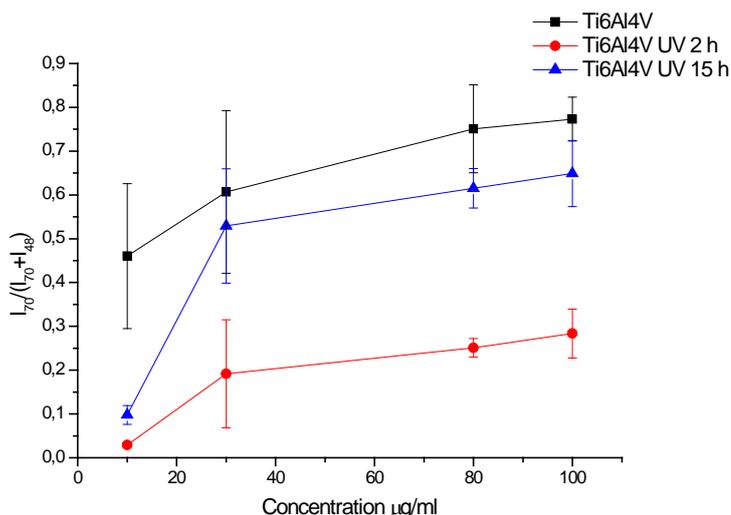


Figura 14. Relación entre la intensidad del fragmento del aminoácido seleccionado (I_{Pro}) y la suma de su intensidad y la intensidad del pico del sustrato (I_{Ti}), representada frente a la concentración de la disolución de HSA para muestras de Ti6Al4V.

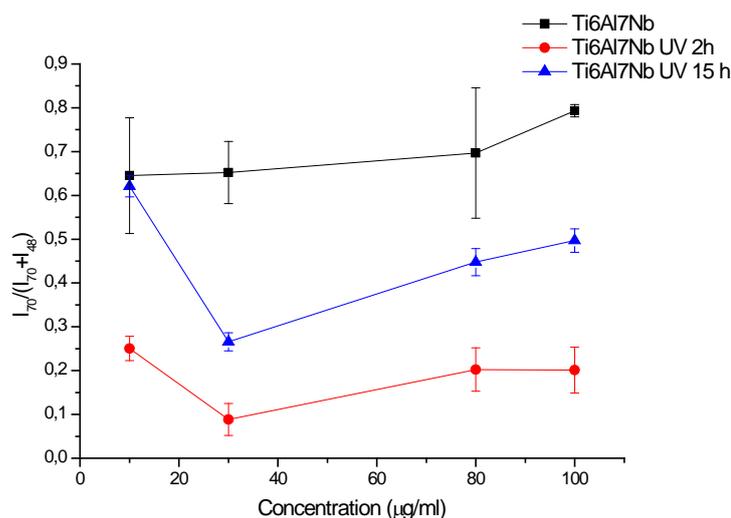


Figura 15. Relación entre la intensidad del fragmento del aminoácido seleccionado (I_{Pro}) y la suma de su intensidad y la intensidad del pico del sustrato (I_{Ti}), representada frente a la concentración de la disolución de HSA para muestras de Ti6Al7Nb.

En relación al tratamiento con luz UV-C al que son sometidas las aleaciones de titanio, en las figuras 14 y 15 se puede observar que para ambas aleaciones hay una mayor adsorción de proteína en las superficies sin tratar. La obtención de estos resultados tras el cálculo de las intensidades normalizadas corrobora lo mostrado en las figuras 12 y 13.

Para la adsorción de HSA sobre la superficie del Ti6Al4V se aprecia en la figura 14 que las tres condiciones del sustrato para el Ti6Al4V muestran una tendencia creciente de la adsorción de proteína con respecto a la concentración de la disolución, que es un comportamiento habitual en estos procesos (Schmidt D.R., *et al.* 2009). Del mismo modo que se puede observar en la figura 12, esta representación muestra que la adsorción sobre las superficies irradiadas con luz UV-C es inferior que sobre la no irradiada, especialmente para las superficies tratadas durante dos horas. Sin embargo, la adsorción sobre las superficies irradiadas durante 15 horas es claramente inferior a la de la muestra no irradiada solo para la concentración de 10 µg/ml. Por encima de esta concentración, la adsorción sobre esta superficie es muy próxima a la que ocurre sobre la superficie no irradiada, teniendo en cuenta los errores experimentales para estas medidas.

Otros autores también han probado un comportamiento similar de la adsorción de HSA sobre superficies con distinta hidrofobicidad, es decir mayor adsorción sobre la superficie hidrófoba que sobre la hidrófila, como por ejemplo en el estudio en superficies de policarbonato llevado a cabo por M. Henry *et al.* (Henry, M. *et al.* 2003). Sin embargo, resulta llamativa la diferencia encontrada en el comportamiento de la adsorción en superficies irradiadas durante 2 horas y 15 horas, ya que aunque ambos tratamientos provocan la misma hidrofiliación de la superficie, la cantidad adsorbida sobre cada una de ellas son significativamente diferentes.

En el caso de la aleación Ti6Al7Nb (figura 15) la tendencia creciente de la cantidad adsorbida con la concentración de proteína en la disolución no es tan evidente como para la aleación Ti6Al4V, excepto para la concentración 10 µg/ml, que provoca una adsorción sobre la superficie mayor o al menos igual que la que corresponde a la concentración de 30 µg/ml. Al igual que para la aleación Ti6Al4V, para la Ti6Al7Nb la adsorción sobre las superficies irradiadas es menor que sobre las no irradiadas, pero en contraste con la anterior, el comportamiento de la muestra irradiada durante 15 h aparece más claramente diferenciado entre el de la no irradiada y el de la irradiada durante 2 horas.

En general y dentro de la incertidumbre experimental, la cantidad adsorbida sobre ambas aleaciones sin ser irradiadas o irradiadas durante 2 horas, alcanza el mismo valor para concentraciones altas, en las que es probable que el recubrimiento de proteína sobre la superficie sea lo suficientemente elevado como para enmascarar la influencia de la diferente composición de ambas aleaciones en la adsorción de HSA. Sin embargo, cuando el tiempo de irradiación es de 15 horas, incluso a concentraciones altas, aparecen diferencias frente a la adsorción entre ambas aleaciones, siendo mayor la adsorción sobre Ti6Al4V que sobre Ti6Al7Nb. Este comportamiento parece indicar que la modificación que se induce sobre estas superficies tras un periodo prolongado de irradiación es lo suficientemente importante como para provocar diferencias en la adsorción, como consecuencia de la distinta composición del sustrato, incluso aunque el recubrimiento de HSA sobre esas superficies sea elevado.

En el otro extremo, para la concentración más baja de las estudiadas 10 µg/ml, y para cualquier tratamiento, se favorece la adsorción sobre la aleación de Ti6Al7Nb frente a la que tiene lugar sobre Ti6Al4V, aunque este comportamiento se invierte al aumentar la concentración para las muestras irradiadas, en cambio, para las superficies no irradiadas, la adsorción parece saturarse mucho más rápidamente sobre la muestra Ti6Al7Nb que sobre la superficie Ti6Al4V.

La adsorción de Fng se realizó sobre las mismas superficies y con los mismos tratamientos que se emplearon para la adsorción de HSA. Los fragmentos de aminoácidos para la capa de fibrinógeno adsorbida en las superficies con distintos tratamientos se representan en las figuras 16 y 17. A diferencia de lo que sucede con el HSA, el tratamiento de la superficie no parece influir tan intensamente sobre la cantidad de Fng adsorbido, sobre todo para el caso de la aleación Ti6Al4V, para la que la adsorción sobre la superficie sin tratar coincide con la de las probetas irradiadas durante 15 h, y también para la concentración de 100 µg/ml adsorbida sobre Ti6Al7Nb. El resto de concentraciones adsorbidas sobre la aleación Ti6Al7Nb siguen un comportamiento similar al del HSA. En cualquier caso, del mismo modo que ocurre con la adsorción de HSA, la condición para obtener la mínima adsorción sobre estas aleaciones es irradiarlas con luz UV-C durante 2 h. También en estos análisis se encontró que en general la intensidad del pico del ion titanio era en general, mayor para la muestra irradiada 2 h que para la muestra no irradiada, aunque las diferencias son menores que cuando se analizaron las muestras con HSA adsorbido, probablemente debido al tamaño de las dos proteínas y el diferente recubrimiento que pueden estar provocando.

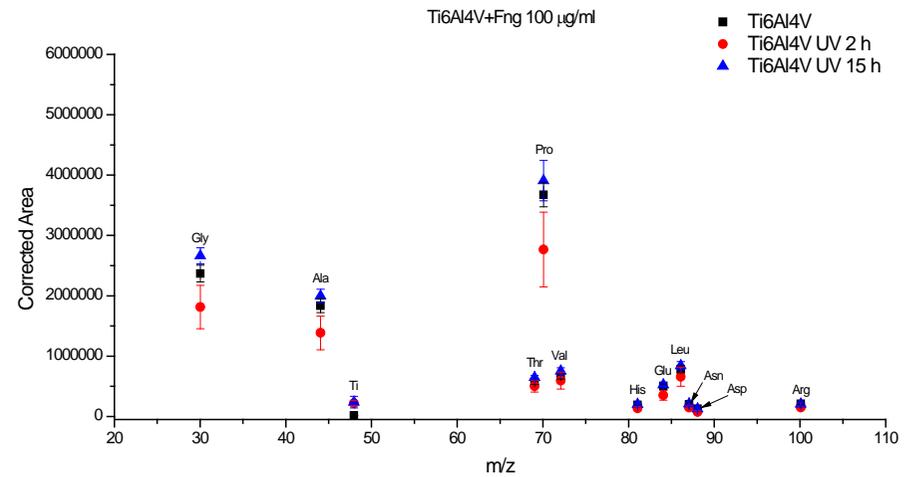
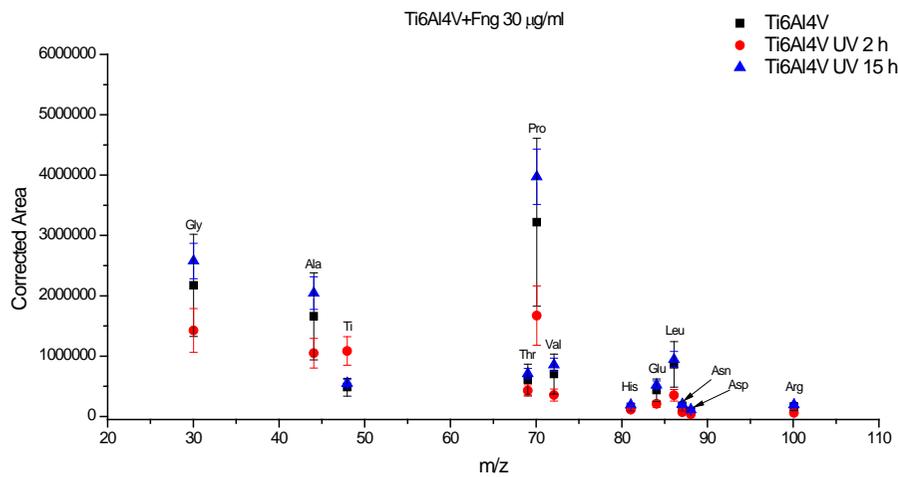
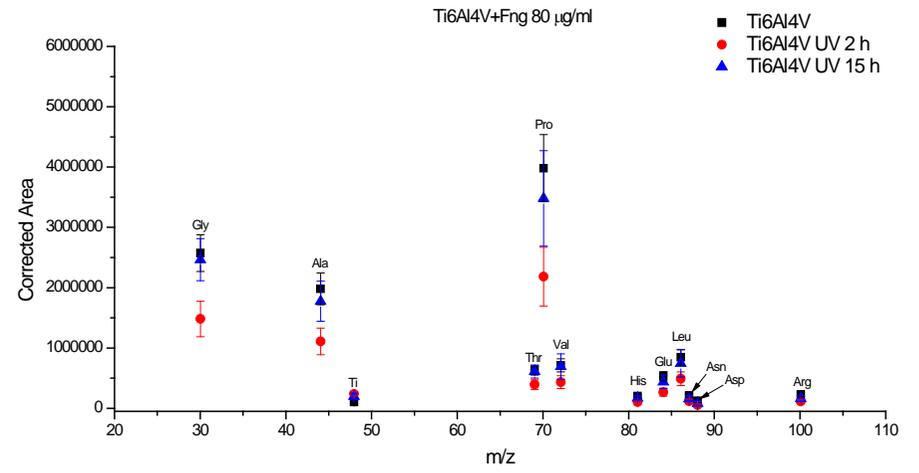
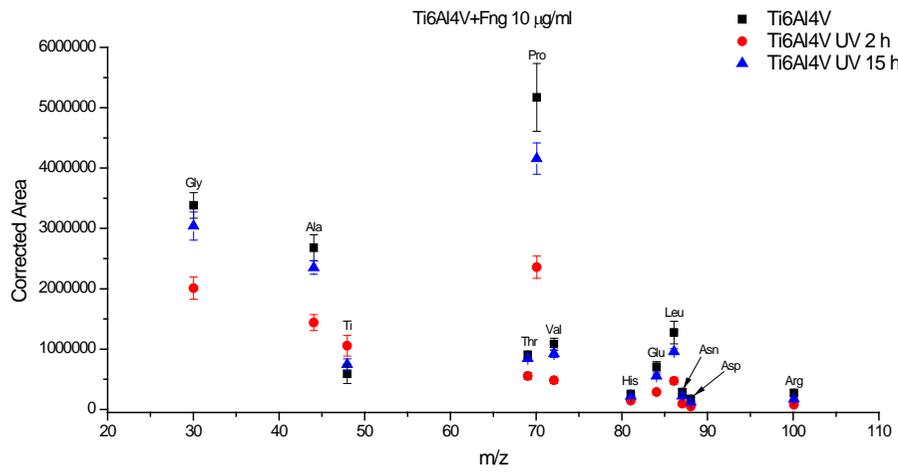


Figura 16. Fragmentos característicos del sustrato y de aminoácidos en las capas de Fng de concentraciones 10, 30, 80 y 100 µg/ml sobre superficies de Ti6Al4V con distintos grados de hidrofobicidad.

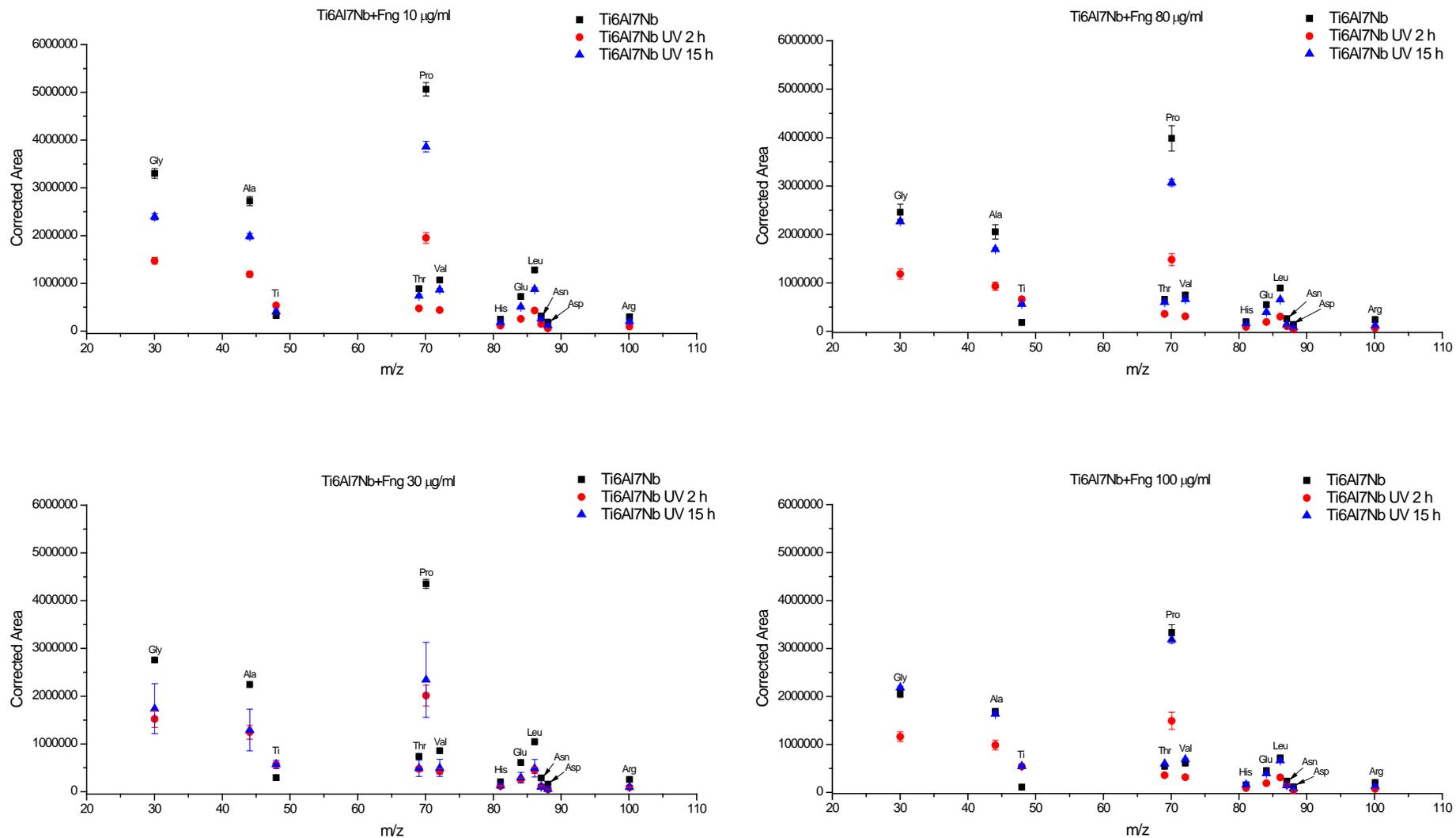


Figura 17. Fragmentos característicos del sustrato y de aminoácidos en las capas de Fng de concentraciones 10, 30, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre superficies de Ti6Al7Nb con distintos grados de hidrofobicidad.

Para poder comparar los resultados del análisis de las capas de fibrinógeno adsorbidas en función de la concentración se realizó el cálculo de la relación entre la intensidad del pico correspondiente a la prolina, como aminoácido característico de la proteína y el pico del titanio, tal y como se llevó a cabo para el caso de la adsorción de HSA. Estos resultados se muestran en la figura 18 para la capa de Fng adsorbido sobre la aleación Ti6Al4V y en la figura 19 para la aleación Ti6Al7Nb.

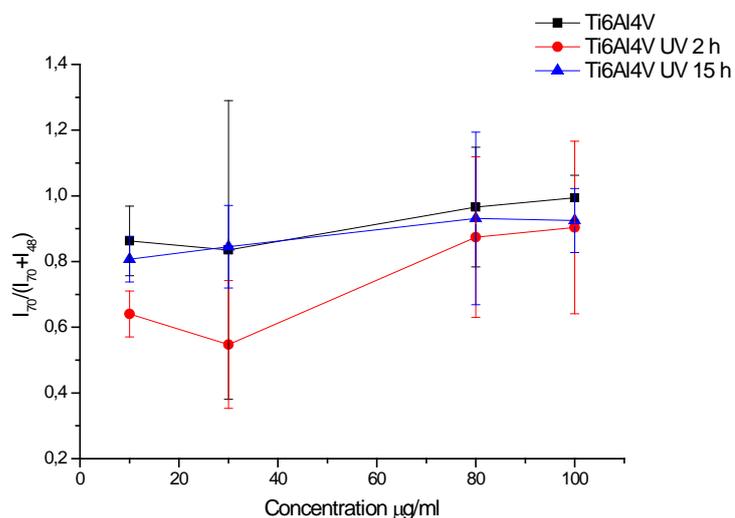


Figura 18. Relación entre la intensidad del fragmento del aminoácido seleccionado (I_{Pro}) y la suma de su intensidad y la intensidad del pico del sustrato (I_{Ti}), representada frente a la concentración de la disolución de Fng para muestras de Ti6Al4V.

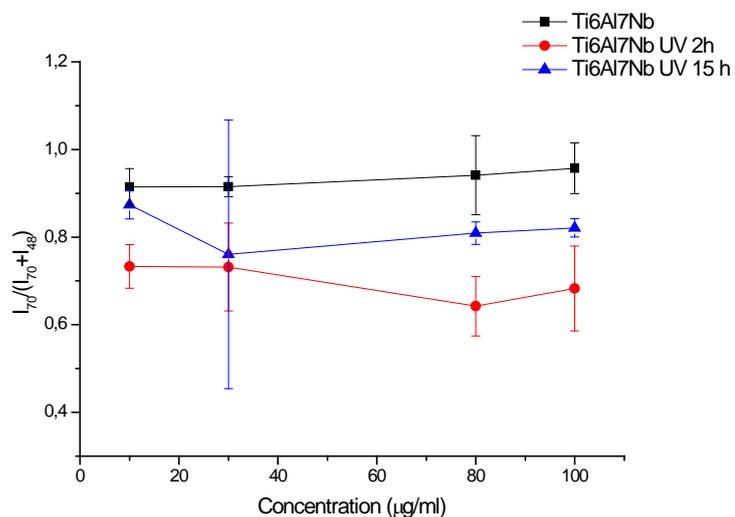


Figura 19. Relación entre la intensidad del fragmento del aminoácido seleccionado (I_{Pro}) y la suma de su intensidad y la intensidad del pico del sustrato (I_{Ti}), representada frente a la concentración de la disolución de Fng para muestras de Ti6Al7Nb.

En la figura 18 se puede observar, teniendo en cuenta los errores obtenidos tras el análisis de la capa de Fng adsorbida sobre Ti6Al4V, que la cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie no tratada y la irradiada durante 15 horas coincide para todas las concentraciones. Este resultado indica que la capa adsorbida se satura ya desde las concentraciones más bajas, no viéndose afectada por el cambio en la superficie que se haya podido producir por la irradiación durante 15 horas. En cambio, la adsorción sobre la superficie irradiada durante 2 horas sí parece sensible a las diferencias de concentración, siendo menor en las concentraciones más bajas estudiadas que en las más altas. Además, aunque para las concentraciones elevadas no es posible distinguir entre la adsorción en superficies con diferentes tratamientos superficiales, a concentraciones bajas la adsorción sobre la muestra irradiada 2h con luz UV-C es menor que sobre la muestra no tratada o la irradiada 15 h, del mismo modo que ocurre en la adsorción de HSA.

Para el caso del Ti6Al7Nb la cantidad de Fng adsorbido, en las tres condiciones del sustrato, alcanza el valor máximo incluso para la concentración más baja estudiada. Sin embargo, del mismo modo que cuando se trata de la adsorción de HSA, para cada concentración la adsorción sobre la muestra no irradiada es mayor que sobre las hidrófilas, siendo más alta la adsorción sobre la muestra irradiada 15 h que sobre la irradiada 2 h, aunque para las concentraciones de 30 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ algunos resultados se superponen debido al error experimental.

También como en el caso de la adsorción de HSA, la adsorción parece favorecerse sobre la superficie de Ti6Al7Nb frente a la de Ti6Al4V, aunque para esta proteína esta tendencia no aparece tan clara debido a la mayor incertidumbre que se tiene con los resultados de la adsorción de esta proteína.

A la vista de los resultados obtenidos para la adsorción de fibrinógeno sobre las superficies de ambas aleaciones, y puesto que aquellos resultados sobre la aleación Ti6Al4V parecen mostrar más selectividad respecto de la concentración de proteínas que sobre Ti6Al7Nb, se realizaron experimentos de adsorción de fibronectina en superficies de la aleación de Ti6Al4V. La figura 20, que muestra los fragmentos de aminoácidos para la capa de fibronectina adsorbida en las superficies con distintos tratamientos, indica un comportamiento similar para las concentraciones altas al que se obtuvo en la adsorción de las otras proteínas, es decir, en general la adsorción es menor en la superficie irradiada 2 horas que en las otras condiciones para la superficie.

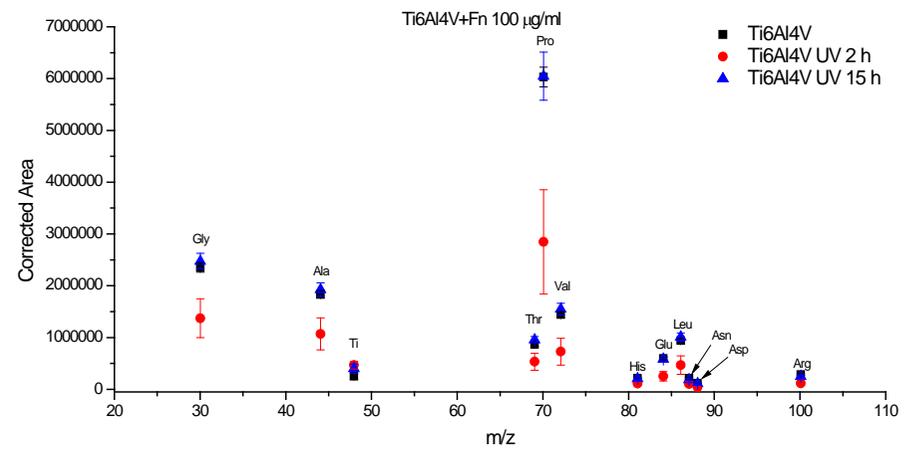
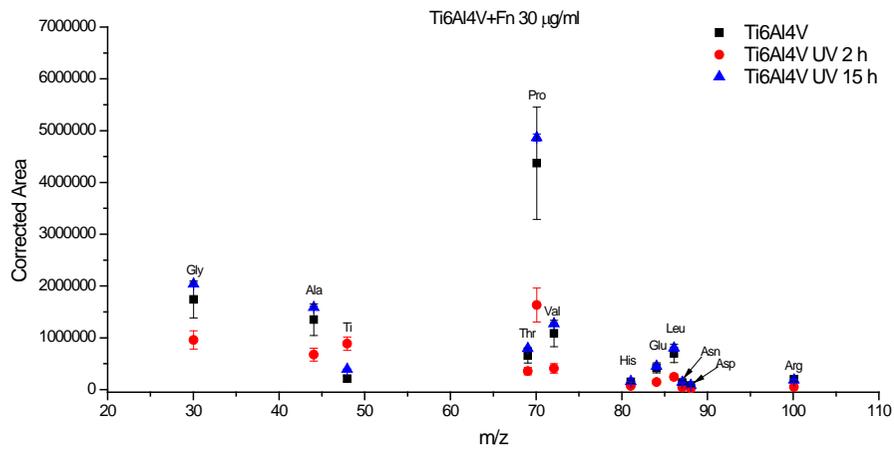
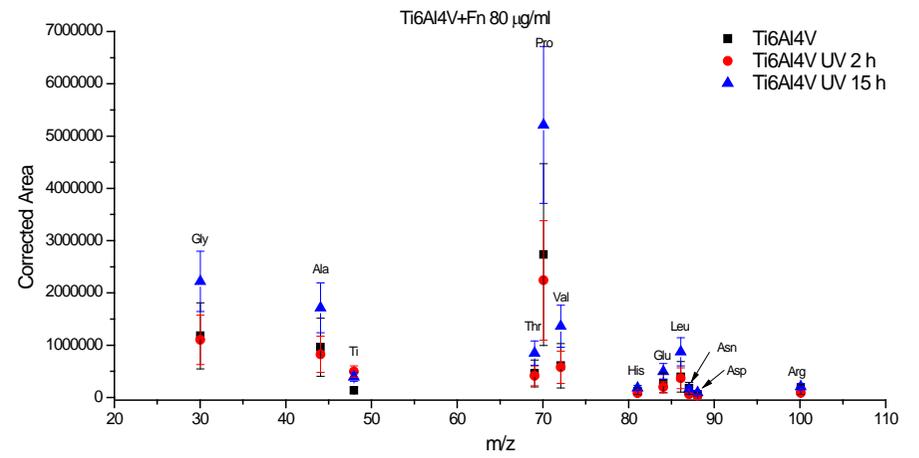
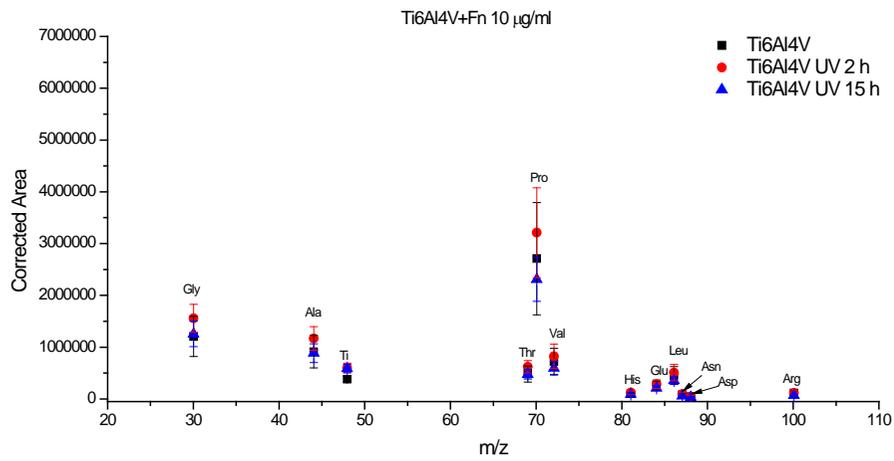


Figura 20. Fragmentos característicos del sustrato y de aminoácidos en las capas de Fn de concentraciones 10, 30, 80 y 100 µg/ml sobre superficies de Ti6Al4V con distintos grados de hidrofobicidad.

Asimismo, la evaluación de la adsorción de la Fn en función de la concentración sobre cada uno de los sustratos realizada normalizando el pico de la prolina con respecto al del Ti (Fig. 21), arroja unos resultados muy similares a los obtenidos para el Fng, aunque para esta proteína no es posible establecer diferencias entre concentraciones o tratamiento, debido a la dispersión experimental.

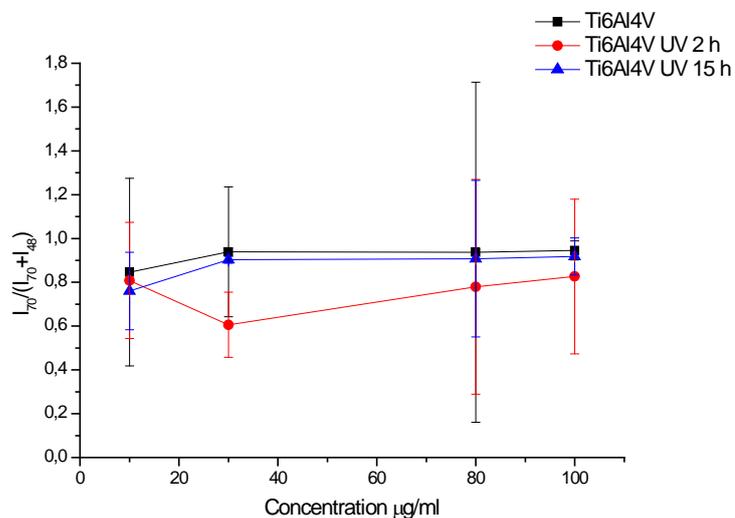


Figura 21. Relación entre la intensidad del fragmento del aminoácido seleccionado (I_{pro}) y la suma de su intensidad y la intensidad del pico del sustrato (I_{Ti}), representada frente a la concentración de la disolución de Fn para muestras de Ti6Al4V.

Con el fin de poder comparar los resultados de las tres proteínas se utilizó el cálculo mediante PCA en los datos de las capas absorbidas de 30 µg/ml de concentración sobre superficies de la aleación Ti6Al4V sin tratamiento para modificar su hidrofobicidad. En la figura 22 se presenta el gráfico de las puntuaciones obtenidas tras la aplicación del análisis mediante PCA para HSA, Fng y Fn. En esta representación la PC1 representa el 95% de la varianza de los datos, mientras que PC2 el 4%. Se puede observar como claramente la primera componente separa la proteína HSA (representada en azul en el gráfico) del Fng (representada en rojo) y la Fn (representada en verde), que arrojan unos resultados bastante parecidos entre sí. Este hecho podría estar relacionado con el tamaño de las proteínas, ya que el HSA es una proteína muy pequeña y el Fng y la Fn son proteínas con un tamaño mucho mayor (datos aportados en el apartado de introducción de este capítulo). Por norma general se sabe que el tamaño de la proteína influye en la adsorción de las mismas, ya que afecta a la velocidad de difusión. Además, las proteínas más grandes suelen tener más sitios de unión para la interacción sobre la superficie del material (Schmidt D.R., *et al.* 2009). Por este motivo de las proteínas con un tamaño más parecido se obtienen unos resultados similares en cuanto a la adsorción en una misma superficie.

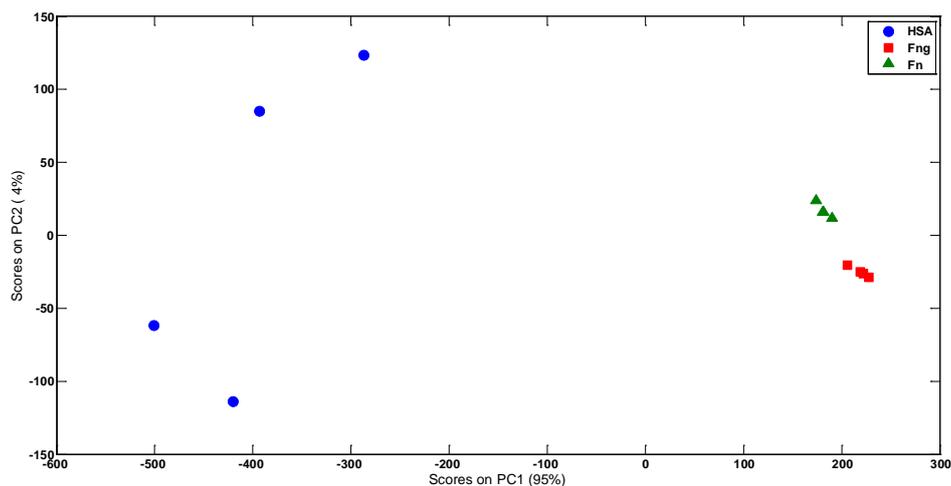


Figura 22. Resultados obtenidos mediante PCA para capas de HSA, Fng y Fn adsorbidas sobre superficies de la aleación Ti6Al4V.

4.3.2.1. Caracterización mediante XPS de la capa de HSA y Fng adsorbida sobre superficies de Ti6Al4V

La caracterización de las superficies de la aleación Ti6Al4V cubiertas con una capa de proteína adsorbida se realizó mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) con el fin de corroborar los resultados obtenidos mediante TOF-SIMS. En la figura 23 se muestra el espectro XPS de una probeta de Ti6Al4V sin capa de proteína adsorbida y el de otra probeta de Ti6Al4V con capa de HSA de 100 µg/ml adsorbida. La composición superficial de la aleación Ti6Al4V, tal y como se puede observar en el espectro de la figura 23, es oxígeno (38,2%), titanio (14,1%), carbono (43,8%), un pequeño porcentaje de aluminio (3,0%), vanadio (0,2%) y nitrógeno (0,6%). El análisis mediante XPS de esta aleación está ampliamente detallado en el apartado 3.3.1 del capítulo anterior de esta tesis. La existencia de la capa de proteína adsorbida sobre la superficie de la aleación de titanio se puede confirmar con el aumento en la intensidad del pico del N1s recogido en el espectro de esta muestra (Fig. 23), ya que el nitrógeno es un elemento presente en la proteína y en muy pequeña proporción en la aleación. Además de la presencia de la proteína, en dicho espectro siguen presentes los componentes de la aleación Ti6Al4V, lo que puede sugerir que la capa de proteína adsorbida no es del todo homogénea o lo suficientemente gruesa como para que no se detecten estos elementos. Tras la adsorción de la capa de proteína, la composición de la superficie es muy similar independientemente de la concentración de la disolución de proteínas empleada (Tabla 3). Esta afirmación se puede extender a las dos proteínas analizadas, ya que no presentan cambios significativos en la composición obtenida en la superficie de las muestras, tal y como se puede observar en las tablas 3 y 4. Por este motivo sólo se presentan en forma de espectro los datos obtenidos para la muestra de Ti6Al4V con HSA de 100 µg/ml de concentración y para el resto de muestras analizadas se recogen los datos en las tablas 3 y 4.

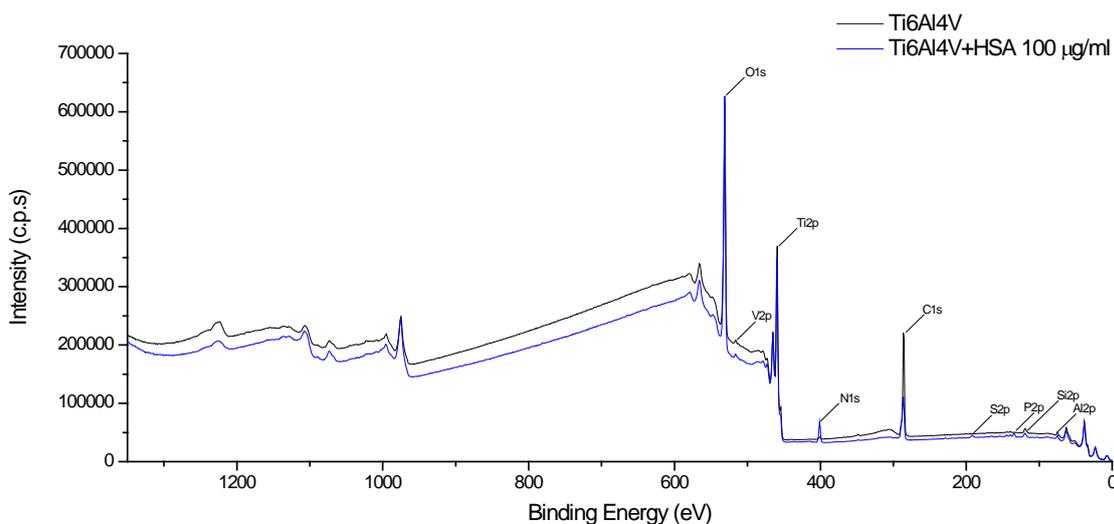


Figura 23. Espectro XPS de la aleación Ti6Al4V y de la misma aleación con capa de proteína adsorbida (Ti6Al4V+HSA 100 µg/ml).

En ambas tablas se presentan los datos de los porcentajes atómicos obtenidos tras el análisis de las capas de HSA y Fng con concentraciones de 10, 30, 80 y 100 µg/ml sobre superficies de Ti6Al4V con y sin tratamiento de luz UV-C. En todas las muestras la composición mayoritaria es oxígeno, carbono, titanio, nitrógeno y aluminio. Además se pueden apreciar pequeñas cantidades de vanadio (presente en la aleación) y fósforo (presente en el PBS). Otros elementos minoritarios como el silicio, azufre y potasio son detectados en la superficie de las muestras y pueden ser el resultado de contaminación ambiental o restos del proceso de pulido.

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis XPS realizados a las muestras de Ti6Al4V, con distinto grado de hidrofobicidad, con capa de HSA adsorbida.

Elementos	Energía de ligadura (eV)	Porcentajes atómicos relativos (%)							
		10 µg/ml		30 µg/ml		80 µg/ml		100 µg/ml	
		Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h	Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h	Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h	Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h
O1s	530,2	47,1	59,4	39,3	52,6	38,0	50,6	48,0	51,8
C1s	285,2	27,5	12,0	37,3	20,6	38,9	23,9	25,2	20,5
Ti2p	458,3	15,8	21,9	13,0	18,9	11,9	17,1	16,6	18,5
N1s	400,0	5,1	1,0	6,4	2,7	6,8	4,2	5,5	3,7
Al2p	73,9	2,9	3,5	2,3	3,1	2,2	2,3	2,8	3,2
P2p	133,3	1,0	1,1	1,1	2,7	1,4	1,0	1,1	0,8
V2p	514,9	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
S2p	164,2	0,2	0	0,3	0	0,4	0	0,3	0
Si2p	101,5	0	0,7	0	0,7	0	0,8	0,3	1,2

Tabla 4. Resultados obtenidos del análisis XPS realizados a las muestras de Ti6Al4V, con distinto grado de hidrofobicidad, con capa de Fng adsorbida.

Elementos	Energía de ligadura (eV)	Porcentajes atómicos relativos (%)							
		10 µg/ml		30 µg/ml		80 µg/ml		100 µg/ml	
		Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h	Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h	Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h	Ti6Al4V	Ti6Al4V UV 15 h
O1s	530,2	43,9	48,3	31,3	51,0	34,5	50,5	39,3	38,6
C1s	285,2	29,0	24,4	47,6	21,5	43,2	21,8	36,6	37,0
Ti2p	458,3	13,5	16,3	8,0	18,0	9,8	17,5	10,9	10,9
N1s	400,0	7,3	5,8	10,0	4,0	9,4	5,0	9,3	9,8
Al2p	73,9	2,5	2,7	1,8	3,3	1,8	3,0	2	2,1
Na1s	1071,3	1,6	0	0	0	0	0	0	0
P2p	133,2	1,5	1,3	0,9	1,4	0,9	1,3	1,4	0,6
V2p	514,9	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0
Si2p	101,5	0,3	0,8	0	0,9	0	0,7	0,4	0,7
K2p	292,6	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0
S2p	164,2	0	0	0,4	0	0,4	0	0,3	0,3

Una vez confirmada la presencia de la proteína sobre la superficie de la aleación mediante el aumento del pico del N1s, es posible estudiar el comportamiento de la misma mediante la deconvolución de los picos de alta resolución del N1s y C1s. Estos picos analizados para las dos proteínas, para todas las concentraciones y para las superficies con distinto grado de hidrofobicidad presentan las mismas contribuciones. Por este motivo solamente se muestran, a continuación, los picos C1s y N1s obtenidos en la superficie de la muestra Ti6Al4V+HSA 100 µg/ml como ejemplo del resto de picos analizados.

El análisis del pico del C1s (Fig. 24), obtenido de la superficie de las muestras con capa de proteína adsorbida, mediante deconvolución da como resultado tres picos. El primero de ellos está asociado a los hidrocarburos (C-C, C-H, 285,1 eV), el segundo está relacionado con los enlaces C-O y C-N (286,4 eV) y el último, con el grupo amida existente en la proteína (N-C=O, 288,3 eV). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por C.D. Tidwell *et al.* (Tidwell, C.D. *et al.* 2001) en sus estudios realizados con albúmina y fibronectina sobre diferentes superficies.

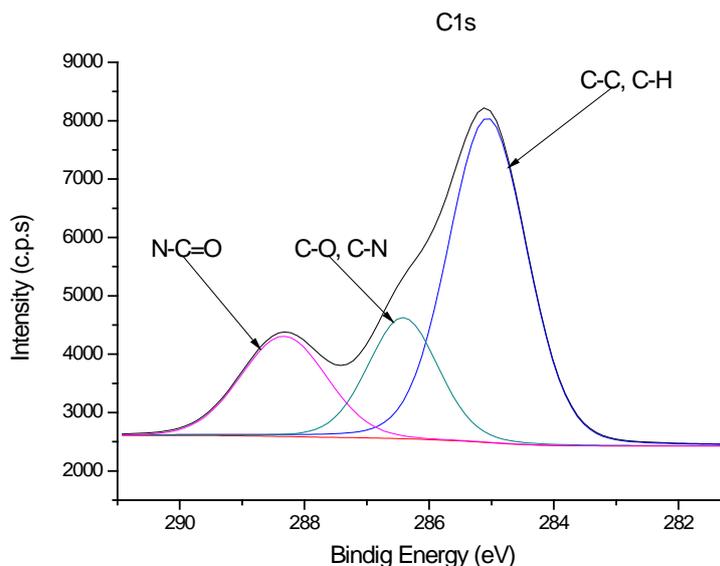


Figura 24. Deconvolución del pico del C1s obtenido en la superficie de las probetas de Ti6Al4V+HSA 100 µg/ml.

El pico del N1s de las muestras de la aleación de titanio con capa de proteína adsorbida, tras su análisis mediante deconvolución muestra dos enlaces para el nitrógeno (Fig. 25). El pico principal corresponde al nitrógeno en grupos amida y amina no protonada (NH_2) y tiene una energía de enlace de 400,1 eV. El pico que aporta a la deconvolución una menor contribución está relacionado con la protonación del grupo amina (NH_3^+) y le corresponde una energía de enlace de 401,8 eV (Shchukarev, A. *et al.* 2017).

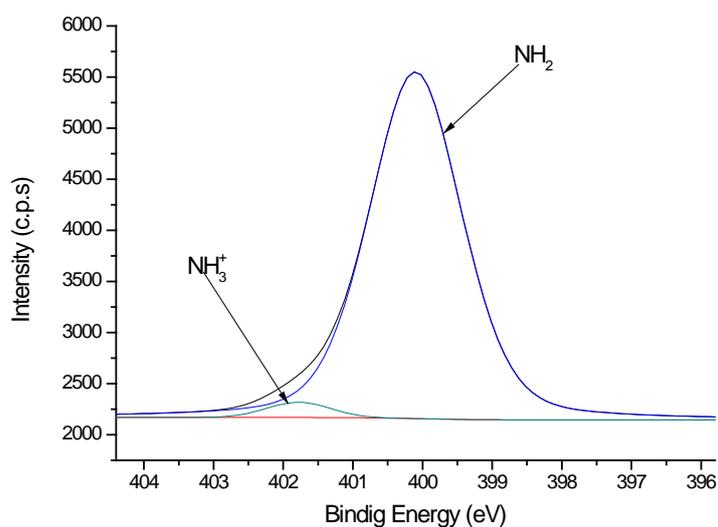


Figura 25. Deconvolución del pico del N1s obtenido en la superficie de las probetas de Ti6Al4V+HSA 100 µg/ml.

Para poder estimar la cantidad de proteína adsorbida con distinta concentración en cada uno de los sustratos se puede utilizar el porcentaje atómico de nitrógeno obtenido en el análisis de la superficie de cada una de las muestras (datos presentados en las tablas 3 y 4). Ya que la cuantificación que se obtiene mediante el análisis XPS es relativa a cada superficie, se calculó la relación nitrógeno-carbono para cada una de las condiciones estudiadas y estos resultados se recogen en la tabla 5. En ella se observa que sólo existen diferencias significativas en la absorción de HSA de concentración 10 µg/ml para la superficie de la aleación tratada con luz UV-C y sin tratar. La cantidad de N detectada en estas muestras sugiere una menor adsorción en la superficie irradiada durante 15 h que en la superficie que no ha sido sometida a ningún tratamiento para modificar su hidrofobicidad. El resto de resultados obtenidos no presenta diferencias significativas para el tratamiento del sustrato y para la concentración de proteína empleada.

Tabla 5. Relación entre los porcentajes atómicos del pico del N1s y del C1s obtenidos en las superficies de la aleación de Ti6Al4V con capas de HSA y Fng adsorbidas a distinta concentración.

Muestra	N/C	Muestra	N/C
Ti6Al4V+HSA 10 ug/ml	0,19	Ti6Al4V+Fng 10 ug/ml	0,25
Ti6Al4V(UV)+HSA 10 ug/ml	0,08	Ti6Al4V(UV)+Fng 10 ug/ml	0,24
Ti6Al4V+HSA 30 ug/ml	0,17	Ti6Al4V+Fng 30 ug/ml	0,21
Ti6Al4V(UV)+HSA 30 ug/ml	0,13	Ti6Al4V(UV)+Fng 30 ug/ml	0,19
Ti6Al4V+HSA 80 ug/ml	0,17	Ti6Al4V+Fng 80 ug/ml	0,22
Ti6Al4V(UV)+HSA 80 ug/ml	0,18	Ti6Al4V(UV)+Fng 80 ug/ml	0,23
Ti6Al4V+HSA 100 ug/ml	0,22	Ti6Al4V+Fng 100 ug/ml	0,25
Ti6Al4V(UV)+HSA 100 ug/ml	0,18	Ti6Al4V(UV)+Fng 100 ug/ml	0,26

4.3.3. Evaluación de la adsorción competitiva de proteínas

Además del estudio de la adsorción de una única proteína sobre las aleaciones de titanio presentado en el apartado anterior de este capítulo, se evaluó la adsorción de la mezcla de esas mismas proteínas en proporciones variables. En primer lugar se realizó la mezcla de HSA y Fng con distinta proporción de volumen (25:75 y 75:25) para posteriormente realizar la adsorción sobre superficies de Ti6Al4V y Ti6Al7Nb con distintos grados de hidrofobicidad. De los espectros obtenidos tras la adsorción de la mezcla de estas dos proteínas se seleccionaron una serie de picos (Tabla 6) relacionados con los fragmentos de aminoácidos que aparecen en mayor proporción para realizar con ellos el análisis mediante PCA (Bernsmann, F. *et al.*, 2008). En esta tabla también se incluyeron picos relacionados con el sustrato (Ti⁺ y TiO⁺).

Tabla 6. Iones positivos de los fragmentos del sustrato y de los aminoácidos seleccionados para el análisis mediante PCA.

Fragmento Ion	m/z	Fragmento Ion	m/z	Fragmento Ion	m/z	Fragmento Ion	m/z
CH ₄ N ⁺ (Gly)	30,036	C ₄ H ₅ O ⁺ (Thr)	69,038	C ₄ H ₆ NO ⁺ (Glu)	84,051	C ₇ H ₇ O ⁺ (Tyr)	107,056
CH ₃ N ₂ ⁺ (Arg)	43,055	C ₃ H ₄ NO ⁺ (Asn)	70,032	C ₅ H ₁₀ N ⁺ (Lys)	84,090	C ₅ H ₈ N ₃ ⁺ (His)	110,084
C ₂ H ₆ N ⁺ (Ala)	44,052	C ₄ H ₈ N ⁺ (Pro)	70,072	C ₅ H ₁₂ N ⁺ (Leu)	86,107	C ₈ H ₁₀ N ⁺ (Phe)	120,090
CHS ⁺ (Cys)	44,978	C ₃ H ₃ O ₂ ⁺ (Ser)	71,015	C ₃ H ₇ N ₂ O ⁺ (Asn)	87,063	C ₅ H ₁₁ N ₄ ⁺ (Arg)	127,107
Ti ⁺	47,948	C ₄ H ₁₀ N ⁺ (Val)	72,087	C ₃ H ₆ NO ₂ ⁺ (Asp)	88,047	C ₉ H ₈ N ⁺ (Trp)	130,071
C ₃ H ₆ N ⁺ (Lys)	56,051	C ₂ H ₇ N ₃ ⁺ (Arg)	73,068	C ₄ H ₄ NO ₂ ⁺ (Asn)	98,030	C ₉ H ₇ O ⁺ (Phe)	131,044
CH ₃ N ₃ ⁺ (Arg)	59,050	C ₃ H ₈ NO ⁺ (Thr)	74,067	C ₄ H ₁₀ N ₃ ⁺ (Arg)	100,092	C ₉ H ₈ O ⁺ (Phe)	132,056
C ₂ H ₅ S ⁺ (Met)	61,011	C ₄ H ₅ N ₂ ⁺ (His)	81,048	C ₄ H ₁₁ N ₃ ⁺ (Arg)	101,094	C ₈ H ₁₀ NO ⁺ (Tyr)	136,090
TiO ⁺	63,944	C ₄ H ₆ N ₂ ⁺ (His)	82,058	C ₄ H ₈ NO ₂ ⁺ (Glu)	102,064	C ₁₁ H ₈ NO ⁺ (Trp)	170,059
C ₄ H ₆ N ⁺ (Pro)	68,054	C ₅ H ₇ O ⁺ (Val)	83,054	C ₄ H ₁₀ SN ⁺ (Met)	104,059		

Los resultados obtenidos tras el análisis mediante PCA para la mezcla de HSA y Fng con distinta proporción de volumen adsorbida sobre la aleación de Ti6Al4V con distinto grado de hidrofobicidad se muestran en las figuras 26 y 27. Para la mezcla con mayor proporción de Fng (Fig.26) se observa una clara diferencia entre la mezcla de proteínas adsorbida sobre la superficie irradiada durante 2 h (HSA-Fng 25:75 UV 2 h, marcada en rosa en la fig. 26) y entre la adsorbida en superficies no irradiadas (HSA-Fng 25:75, marcada en azul en la fig. 26) e irradiadas durante 15 h (HSA-Fng 25:75 UV 15 h, marcada en verde en la fig. 26). Estas dos últimas condiciones del sustrato arrojan resultados más similares en cuanto a la adsorción de la mezcla HSA-Fng con una proporción de volumen 25:75.

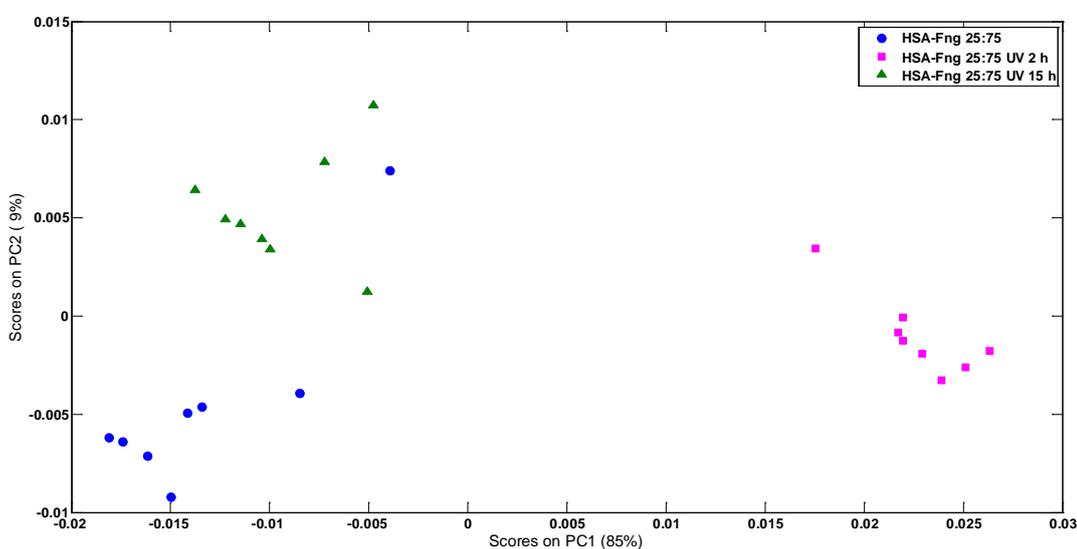


Figura 26. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de la mezcla de HSA y Fng (25:75) adsorbida sobre la aleación Ti6Al4V.

Atendiendo a la mezcla de proteínas con mayor proporción de HSA (Fig. 27), se aprecia que las tres condiciones del sustrato proporcionan resultados diferentes. En este caso, la primera componente representa un 68% de la varianza de todos los datos y la segunda componente el 24%. Para las dos componentes la diferencia entre la capa de mezcla de proteína adsorbida sobre las distintas condiciones del sustrato muestra claras diferencias.

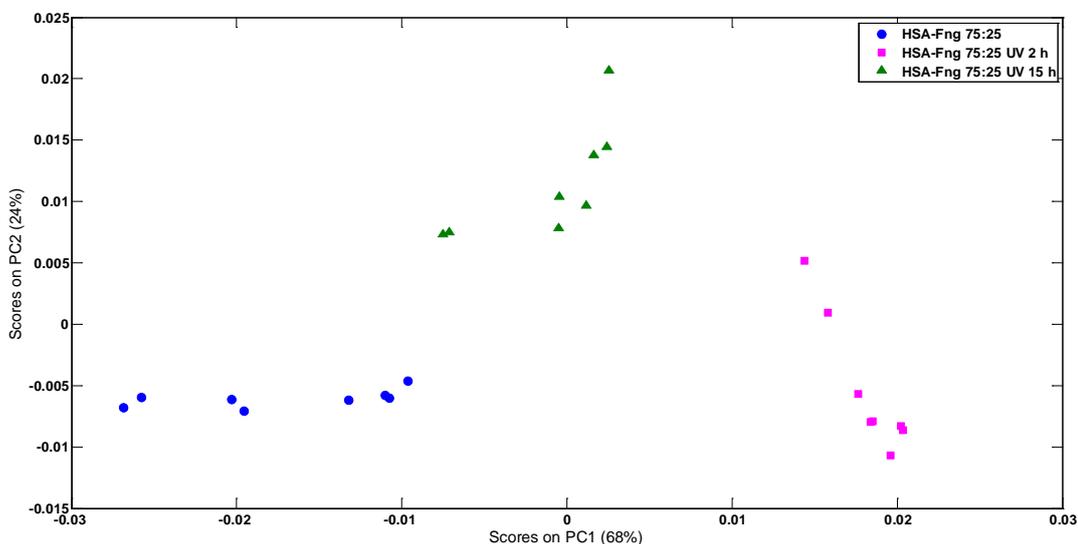


Figura 27. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de la mezcla de HSA y Fng (75:25) adsorbida sobre la aleación Ti6Al4V.

A continuación se presentan los resultados de este mismo análisis, pero clasificados por condición del sustrato (Fig. 28, 29 y 30). Para clarificar estos resultados se incluyeron, en estas representaciones, los datos relativos a cada una de las proteínas adsorbidas de forma individual sobre la superficie de la aleación. Así para las superficies de la aleación Ti6Al4V que no han sido sometidas a ningún tratamiento que modifique su hidrofobicidad se obtiene que las mezclas de proteínas con distinta proporción de volumen se encuentran situadas entre las proteínas adsorbidas de forma individual (Fig. 28). La mezcla de HSA-Fng con mayor proporción de Fng (25:75) está más próxima a los resultados obtenidos para el Fng y la mezcla con mayor cantidad de HSA (75:25) está más próxima al HSA. Por lo tanto, cabe destacar que la técnica de análisis mediante PCA también muestra diferencias entre las mezclas de HSA-Fng con distinta proporción de volumen para una misma condición del sustrato. Resultados similares se obtienen tras el análisis para la mezcla de las dos proteínas adsorbidas sobre las superficies de Ti6Al4V irradiada durante 15 h con luz UV-C (Fig. 30).

Por el contrario, la mezcla de las dos proteínas adsorbidas sobre la aleación Ti6Al4V irradiada con luz UV-C durante 2 h no presenta este comportamiento descrito para las otras dos condiciones del sustrato. En este caso son las proteínas adsorbidas de forma individual las que se encuentran entre las mezclas de proteínas (Fig. 29). Por otro lado, sí que se pueden apreciar diferencias entre la capa de proteínas adsorbida de ambas mezclas con distinta proporción de volumen, siempre que se atiende a la primera componente. Aunque en el caso

de esta condición del sustrato no se puede relacionar el comportamiento de la mezcla de proteínas con la adsorción de las proteínas de forma individual.

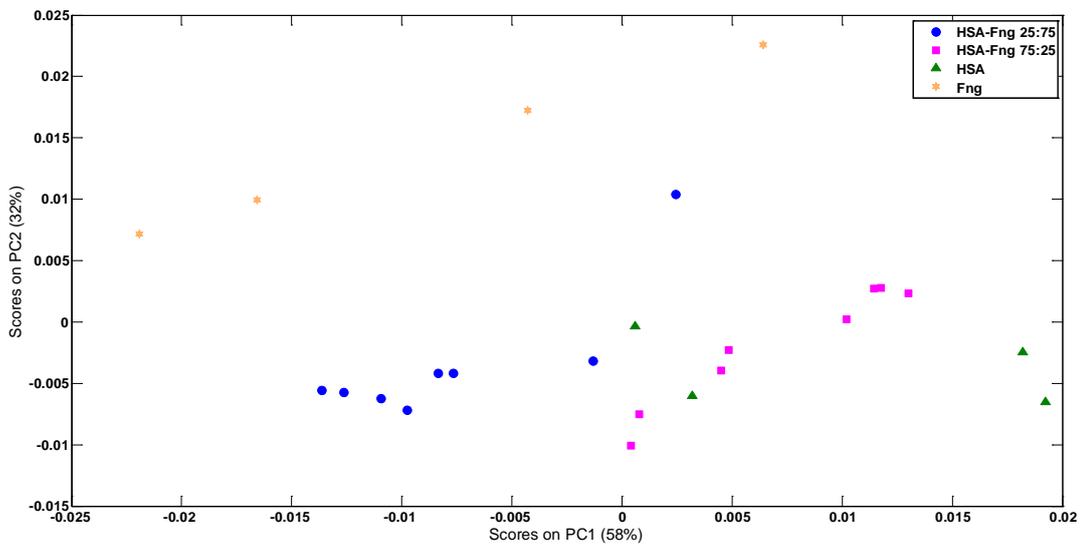


Figura 28. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de las proteínas HSA, Fng y la mezcla de ambas en proporción 25:75 y 75:25 adsorbidas en la aleación Ti6Al4V no irradiado.

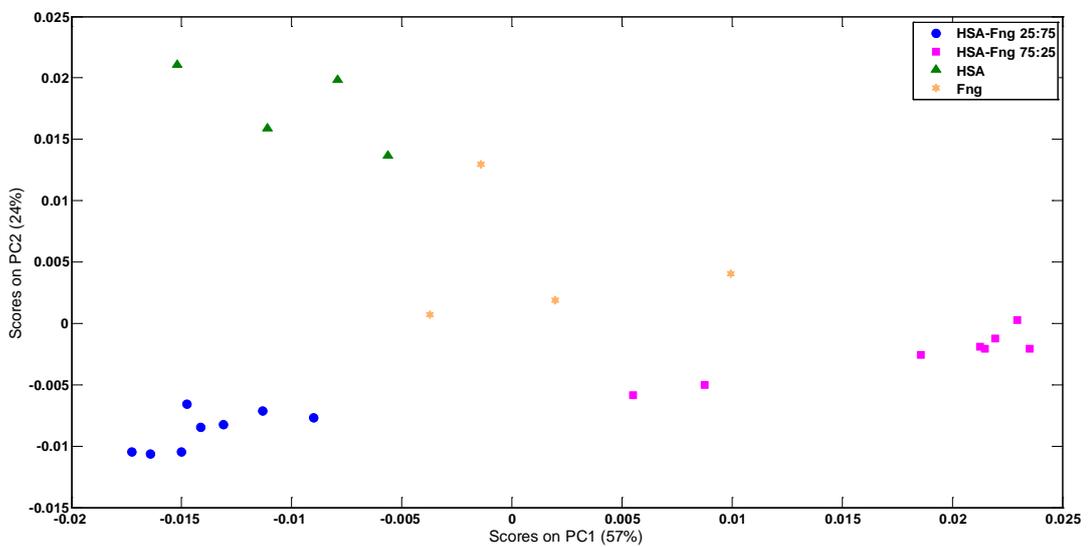


Figura 29. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de las proteínas HSA, Fng y la mezcla de ambas en proporción 25:75 y 75:25 adsorbidas en la aleación Ti6Al4V irradiada durante 2 h.

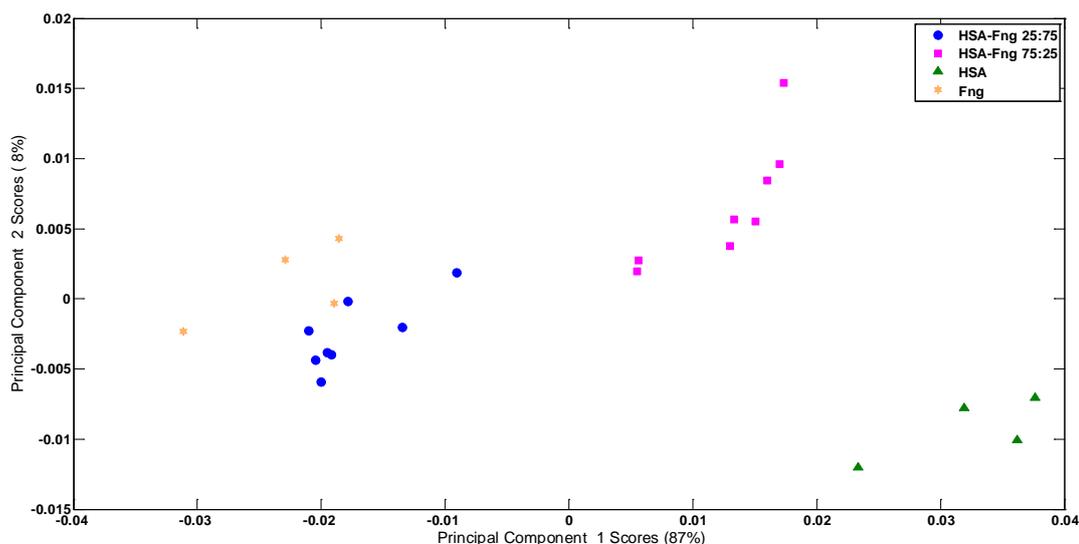


Figura 30. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de las proteínas HSA, Fng y la mezcla de ambas en proporción 25:75 y 75:25 adsorbidas en la aleación Ti6Al4V irradiada durante 15 h.

Tras observar los resultados obtenidos mediante PCA para la mezcla de dos proteínas adsorbidas en la superficie de la aleación de Ti6Al4V no irradiada e irradiada durante 15 h, se puede asumir que la proteína con más proporción de volumen en la disolución es la que se adsorbe primero sobre la superficie. Y por ese motivo sus espectros se asemejan más a los obtenidos en la adsorción de una única proteína. Además, la mezcla de proteínas con mayor proporción de HSA adsorbida en la superficie irradiada con luz UV-C durante 15 h se encuentra situada entre la mezcla con mayor proporción de Fng y el HSA, sin aproximarse más al HSA. Esto puede ser debido a que tras la adsorción inicial de la proteína en mayor proporción de volumen, las moléculas más grandes de Fng desplazan a las más pequeñas de HSA, tal y como predice el efecto Vroman de la adsorción competitiva de proteínas (Vroman, L. y Adams, A. L., 1969) (Hirsh, S. L. *et al.*, 2013).

El mismo estudio realizado para la aleación Ti6Al4V se realizó para la aleación Ti6Al7Nb. Los resultados obtenidos tras el análisis mediante PCA para la mezcla de HSA y Fng con distinta proporción de volumen adsorbida sobre la aleación de Ti6Al7Nb con distinto grado de hidrofobicidad se muestran en las figuras 31 y 32. Para la mezcla con mayor proporción de Fng (Fig.31) se observa una clara diferencia entre la mezcla de proteínas adsorbida sobre la superficie irradiada durante 2 h (HSA-Fng 25:75 UV 2 h) y entre la adsorbida en superficies no irradiadas (HSA-Fng 25:75) e irradiadas durante 15 h (HSA-Fng 25:75 UV 15 h). Estos resultados se asemejan a los obtenidos para la aleación Ti6Al4V con esta misma proporción en la mezcla de proteínas. Atendiendo a la mezcla de proteínas con mayor proporción de HSA (Fig. 32), se aprecia que en este caso las mayores diferencias se encuentran entre la capa de proteínas adsorbida sobre la superficie no irradiada (HSA-Fng 75:25) y la capa de proteínas adsorbidas sobre las dos superficies de la aleación sometidas a tratamiento con luz UV-C (HSA-Fng 75:25 UV 2 h y HSA-Fng 75:25 UV 15 h).

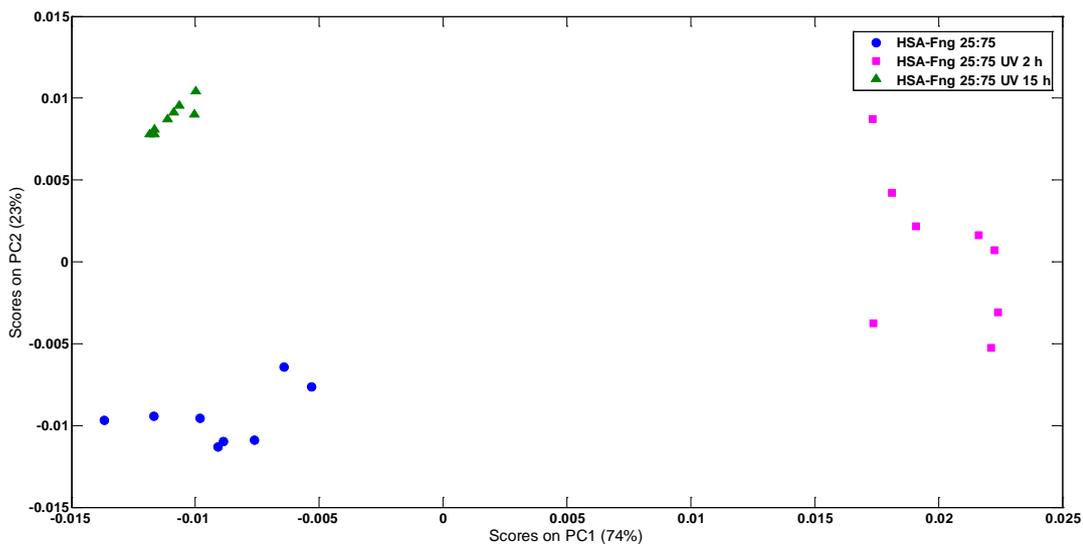


Figura 31. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de la mezcla de HSA-Fng (25:75) adsorbida en la aleación Ti6Al7Nb.

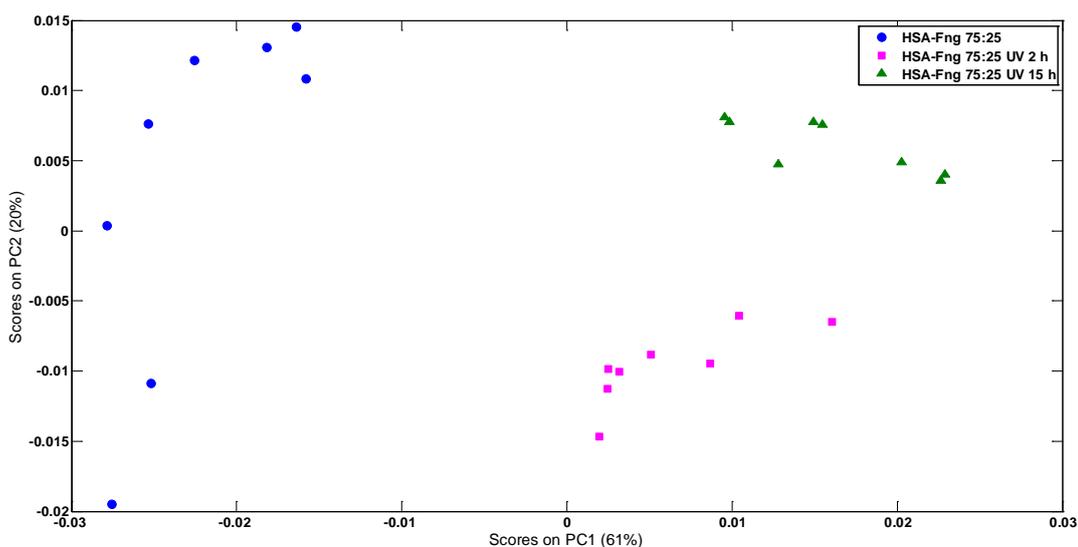


Figura 32. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de la mezcla de HSA-Fng (75:25) adsorbida en la aleación Ti6Al7Nb.

Si clasificamos los resultados obtenidos tras el análisis mediante PCA de la mezcla de HSA-Fng adsorbida sobre la aleación Ti6Al7Nb en función de la condición del sustrato, se obtienen los resultados presentados en las figuras 33, 34 y 35. Para las superficies de la aleación Ti6Al7Nb que no han sido sometidas a tratamiento con luz UV-C, se obtiene que la mezcla de HSA-Fng con mayor proporción de Fng (25:75) se encuentra más próxima a los resultados obtenidos para el Fng y la mezcla con mayor cantidad de HSA (75:25) lo está al HSA (Fig. 33). Al igual que sucede para el caso de la aleación Ti6Al4V, los análisis mediante PCA realizados a las superficies que han sido irradiadas durante 2 h no aportan resultados tan clarificantes como los de las muestras no irradiadas. Para las muestras cuya superficie ha sido sometida al

tratamiento con luz UV-C durante 2 h (Fig. 34), la adsorción de la mezcla de proteínas con distinta proporción de volumen proporciona resultados más similares entre sí que con las proteínas de forma individual.

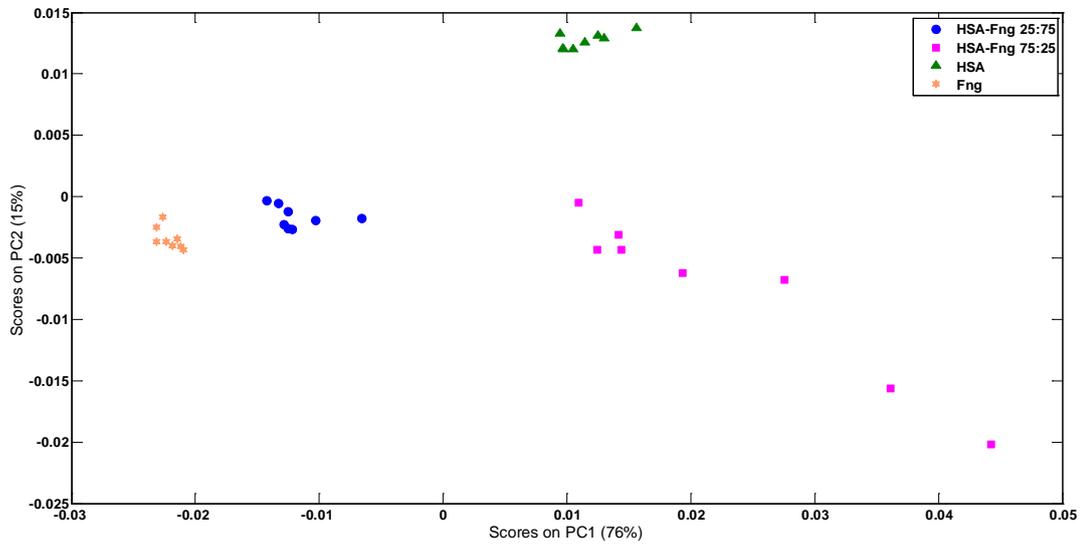


Figura 33. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de las proteínas HSA, Fng y la mezcla de ambas en proporción 25:75 y 75:25 adsorbidas en la aleación Ti6Al7Nb no irradiada.

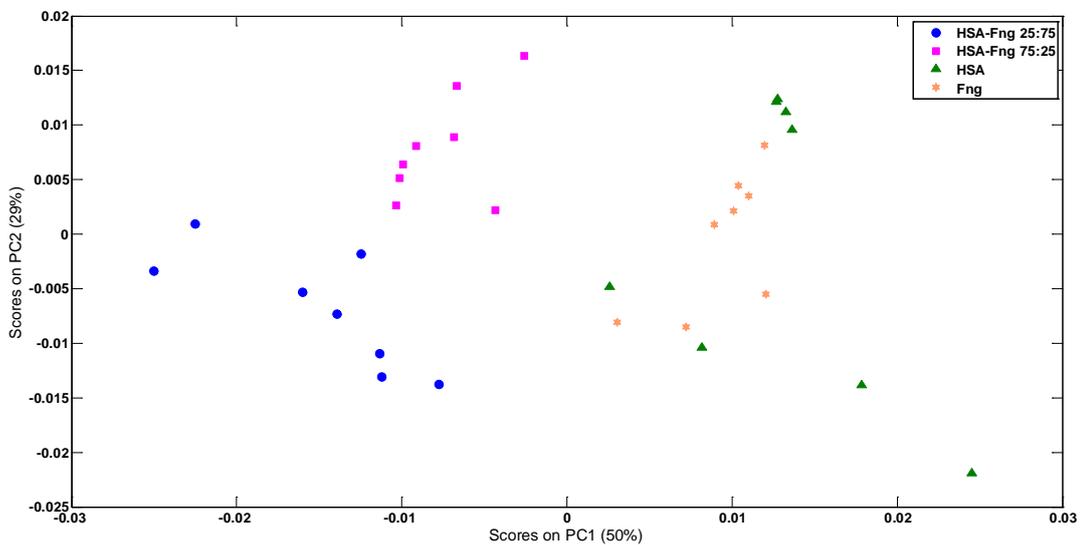


Figura 34. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de las proteínas HSA, Fng y la mezcla de ambas en proporción 25:75 y 75:25 adsorbidas en la aleación Ti6Al7Nb irradiada durante 2 h.

Por último, para el caso de la aleación Ti6Al7Nb cuya superficie ha sido irradiada con luz UV-C durante 15 h, no se observan diferencias significativas entre las mezclas de las proteínas y las proteínas de forma individual (Fig. 35).

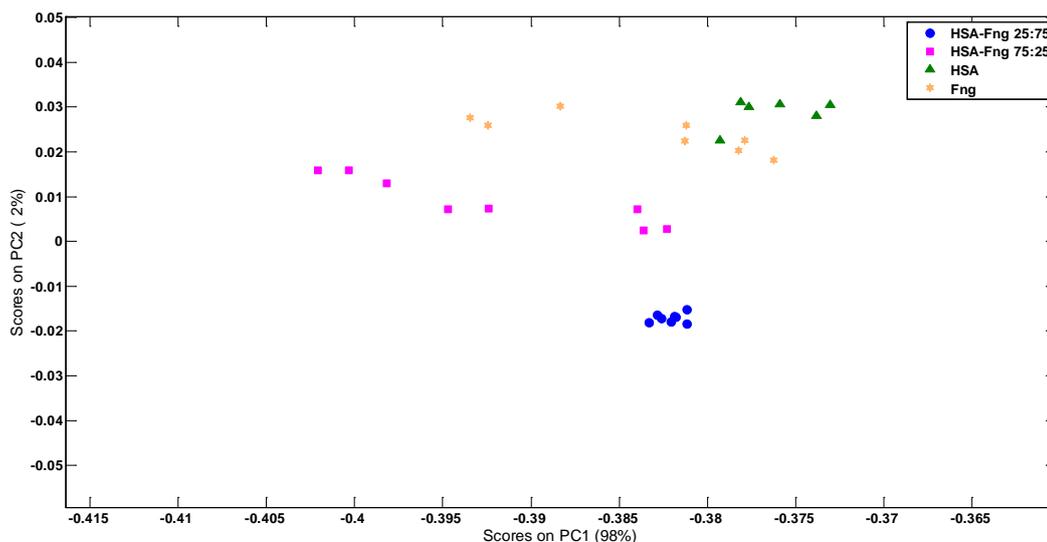


Figura 35. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de las proteínas HSA, Fng y la mezcla de ambas en proporción 25:75 y 75:25 adsorbidas en la aleación Ti6Al7Nb irradiada durante 15 h.

Una vez se observó el comportamiento de la mezcla de HSA y Fng, se realizaron experimentos incluyendo la fibronectina y realizando la adsorción en superficies de Ti6Al4V. Para ello, y como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos experimentales de este capítulo, se realizaron cuatro disoluciones diferentes. La primera disolución se realizó con una mezcla 50:50 entre la disolución de Fn y la disolución de HSA, sin incluir Fng (Disolución 1, Fn-HSA-Fng 50:50:0). La segunda disolución se hizo mezclando el 50% de disolución de Fn y el otro 50% con la mezcla de HSA-Fng con una proporción de volumen 75:25 (Disolución 2). La tercera disolución se elaboró con una mezcla 50:50 entre la disolución de Fn y la mezcla de HSA-Fng con una proporción de volumen entre ellas de 25:75 (Disolución 3). Por último, la cuarta disolución se realizó mezclando la disolución de Fn y de Fng en una proporción 50:50, sin incluir nada de HSA (Disolución 4, Fn-HSA-Fng 50:0:50). Los resultados obtenidos tras el análisis mediante PCA de los espectros de la mezcla de las tres proteínas clasificados según la condición del sustrato, se muestran en las figuras 36, 37 y 38.

Aquellas superficies de la aleación de Ti6Al4V que no han sido sometidas a ningún tratamiento con luz UV presentan una clara diferencia entre la adsorción de las disoluciones 1 y 4 (Fig. 36). Estas dos disoluciones son aquellas que mezclan solamente dos proteínas, la 1 es la mezcla entre Fn y HSA y la disolución 4 entre Fn y Fng. Las disoluciones 2 y 3, que son aquellas donde se incluyen las tres proteínas con diferente proporción de volumen, muestran una adsorción muy similar sobre la superficie de Ti6Al4V no irradiada. Además, estas dos disoluciones están más próximas a la mezcla Fn-HSA que a la mezcla Fn-Fng.

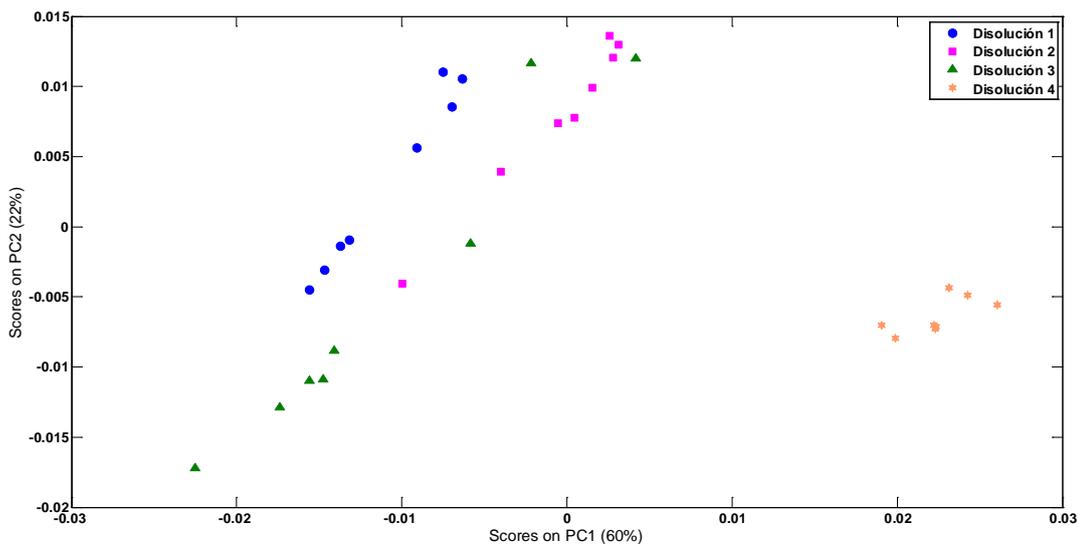


Figura 36. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de la mezcla de las tres proteínas adsorbidas sobre Ti6Al4V sin irradiar.

Para las superficies de Ti6Al4V que han sido irradiadas durante 2 h con luz UV-C (Fig. 37), se observa que la mayor diferencia en la adsorción se encuentra entre la disolución 3 y el resto de disoluciones. En esta condición del sustrato sí que se presentan cambios entre la mezcla de las tres proteínas con distinta proporción. Y el comportamiento entre la mezcla Fn-HSA y Fn-Fng es muy similar.

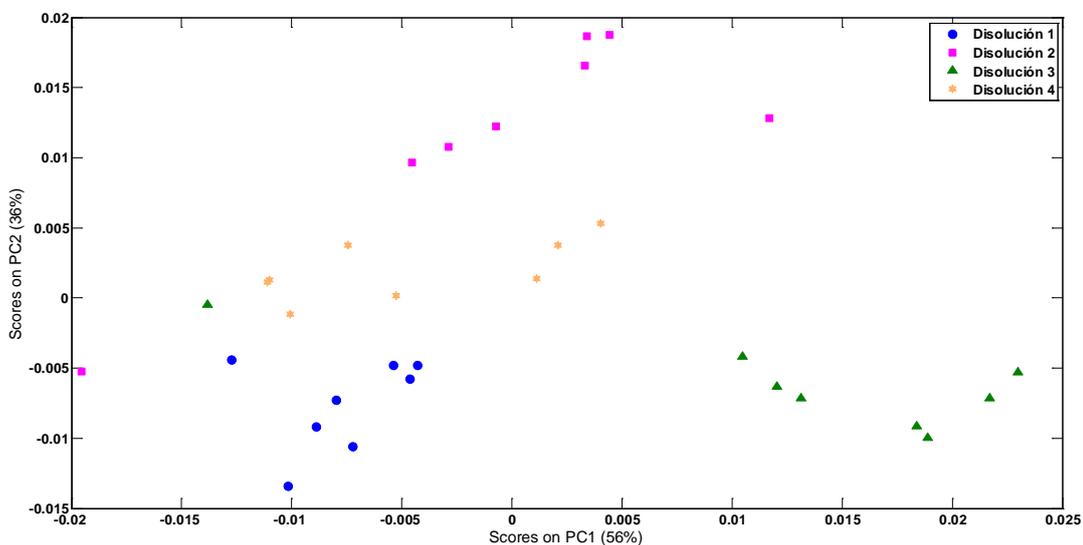
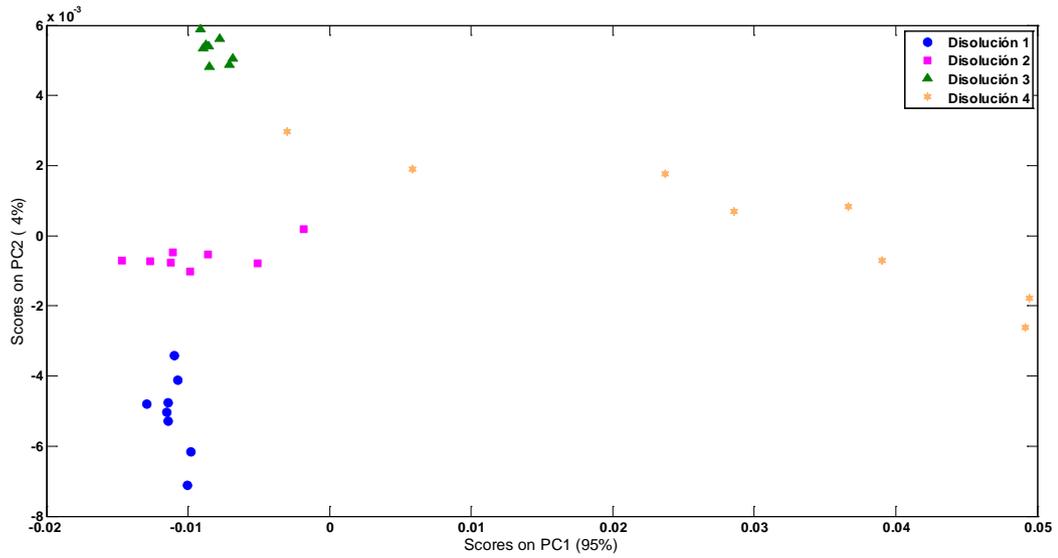


Figura 37. Resultados obtenidos mediante PCA del espectro de iones positivos de la mezcla de las tres proteínas adsorbidas sobre Ti6Al4V irradiado durante 2 h.

Por último, las superficies de Ti6Al4V que han sido sometidas a tratamiento con luz UV-C durante 15 h (Fig. 38) solamente presentan diferencias en la adsorción entra la disolución 4 y el resto de disoluciones.



BIBLIOGRAFÍA

Baker, E.N. y Hubbard, R.E. *Hydrogen bonding in globular proteins*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 44 (1984) 97-179.

Bernsmann, F., Lawrence, N., Hannig, M., Ziegler, C., Gnaser, H. *Protein films adsorbed on experimental dental materials: ToF-SIMS with multivariate data analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391 (2008) 545-554.

Brash, J.L. y Horbett, T.A. *Proteins at Interface: An Overview*. American Chemical Society (1995) 1-23. doi: 10.1021/bk-1995-0602.ch001.

Carter, D.C. y Ho, J.X. *Structure of Serum Albumin*. Advances in Protein Chemistry, 45 (1994) 153-203.

Chothia, C. *Principles that determine the structure of proteins*. Annual Review of Biochemistry, 53 (1984) 537-572.

Filali, L., Brahmi, Y., Dine Sib, J., Bouhekka, A., Benlakehal, D., Bouizem, Y., Kebab, A., Chahed, L. *The effect of amorphous silicon surface hydrogenation on morphology, wettability and its implication on the adsorption of proteins*. Applied Surface Science, 384 (2016) 107-115.

Henry, M., Dupont-Gillain, C., Bertrand, P. *Conformation Change of Albumin Adsorbed on Polycarbonate Membranes as Revealed by ToF-SIMS*. Langmuir, 19 (2003) 6271-6276.

Hirsh, S.L., McKenzie, D.R., Nosworthy, N.J., Denman, J.A., Sezerman, O.U., Bilek, M.M. *The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 103 (2013) 395-404.

Hynes, R.O. y Yamada, K.M. *Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins*. The Journal of Cell Biology, 95 (1982) 369-377.

Jinku Kim. *Study of the conformational change of adsorbed proteins on biomaterial surfaces using hydrogen-deuterium exchange with mass spectroscopy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 141 (2016) 513-518.

Lauricella, A.M. *Variabilidad de las redes de fibrina*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 41 (2007) 7-19.

Lee, J.H. y Lee, H.B. *Platelet adhesion onto wettability gradient surfaces in the absence and presence of plasma proteins*. Journal of Biomedical Materials Research, 41 (1998) 304-11.

Norde, W. *Adsorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces*. Cells and Materials, 5 (1995) 97-112.

Ostuni, E., Chapman, R.G., Holmlin, R.E., Takayama, S., Whitesides, G.M. *A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein*. Langmuir, 17 (2001) 5605-5620.

Pacha-Olivenza, M. A., Gallardo-Moreno, A.M., Vadillo-Rodríguez, V., González-Martín, M.L., Pérez-Giraldo, C., Galván, J.C. *Electrochemical analysis of the UV treated bactericidal Ti6Al4V surfaces.* Materials Science and Engineering C, 33 (2013) 1789-1794.

Peña, A., Arroyo, A., Gómez, A., Tapia, R., Gómez, C. *Bioquímica.* Ed. Limusa, grupo Noriega Editores, México, 2004.

Peters, T. *Serum Albumin.* Advances in Protein Chemistry, 37 (1985) 161-245.

Potts, J.R. y Campbell, L.D. *Fibronectin structure and assembly.* Current Opinion in Cell Biology, 6 (1994) 648-655.

Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S. *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces.* Advances in Colloid and Interface Science, 162 (2011) 87-106.

Schmidt, D.R., Waldeck, H., Kao, W.J. *Protein adsorption to biomaterials.* In: Puleo, D.A., Bizios, R. Biological interactions on materials surfaces. Springer, Berlin, (2009).

Sethuraman, A., Han, M., Kane, R.S., Belfort, G. *Effect of Surface Wettability on the Adhesion of Proteins.* Langmuir, 20 (2004) 7779-7788.

Shchukarev, A., Malekzadeh, B.O., Ransjö, M., Tengvall, P., Westerlund, A. *Surface characterization of insulin-coated Ti6Al4V medical implants conditioned in cell culture medium: An XPS study.* Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 216 (2017) 33-38.

Silva-Bermudez, P. y Rodil, S.E. *An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants.* Surface and Coatings Technology, 233 (2013) 147-158.

Spriano, S., Chandra, V.S., Cochis, A., Uberti, F., Rimondini, L., Bertone, E., Vitale, A., Sclaro, C., Ferrari, M., Cirisano, F., Gautier di Confienzo, G., Ferraris, S. *How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials?* Materials Science and Engineering C, 74 (2017) 542-555.

Tidwell, C.D., Castner, D.G., Golledge, S.L., Ratner, B.D., Meyer, K., Hagenhoff, B., Benninghoven, A. *Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films.* Surface and Interface Analysis, 31 (2001) 724-733.

Tsapikouni, T.S. y Missirlis, Y.F. *Protein-material interactions: From micro-to-nano scale.* Materials Science and Engineering B, 152 (2008) 2-7.

Vroman, L. y Adams, A.L. *Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid-solid interfaces.* Surface Science, 16 (1969) 438-446.

Wagner M.S. y Castner, D.G. *Characterization of Adsorbed Protein Films by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis.* Langmuir, 17 (2001) 4649-4660.

Wehmeyer, J.L., Synowicki, R., Bizios, R., García, C.D. *Dynamic adsorption of albumin on nanostructured TiO₂ thin films.* Materials Science and Engineering C, 30 (2010) 277-282.

Wei-Bor Tsai, Grunkemeier, J.M., Horbett, T.A. *Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene.* Journal of Biomedical Materials Research, 44 (1999) 130-139.

Weisel, J.W. *Fibrinogen and Fibrin.* Advances in Protein Chemistry, 70 (2005) 247-299.

Ying, P., Gang Jin, Zulai Tao. *Competitive adsorption of collagen and bovine serum albumin-effect of the surface wettability.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 33 (2004) 259-263.

Ying-Sui Sun, Jean-Heng Chang, Her-Hsiung Huang. *Enhancing the biological response of titanium surface through the immobilization of bone morphogenetic protein-2 using the natural cross-linker genipin.* Surface & Coatings Technology, 303 (2016) 289-297.

Zhongwei Wang, Yu Yan, Lijie Qiao. *Protein adsorption on implant metals with various deformed surfaces.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 156 (2017) 62-70.

WEBGRAFÍA

Página web número 1: <https://es.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A1cido>

Página web número 2: <http://proteinasyaminoacidossena.blogspot.com>

Página web número 3: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Estructura_prote

Página web número 4: <http://www.davidfunesbiomed.es/2016/02/34-proteinas.html>

Página web número 5: <https://es.wikipedia.org/wiki/Alb%C3%BAmina>

Página web número 6: <https://es.pinterest.com/profesorjano/histolog>

CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN DE IMPLANTES DENTALES RETIRADOS

5. CARACTERIZACIÓN DE IMPLANTES DENTALES RETIRADOS

5.1. INTRODUCCIÓN

Los implantes dentales se han convertido en un método muy extendido para la rehabilitación oral en pacientes parcial o totalmente desdentados (Daood, U. *et al.*, 2011). La gran mayoría de estos implantes están fabricados con titanio o algunas de sus aleaciones, debido a sus propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y alto índice de osteointegración (Prasad, S. *et al.*, 2015).

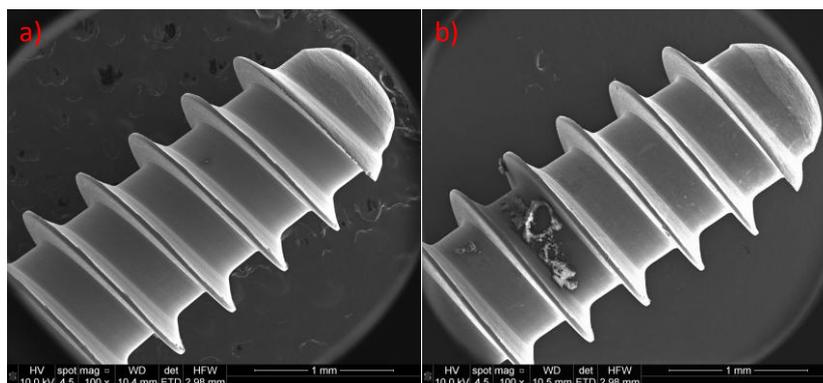


Figura 1. Imágenes SEM de implantes dentales de titanio; a) Implante nuevo, b) Implante retirado en el que se observan restos biológicos adheridos a su superficie.

Las tasas de éxito de los implantes dentales son altas, normalmente más del 90% de los implantes dentales no producen problemas en el paciente después de más de 10 años en uso (Lekholm, U. *et al.*, 2006) (Romeo, E. *et al.*, 2002). Aun así, en la actualidad los esfuerzos del personal clínico y de la industria que fabrica estos dispositivos están dirigidos, fundamentalmente, a continuar disminuyendo la probabilidad de fracaso de los mismos en cualquier clase de condiciones.

Los factores que pueden provocar fallos en un implante son muy diversos (Chrcanovic, B.R. *et al.*, 2014). Por una parte, son relevantes para el éxito del implante las condiciones clínicas del paciente, tanto específicas de la cavidad bucal, como por ejemplo una periodontitis latente, o bien generales como la diabetes, el tabaquismo o la osteoporosis. Igualmente, el volumen de hueso en la zona donde se va a colocar el implante, e incluso si ese hueso se ha recrecido para facilitar el implante, puede afectar a la estabilidad del mismo y en consecuencia a su aflojamiento y pérdida. También son decisivas las técnicas quirúrgicas de implantación seguidas (Albrektsson, T. *et al.*, 1981), además de la mayor o menor experiencia del cirujano. Y, por supuesto, las propiedades físico-químicas del implante, especialmente sus características topográficas y de composición química de su superficie.

Como se acaba de indicar, las características de la superficie de los implantes van a jugar un papel esencial en el éxito del dispositivo, es decir, en su pervivencia, idealmente indefinida en el paciente. Para conseguir este objetivo es preciso que la superficie sea adecuada al ambiente

fisiológico en el que se va a encontrar inmerso el implante. Se espera que sus propiedades favorezcan su relación con osteoblastos o fibroblastos, dependiendo de la zona concreta de contacto del implante, que no se deteriore por las moléculas o por las condiciones químicas del entorno fisiológico, e igualmente que sea capaz de inhibir lo más posible su colonización por microorganismos, sobre todo teniendo en cuenta que la cavidad bucal es, probablemente, la parte del cuerpo en la que se pueden encontrar mayor densidad y diversidad de especies de microorganismos.

El desarrollo de superficies que promuevan la osteointegración (Mendonça, G., *et al.* 2008) (Sykaras, N., *et al.*, 2000) se dirige hacia la modificación de su topografía y de su composición química. Se sabe que las superficies tratadas para aumentar su rugosidad, tanto a escala micrométrica como nanométrica, y que por tanto tienen una mayor área de contacto entre el hueso y el material que las no tratadas, presentan, en general, un mayor grado de integración ósea (Li, D., *et al.*, 2002) (Anselme, K., *et al.*, 2000). Por otra parte, la inclusión en la superficie de ciertos compuestos también favorece la respuesta del implante, por lo que se emplean diferentes procedimientos para producir recubrimientos específicos en las superficies. Es preciso señalar que es muy complicado cambiar una característica superficial sin afectar al resto y por lo tanto, la alteración de la topografía de la superficie del implante, en algunas ocasiones, implica un cambio en sus propiedades químicas (Massaro, C., *et al.*, 2002), del mismo modo que la deposición de recubrimientos sobre la superficie del implante pueden generar una topografía diferente de la que presentaba inicialmente el material.

Hay varias posibilidades para modificar la topografía de la superficie de los implantes dentales a nivel micro y nanométrico, entre ellas se incluyen el granallado, los tratamientos con láser, la oxidación anódica, o los ataques con ácido. La oxidación anódica es una de las técnicas para modificar la superficie de los implantes más empleada y con mejores resultados para el aumento de su rugosidad. Este procedimiento, además de promover la formación de la capa de óxido del metal, permite modificar la composición química de la superficie incorporando iones, presentes en las disoluciones aplicadas en el tratamiento, en la capa de óxido que se origina. Por lo tanto, mediante esta técnica se desarrolla en el material un recubrimiento poroso, cuyo espesor va a depender del voltaje y del tiempo aplicados en el proceso (Schreckenbach, J.P., *et al.* 1999), en el que también se encuentran elementos presentes en la solución del electrolito que se empleó (Kaluderović, M.R., *et al.*, 2016). Con este procedimiento se pueden incorporar elementos como Ca o P al óxido superficial, que influyen ventajosamente en la proliferación celular, y finalmente a la mejor fijación del hueso a las superficies del implante (Maxian, S.H., *et al.*, 1994). En el caso del tratamiento por ataque con ácido, la rugosidad superficial de las muestras que se produce aumenta con la temperatura y el tiempo del tratamiento (Seiji Ban, *et al.*, 2006). En general, aparecen sobre la superficie micro-picaduras, con tamaños que van desde 0,5 hasta 2 μm de diámetro (Medvedev, A.E., *et al.*, 2016). Pero, además, cuando una superficie metálica es atacada con ciertos ácidos fuertes como HCl, HF, HNO₃ o H₂SO₄, se puede llegar a una eliminación selectiva del material, ya que ciertas fases metálicas e impurezas son más sensibles al ataque químico que otras y por lo tanto permite discriminar entre granos en la superficie del implante.

Otra posibilidad para favorecer la integración del implante es crear un recubrimiento en su superficie con otros materiales, adecuados para aumentar la interacción entre el hueso y el

implante, entre los que se encuentra la hidroxiapatita (HAP) como uno de los más empleados. La HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, está aceptada como material biocompatible ya que su composición es similar al componente mineral de hueso y dientes (Jarcho, M., 1981). Dos de las técnicas más habituales para realizar estos recubrimientos son la pulverización térmica y la deposición de películas mediante sol-gel (Mendonça, G., *et al.* 2008). La pulverización térmica produce recubrimientos de HAP gruesos (de hasta 200 μm) y altamente porosos, pero como inconvenientes se pueden destacar que esos recubrimientos son generalmente no uniformes y tienen una fuerza de unión pobre a los sustratos metálicos (Radin, S.R. y Ducheyne, P., 1992). En contraste, la deposición de películas de HAP mediante sol-gel produce recubrimientos de capas delgadas (Kui Cheng *et al.*, 2001), con una composición química homogénea y menos susceptibles de sufrir agrietamientos (Haddow, D.B., *et al.*, 1998).

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos por conseguir superficies duraderas, continúan produciéndose fallos de implantes que provocan el que sea preciso extraerlos y sustituirlos. En un estudio realizado sobre una muestra de 100 implantes que tuvieron que ser eliminados como consecuencia de la pérdida progresiva de hueso provocada por periimplantitis, pero sin haber presentado problemas de tipo mecánico, al menos el 60% de ellos presentaban daños y roturas en su capa superficial, siendo los implantes fabricados con Ti cp más susceptibles a estos daños que los manufacturados a partir de Ti6Al4V (Shemtov-Yona, K. y Rittel, D., 2015). Si bien estos daños se producen y se intensifican debido principalmente a la fatiga que provoca en el material la masticación a lo largo de la vida útil del implante, también pueden originarse durante su colocación por el cirujano. Un estudio *in vitro* del proceso de implantación, utilizando moldes de poliuretano para simular el espacio de inserción en la mandíbula, demostró que tras su inserción, la altura de los picos de la rugosidad de las superficies tratadas con ácido se rebajaba, quedando más romas, mientras que en el caso de las superficies anodizadas se llegaron a producir incluso arranques de partes de la capa de óxido (Mints, D., *et al.*, 2014).

A lo largo de la vida útil del implante, junto con el posible deterioro estructural de su superficie, también se provocan alteraciones en su composición química. Además de la posible liberación de elementos que pudieran estar presentes en la superficie original, el contacto con el medio fisiológico durante un periodo prolongado favorece la adsorción irreversible de moléculas de este entorno en su superficie, promoviéndose la difusión de iones hacia el interior del material del implante, e incluso, si la integración del implante ha sido buena, parte del nuevo hueso formado queda firmemente adherido sobre el implante. La evaluación de estos cambios se realiza mediante técnicas de caracterización química superficial. El método más habitual es el uso de la medida de la energía dispersiva de rayos X (EDX) (Shah, F.A. *et al.*, 2014) (Shemtov-Yona, K. y Rittel, D., 2015) (Guang Han y Zhijian Shen, 2015). Esta técnica tiene la ventaja de poder realizarse simultáneamente a las observaciones con SEM, sin embargo sus características hacen que la información composicional que provee se refiera a una capa del material muy gruesa, entorno a los 1000 nm, con lo que la información más superficial se enmascara en el global. Una técnica de análisis alternativa es XPS que, aunque no puede realizarse en el interior del SEM, permite obtener información mucho más sensible de la composición química de la zona más externa de la superficie, es decir, de una capa de aproximadamente 2-3 nm de espesor.

5.1.1. Objetivos de este capítulo

En este capítulo se pretende identificar los posibles daños o modificaciones producidas en la superficie de dos implantes dentales retirados tras distintos años de uso. Para ello se analiza la superficie de los implantes, tanto a nivel topográfico, como de la composición química, mediante técnicas de SEM y XPS. Los cambios producidos en la superficie de los implantes retirados se detectaron mediante comparación con implantes sin utilizar, tal y como se suministran por la casa comercial, aunque en uno de los casos no fue posible obtener un implante nuevo idéntico al retirado, debido a que ese modelo no se fabrica actualmente y por el largo periodo de tiempo transcurrido desde su implantación, la casa comercial no mantenía almacenado ningún ejemplar de aquella producción.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.2.1. Casos clínicos

Todos los estudios presentados en esta Tesis relacionados con implantes dentales retirados están realizados en colaboración con profesionales del Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial perteneciente al Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz y del Centro de Implantología y Cirugía Oral y Maxilofacial, CICOM (Badajoz, España).

Se estudiaron los casos de dos pacientes que acudieron a ese Centro para que les fueran retirados los implantes dentales que les habían colocado años atrás por movilidad de los mismos. El primero de los casos fue el de un varón de 55 años de edad al que se le habían sustituido piezas dentales en la mandíbula superior 3 años antes. El segundo caso fue el de otro varón de 45 años de edad al que se le retiró un implante colocado hacía 18 años.

5.2.2. Tipos de implantes retirados

El implante retirado al primer paciente es un sistema Brånemark Mk IV TiUnite® (4 x 11.5 mm²) (Nobel Biocare AB®, Göteborg, Sweden). Según la información del fabricante, este tipo de implantes posee un recubrimiento grueso de óxido de titanio cristalino y enriquecido con fósforo, obtenido mediante oxidación anódica. El tratamiento utilizado hace que la superficie del implante tenga una terminación porosa y ligeramente rugosa, formada por poros tubulares de entre 3 y 15 µm de diámetro.

Del segundo paciente se retiró un implante de titanio Biomet 3i Osseotite® (3.25 x 13 mm²) (Implant Innovations, Inc, USA). No se tiene mucha información de la composición y topografía exacta de este implante debido a que este modelo ha dejado de comercializarse e incluso la compañía propietaria del desarrollo no existe en la actualidad. Por lo tanto, según la información de la que se dispone, este tipo de implantes se fabricaban sometiéndolos a un tratamiento superficial mediante una pulverización con partículas de fosfato cálcico, solamente en la parte de espiras del tornillo, y mediante ácido (mezcla de HCl y H₂SO₄) que les proporcionaba una

estructura porosa, con tamaño de poros o picaduras que oscilan entre 1 y 2 μm de diámetro (Sul, Y.T., *et al.*, 2008).

Una vez retirados los implantes en el CICOM, se depositaban en cubetas con suero, para poder ser trasladados hasta los laboratorios en la Universidad de Extremadura. Como paso previo a la caracterización de los implantes, estos fueron sometidos a un proceso de limpieza con un líquido antiséptico DSF (Derquim 11, Panreac, España) y una gasa esterilizada para retirar los restos biológicos blandos de su superficie. Posteriormente fueron sumergidos en agua destilada, sonicados en un baño de ultrasonidos, para, por último, ser sumergidos en etanol durante unos pocos segundos y depositados al aire para secarse.

5.2.3. Técnicas de caracterización

5.2.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Todas las imágenes SEM mostradas en este capítulo fueron tomadas por el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies (SACSS) en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura. La superficie de los implantes fue analizada con un microscopio electrónico Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, US), cuya fuente de iones es de galio. Las imágenes de la superficie de los implantes dentales se tomaron mediante detección de electrones secundarios. Las muestras se montaron sobre un portamuestras de aluminio, en el que fueron fijadas con una cinta adhesiva de carbono de doble cara. El modo de trabajo en el equipo fue alto vacío, con una presión de 10^{-4} Pa. El voltaje empleado en la aceleración de los electrones para la recogida de cada imagen suele ser 10 o 15 kV y se indica en el margen inferior de las mismas. Se tomaron imágenes con aumentos que oscilaban entre 150x y 50000x, en diferentes zonas de los implantes seleccionadas al azar, para tener una visión tanto de la macroestructura como de la microestructura de la superficie de los implantes.

5.2.3.2. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La caracterización de la superficie de los implantes dentales retirados mediante XPS se realizó con un equipo K-Alpha (Thermo Scientific, UK), que ya ha sido descrito en los capítulos anteriores. El punto del haz incidente elegido para estas medidas tenía un tamaño de 300 μm , en disposición elipsoidal, y todas las medidas se realizaron en el interior de la cámara de ultra alto vacío, que operaba a 10^{-8} mbar. Para todas las muestras analizadas se tomaron medidas en la superficie y a distintos niveles de profundidad, aplicando un bombardeo con iones Ar^+ de 3 KeV durante distintos tiempos de arrase. El análisis de los espectros de XPS se realizó con el software Advantage, proporcionado por la casa comercial del equipo y para la corrección de posibles desplazamientos en las energías de enlace de los elementos se utilizó como referencia el pico del C1s, que está situado a 285 eV de energía. Para restar el fondo de los espectros generales se utilizó el método de Shirley.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Cambios topográficos producidos en la superficie de los implantes retirados

En la figura 2 se pueden apreciar las diferencias en la topografía superficial de los implantes dentales estudiados producidas por los diferentes tratamientos a los que son sometidos en su fabricación. Estas imágenes SEM se presentan a distintos aumentos para poder distinguir mejor las características topográficas de ambas superficies. El implante TiUnite® presenta una estructura porosa en la superficie debido al proceso de oxidación anódica (Fig. 2a). El tamaño de poro para estas superficies suele estar entre 3 y 15 µm de diámetro. Mientras que la superficie del implante Osseotite® se caracteriza por la presencia de lo que parece una capa muy rugosa que recubre el implante (Fig. 2b). Este tipo de topografía superficial es típica de aquellos materiales que han sido sometidos a una pulverización térmica con algunas partículas. En el caso de los implantes Osseotite® las partículas empleadas para crear el recubrimiento en su superficie son de fosfato cálcico.

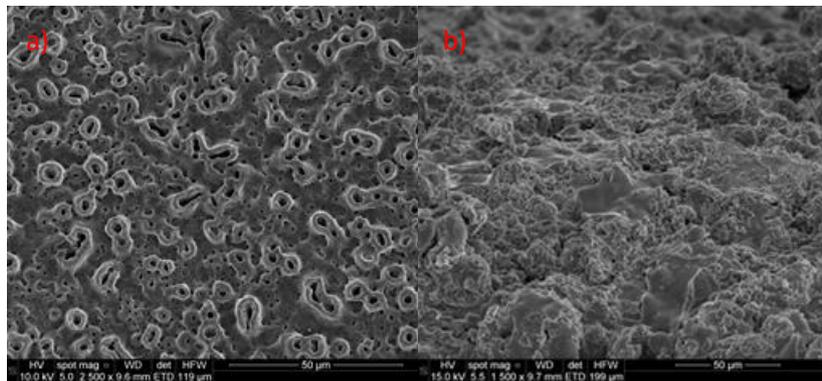


Figura 2. Imágenes SEM de los dos tipos de superficie de implantes estudiados: a) TiUnite® y b) Osseotite®.

Es de esperar que la implantación produzca cambios en la topografía de los implantes dentales debido tanto a las técnicas quirúrgicas utilizadas en su colocación, como al entorno biológico y al estrés mecánico al que están sometidos.

En la figura 3 se presentan las imágenes SEM de la superficie del implante TiUnite® extraído. Estas imágenes están tomadas a distintos aumentos y en distintas zonas del implante dental. Además, se compararon las imágenes de un implante nuevo (Fig 3. 1a, 2a, 3a) con las tomadas del implante retirado (Fig 3. 1b, 2b, 3b), a las magnificaciones de 150x (Fig 3. 1a y 1b), 1000x (Fig3. 2a y 2b) y 3500x (Fig3. 3a y 3b), para poder ver los posibles daños producidos en la superficie por el uso.

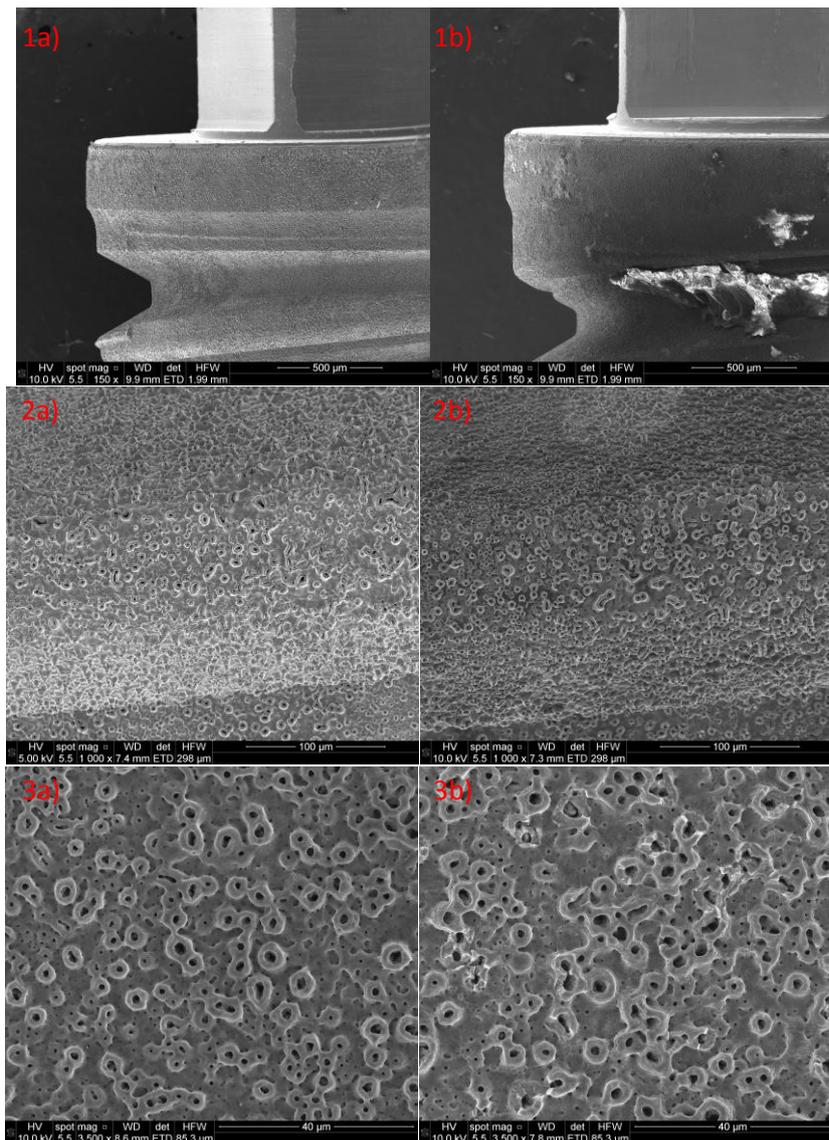


Figura 3. Imágenes SEM del implante Brånemark Mk IV TiUnite® tomadas a diferentes aumentos (1:150x, 2:1000x, 3:3500x): a) Implante nuevo, b) Implante retirado tras 3 años implantado.

Comparando las imágenes del implante nuevo y retirado tomadas a 150x se puede observar cómo se ha producido un claro deterioro en los detalles macroscópicos del implante tras su uso. Las crestas de las roscas y en general todos los perfiles afilados del tornillo nuevo aparecen romos en el usado. Además, son visibles claramente restos biológicos fuertemente adheridos a la superficie, que no fue posible retirar en el lavado previo, y que probablemente sean restos minerales de hueso formado hacia la superficie. Detalles a nivel microscópico del deterioro del implante se pueden observar en las imágenes tomadas a 1000 y especialmente, 3500 aumentos. Comparando las imágenes de ambos implantes, nuevo y usado, se aprecian daños en algunas de las formaciones porosas de la superficie del implante retirado. Después de realizar un barrido por la superficie del implante, se observó que aproximadamente el 40% de las estructuras porosas presentes en la superficie del implante retirado se encontraron dañadas o parcialmente rotas. Estos daños son más apreciables en las imágenes 4a y 4b, tomadas a 8000 aumentos y con las muestras inclinadas para apreciar mejor el aspecto de la topografía. En la figura 4a se observa que el tratamiento con oxidación anódica produce un gran número de poros en las superficies y

de forma relevante, provoca la aparición de estructuras porosas con forma de chimeneas de altura variable. Aunque el uso del implante sigue permitiendo la presencia de un gran número de poros (Fig. 4b), las estructuras en forma de chimenea aparecen dañadas en su mayoría.

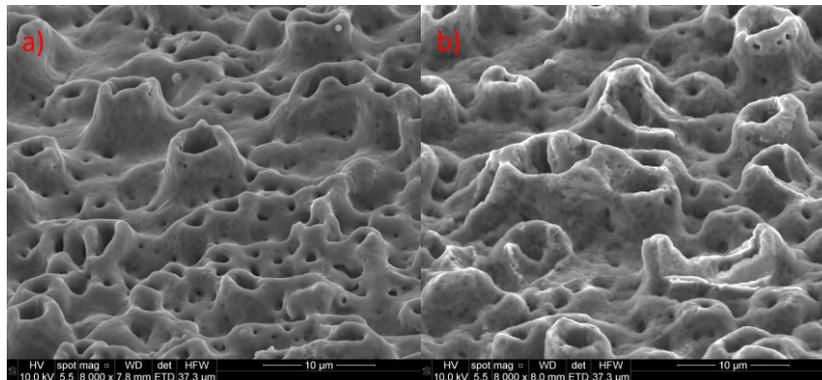


Figura 4. Imágenes SEM del implante Brånemark Mk IV TiUnite® tomadas a 8000x: a) Implante nuevo, b) Implante retirado tras 3 años implantado.

En el caso del segundo implante estudiado, Osseotite®, se procedió de modo similar al anterior, aunque, debido al tiempo que había estado insertado, en el centro CICOM no disponían de un implante nuevo del mismo tipo. Por este motivo se requirió a la empresa de fabricación de estos implantes que enviaran un implante nuevo de características químicas y topográficas lo más similares posibles al implante retirado. Esto no fue tarea fácil, ya que la empresa original de fabricación de estos implantes había sido absorbida por la compañía Implant Innovations (USA). Aun así, desde esta última se enviaron implantes Osseotite® de características lo más similares posibles al implantado 18 años atrás. La figura 5 muestra las imágenes obtenidas mediante SEM en estos implantes. Al igual que para el caso anterior, estas imágenes están tomadas a distintos aumentos y en distintas zonas del implante dental. Las imágenes de un implante nuevo se presentan en la figura 5. 1a, 2a, 3a y las tomadas al implante retirado en las figuras 5. 1b, 2b, 3b, a las magnificaciones de 500x (Fig 5. 1a y 1b), 1500x (Fig 5. 2a y 2b) y 3500x (Fig 5. 3a y 3b), para poder ver los posibles daños producidos en la superficie por el uso.

Para el implante del tipo Osseotite® es posible apreciar cambios en su topografía a partir de los 500 aumentos, si se comparan las superficies del implante nuevo y del retirado (Fig. 5.1a y 5.1b). En la figura 5, y para todos los aumentos, es posible distinguir zonas en la superficie del implante retirado donde se pueden distinguir grietas o arañazos en el recubrimiento (indicadas en la figura 5 mediante círculos), en las que se ha perdido la topografía creada por el tratamiento aplicado a esta superficie. Estos cambios son más apreciables a medida que se incrementan los aumentos a los que son tomadas las imágenes.

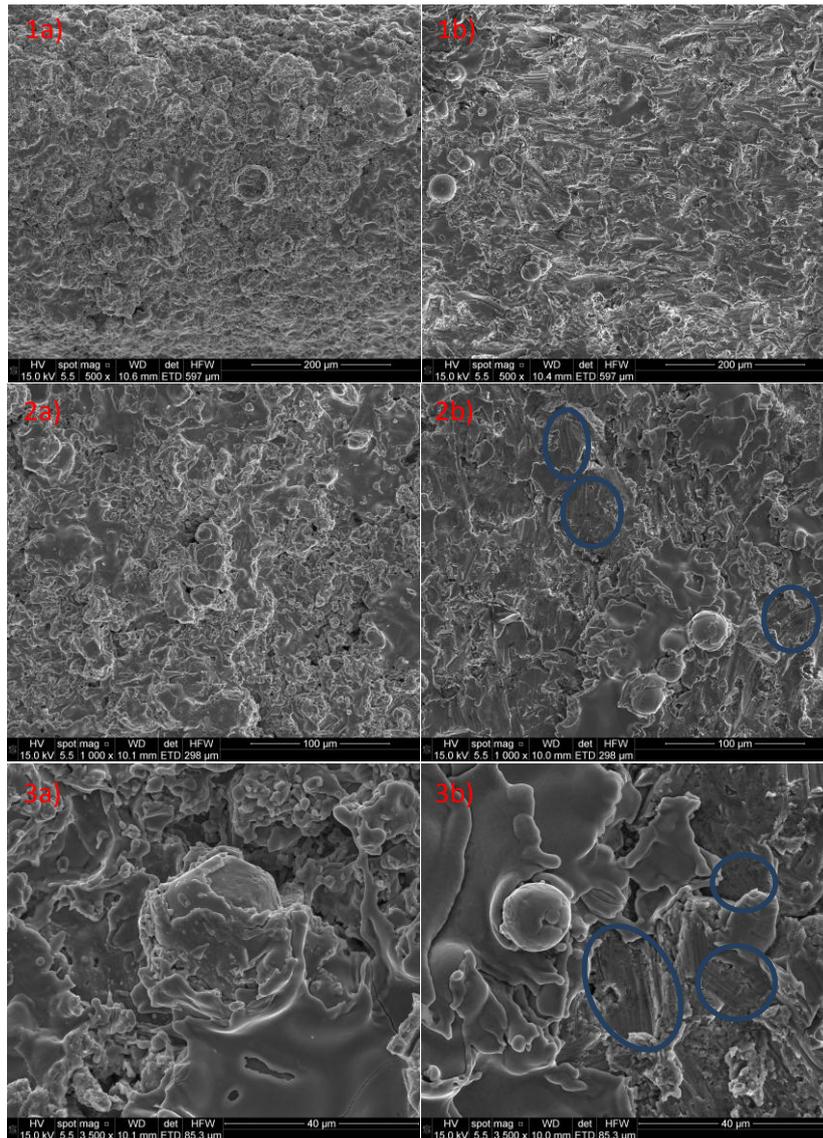


Figura 5. Imágenes SEM del implante Biomet 3i Osseotite[®] tomadas a diferentes aumentos (1:500x, 2:1000x, 3:3500x): a) Implante nuevo, b) Implante retirado tras 18 años implantado, donde se puede apreciar el deterioro de la superficie (indicado mediante círculos).

En ambos casos, como se muestra en las imágenes tomadas por SEM, se producen cambios en las características topográficas de la superficie de los implantes que han estado implantados. Una de las causas de estos cambios puede achacarse al proceso quirúrgico, en el que los implantes sufren una gran presión para ser insertados en el hueso donde van colocados. Esta explicación se apoya en que, para la colocación de implantes es aconsejable perforar el hueso donde va colocado el implante con un diámetro menor para lograr la estabilidad del mismo (Natali, A.N., *et al.*, 2009). Por otro lado, las modificaciones en la topografía de los implantes también están relacionadas con los efectos desencadenados por la combinación de la posible presencia de células inflamatorias, bacterias patógenas y de algunas enzimas presentes en los fluidos corporales. Asimismo, la corrosión localizada y la disolución de material de la superficie del implante dañan sus propiedades pudiendo favorecer el fracaso del implante (Yan, Y. *et al.*, 2007). Por lo tanto, y aunque mediante este estudio no se puede identificar la causa o posibles

causas ciertas que afectaron a estos implantes, está claro que los cambios en su topografía deterioraron la estabilidad de estas piezas en los pacientes que las llevaban.

5.3.2. Análisis de la composición química de la superficie de los implantes retirados

En la figura 6 se muestran los espectros obtenidos mediante XPS en la superficie del implante TiUnite®, nuevo (representado en color negro) y retirado tras 3 años implantado (representado en color azul). Tanto el implante nuevo como el retirado tienen la misma composición, con elementos mayoritarios presentes en su superficie como el oxígeno, el titanio, el carbono y el fósforo. Los porcentajes atómicos obtenidos de los elementos presentes en la superficie de los implantes se presentan en la primera columna de la tabla 1. La presencia de estos elementos concuerda con el hecho que ya se ha comentado en el apartado de Materiales y Métodos Experimentales de este capítulo, de que el implante TiUnite® posee en su superficie un recubrimiento de óxido de titanio enriquecido con fósforo, incorporado en el proceso de oxidación anódica. También, el pico Ti2p se encuentra situado a 459,0 eV de energía de enlace, dato que coincide con el publicado por Byung-Soo Kang *et al.* (Byung-Soo Kang *et al.*, 2009) en los estudios que realizan en un implante nuevo del mismo tipo que el que aquí se analiza. En esta misma publicación también aparecen citados los datos de las energías de enlace a las que se sitúan los picos O1s y P2p, que coinciden con los que se obtienen en los experimentos aquí realizados (531,1 eV y 133,8 eV, respectivamente).

Por su parte, la presencia de carbono es habitual en la mayoría de las superficies analizadas debido a la contaminación ambiental y en particular, en las superficies de titanio, debido a la tendencia de este material a adsorber compuestos orgánicos durante los procesos de fabricación (provenientes, por ejemplo, de los lubricantes). Se aprecia que la cantidad de C detectada (tabla 1) en los implantes retirados es siempre mayor que en los implantes nuevos, probablemente como resultado de una mayor contaminación sufrida por los implantes tras su manipulación clínica o por la retención de moléculas orgánicas a lo largo de su vida útil. Además, en la superficie de estos implantes están presentes otros elementos minoritarios, como son el calcio, el azufre y el zinc (sólo en el implante nuevo), cuya presencia puede deberse a contaminación por la manipulación del implante o en el proceso de modificación de su superficie.

Es destacable la gran diferencia existente entre la cantidad de nitrógeno presente en el implante nuevo y en el retirado (Tabla 1). Si se atiende a los datos de los porcentajes atómicos relativos a este elemento, se puede observar que la cantidad de N en la superficie del implante retirado es más de diez veces mayor que en el implante nuevo. La presencia de N en la superficie de materiales que han estado en contacto con fluidos fisiológicos, normalmente, se relaciona con la presencia de proteínas adsorbidas en dichas superficies (Hsin-Yi Lin y Bumgardner, J.D., 2004).

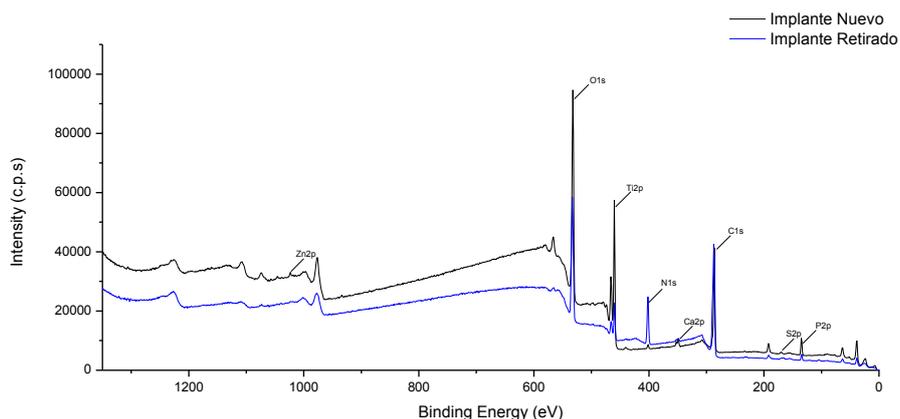


Figura 6. Espectro XPS tomado en la superficie del implante TiUnite®. Se presentan los espectro de un implante nuevo (negro) y de un implante retirado tras 3 años implantado (azul).

La información sobre la evolución de la composición química en las primeras capas del implante se obtuvo a partir de las medidas en profundidad (resultados presentados en la tabla 1). Estos análisis indican la desaparición del S y Zn tras el primer arrase de 30 s realizado al implante nuevo y del S al implante retirado, ya que para este último no se observa Zn en su superficie. Este hecho confirma que dichos elementos son contaminantes presentes en la superficie de los implantes pero que no forman parte de la composición química del material base utilizado. Por el contrario, aumenta la cantidad de Ti y P, ya que son elementos que forman parte del material de fabricación del implante TiUnite®. Tanto para el implante nuevo como para el retirado, la cantidad de Ca, C y N disminuyen a medida que profundizamos en la muestra, llegando incluso a desaparecer el N a los 60 s de arrase en el implante nuevo. Sin embargo, aún a esta profundidad, los porcentajes de carbono y nitrógeno en el implante retirado siguen siendo muy importantes y más altos que en el implante nuevo, lo que sugiere la difusión de moléculas orgánicas, posiblemente proteínas, desde el medio fisiológico en el que estuvo implantado hacia su interior.

Tabla 1. Resultados obtenidos del análisis XPS realizados a los implantes nuevo y retirado del tipo TiUnite®.

Elementos	Energía de ligadura (eV)	Porcentajes atómicos relativos (%)					
		Superficie		30 s de arrase		60 s de arrase	
		Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado
O1s	531,1	40,0	23,7	55,4	42,8	60,2	48,3
C1s	285,2	42,3	59,6	14,7	31,1	7,7	21,6
Ti2p	459,0	9,7	2,4	19,8	16,5	22,7	20,5
N1s	400,3	1,1	11,5	0,6	4,4	0	4,0
P2p	133,8	5,1	1,6	8,9	4,9	8,9	5,3
Ca2p	348,0	1,0	0,5	0,6	0,4	0,5	0,3
S2p	169,2	0,5	0,8	0	0	0	0
Zn2p	1022,2	0,3	0	0	0	0	0

Para el caso de los implantes Osseotite[®], los espectros obtenidos mediante XPS se presentan en la figura 7 para el implante nuevo, representado en negro, y para el implante retirado tras 18 años de uso, representado en azul. Se puede apreciar en estos espectros que la composición química de ambos implantes no es exactamente la misma, ya que en el implante retirado hay una cantidad importante de aluminio, así como un pequeño porcentaje de calcio, que no están presentes en la superficie del implante nuevo. Además, en el nuevo aparecen fósforo y silicio en su composición, sin que se encuentren trazas de ellos en el implante retirado (datos presentados en la tabla 2). Estos resultados ponen de manifiesto de forma clara que la composición química de ambas muestras no es exactamente la misma, aunque su topografía superficial sea bastante similar (como se ha mostrado en el apartado anterior de este capítulo). Con mucha probabilidad, el implante retirado está compuesto por una aleación de titanio y aluminio, aunque este hecho no se ha podido corroborar con la empresa fabricante de estos implantes debido a los problemas expuestos en el apartado anterior.

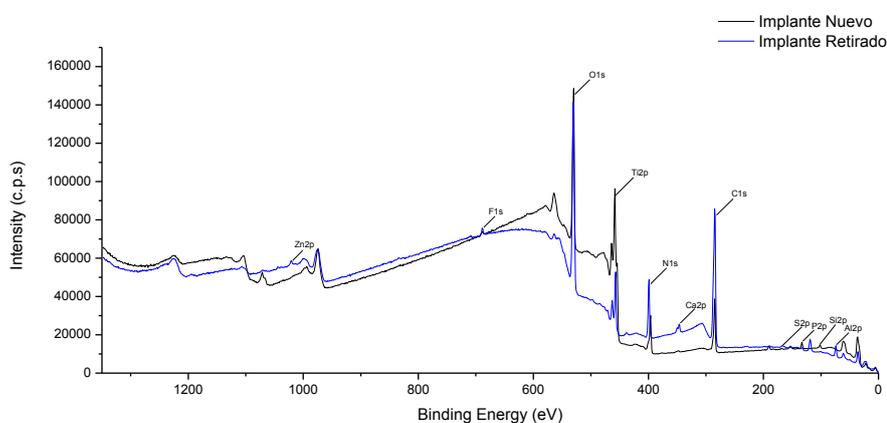


Figura 7. Espectro XPS tomado en la superficie del implante Osseotite[®]. Se presentan los espectros de un implante nuevo (negro) y de un implante retirado tras 18 años implantado (azul).

Como ya se ha indicado, aunque las superficies topográficamente sean iguales para ambos implantes, el interior del nuevo está compuesto exclusivamente por titanio según los datos obtenidos mediante el análisis XPS. Los elementos mayoritarios presentes en su superficie son Ti, O y C, que como ya se ha comentado en el análisis del implante anterior, son los elementos que corresponden a una capa de óxido de titanio (O y Ti) con contaminación ambiental (C). El pico del Ti2p se encuentra situado a 458,0 eV de energía de enlace y el del oxígeno a 530,6 eV, datos que concuerdan con los publicados por C. Massaro *et al.* (Massaro, C. *et al.*, 2002) en sus estudios realizados en la superficie de un implante tipo Osseotite[®] nuevo. Para esta muestra, además, cabe destacar la presencia de una cantidad importante de N, tanto en la superficie del implante como en el interior (datos presentados en la tabla 2), elemento que también se detecta en los estudios de C. Massaro *et al.*, aunque en su caso en una proporción menor.

Debido a las diferencias encontradas en la composición del implante nuevo y del retirado, se realizó un análisis en profundidad de estas muestras llegando hasta niveles más profundos que para los implantes TiUnite[®]. Los resultados de los porcentajes atómicos obtenidos para cada uno de los elementos detectados en la superficie y en los distintos niveles de profundidad analizados para los implantes Osseotite[®] se muestran en la tabla 2.

Los análisis de las medidas XPS realizadas en profundidad muestran también claramente la diferencia en la composición entre la muestra nueva y la retirada (Tabla 2). Los elementos que aparecían de forma minoritaria en la superficie de ambos implantes, dejan de estar presentes a medida que profundizamos en las muestras. En el caso de aquellos elementos relacionados con la contaminación de la superficie, como son Zn, F y S, se puede observar que sólo están presentes en la superficie de estos. Y los elementos que probablemente se introducen en las primeras capas del implante tras el proceso de modificación de su superficie, como son P, Ca y Si, dejan de ser detectados tras 60 s de arrase. Aquellos elementos que su presencia en el implante nuevo y retirado, N y Al respectivamente, certifican la diferencia en la composición entre ambos, siguen estando presentes en todo el análisis realizado en profundidad, incluso su porcentaje atómico aumenta a medida que profundizamos en las muestras.

Tabla 2. Resultados obtenidos del análisis XPS realizados a los implantes nuevos y retirados del tipo Osseotite®.

Elementos	Energía de ligadura (eV)	Porcentajes atómicos relativos (%)											
		Superficie		20 s de arrase		40 s de arrase		60 s de arrase		1000 s de arrase		2000 s de arrase	
		Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado
O1s	530,6	36,6	27,5	32,2	39,9	30,1	40,1	32,3	40,2	19,0	36,9	18,8	37,8
C1s	285,0	29,5	52,7	17,3	26,4	17,3	23,7	13,8	21,1	4,1	9,4	4,4	6,8
Ti2p	458,0	16,4	2,9	30,1	13,6	32,2	15,6	34,3	17,1	52,8	29,5	52,8	30,3
N1s	400,0	12,2	9,4	18,0	4,2	18,0	3,8	18,0	3,5	24,1	2,3	24,0	1,0
P2p	133,8	2,1	0	1,1	0	1,1	0	0,7	0	0	0	0	0
Si2p	102,0	2,2	0	1,4	0	1,1	0	1,0	0	0	0	0	0
S2p	168,1	0,3	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Al2p	74,1	0	5,2	0	14,4	0	16,4	0	17,7	0	22,9	0	24,2
Ca2p	347,0	0	0,9	0	0,6	0	0,5	0	0,3	0	0	0	0
F1s	689,0	0,8	0,7	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0
Zn2p	1022,0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Para poder comparar los resultados obtenidos en la superficie de ambos tipos de implantes, TiUnite® y Osseotite®, sin tener en cuenta la contribución del carbono y debido a que los porcentajes atómicos proporcionados por el XPS son relativos a cada superficie, se han obtenido las relaciones de los elementos presentes en ambas muestras con respecto al titanio (datos presentados en la tabla 3).

Tabla 3. Relación entre los elementos presentes en la superficie de los implantes estudiados con respecto al titanio.

	TiUnite®		Osseotite®	
	Nuevo	Retirado	Nuevo	Retirado
O/Ti	4,1	9,9	2,2	9,5
P/Ti	0,5	0,7	0,1	0
N/Ti	0,1	4,8	0,7	3,2
Ca/Ti	0,1	0,2	0	0,3
Al/Ti	0	0	0	1,8

La relación entre los elementos presentes en la superficie de los implantes estudiados muestra un comportamiento similar entre los implantes nuevos y retirados de ambos tipos. En la tabla 3 se puede comprobar como la relación N/Ti es siempre mucho mayor para los implantes retirados que para los nuevos, independientemente de que el implante sea TiUnite® u Osseotite®. Como ya se ha mencionado al comienzo de este apartado, la presencia de N en la superficie de materiales que han estado en contacto con fluidos fisiológicos, normalmente, se relaciona con la presencia de proteínas adsorbidas en dichas superficies (Hsin-Yi Lin y Bumgardner, J.D., 2004). Otra relación entre elementos destacable es la O/Ti, que también es en ambos casos muy superior para los implantes retirados. Este hecho puede deberse también a la presencia de proteínas y a que debido a la formación de H₂O₂ en las reacciones inflamatorias, la capa de óxido que recubre la superficie de los implantes de titanio puede sufrir cambios en su espesor y en su estructura (Pan, J., *et al.*, 1994). Más concretamente, los estudios realizados por P. Tengvall *et al.* (Tengvall, P., *et al.*, 1989) muestran que los implantes de titanio en presencia de H₂O₂ sufren la captura y oxidación de radicales superóxido, de tal forma que se crea una fina capa TiOOH sobre la capa de óxido de titanio.

BIBLIOGRAFÍA

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A., Lindstrom, J. *Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.* Acta Odontologica Scandinavica, 52 (1981) 155-170.

Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A., Hardouin, P. *Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses.* Journal of Biomedical Materials Research, 49 (2000) 155-166.

Byung-Soo Kang, Young-Taeg Sul, Se-Jung Oh, Hyun-Ju Lee, Albrektsson, T. *XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants.* Acta Biomaterialia, 5 (2009) 2222-2229.

Chrcanovic, B.R., Albrektsson, T., Wennerberg, A. *Reasons for failures of oral implants.* Journal of Oral Rehabilitation, 41 (2014) 443-476.

Daood, U., Bandey, N., Qasim, S.B., Omar, H., Khan, S.A. *Surface characterization analysis of failed dental implants using scanning electron microscopy.* Acta Odontologica Scandinavica, 69 (2011) 367-373.

Guang Han y Zhijian Shen. *Microscopic view of osseointegration and functional mechanisms of implant surfaces.* Materials Science and Engineering C, 56 (2015) 380-385.

Haddow, D.B., James, P.F., Van Noort, R. *Sol-gel derived calcium phosphate coatings for biomedical applications.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 13 (1998) 261-265.

Hsin-Yi Lin, Bumgardner, J.D. *Changes in surface composition of the Ti-6Al-4V implant alloy by cultured macrophage cells.* Applied Surface Science, 225 (2004) 21-28.

Jarcho, M. *Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics.* Clinical Orthopaedics Related Research, 157 (1981) 259-278.

Kaluđerović, M.R., Schreckenbach, J.P., Hans-Ludwig Graf. *Titanium dental implant surfaces obtained by anodic spark deposition –From the past to the future.* Materials Science and Engineering C, 69 (2016) 1429-1441.

Kui Cheng, Ge Shen, Wenjian Weng, Gaorong Han, Ferreira, J.M.F., Juan Yang. *Synthesis of hydroxyapatite/fluoroapatite solid solution by a sol-gel method.* Materials Letters, 51 (2001) 37-41.

Lekholm, U., Gröndahl, K., Jemt, T. *Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function.* Clinical Implant Dentistry and Related Research (2006) 178-186.

Li, D., Ferguson, S.J., Beutler, T., Cochran, D.L., Sittig, C., Hirt, H.P., Buser, D. *Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants.* Journal of Biomedical Materials Research, 60 (2002) 325-332.

Massaro, C., Rotolo, F., De Riccardis, F., Milella, E., Napoli, A., Wieland, M., Textor, M., Spencer, N.D., Brunette, D.M. *Comparative investigation of the surface of commercial titanium*

dental implants. Part 1: chemical composition. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 13 (2002) 535-548.

Maxian, S.H., Zawadsky, J.P., Dunn, M.G. *Effect of Ca/P coating resorption and surgical fit on the bone/implant interface.* Journal of Biomedical Materials Research, 28 (1994) 1311-1319.

Medvedev, A.E., Ng, H.P., Lapovok, R., Estrin, Y., Lowe, T.C., Anumalasetty, V.N. *Effect of bulk microstructure of commercially pure titanium on surface characteristics and fatigue properties after surface modification by sand blasting and acid-etching.* Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 57 (2016) 55-68.

Mendonça, G., Mendonça, D.B.S., Aragão, F.J.L., Cooper, L.F. *Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography.* Biomaterials, 29 (2008) 3822-3835.

Mints, D., Elias, C., Funkenbusch, P., Meirelles, L. *Integrity of implant surface modifications after insertion.* The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants (2014) 97-104.

Natali, A.N., Carniel, E.L., Pavan, P.G. *Investigation of viscoelastoplastic response of bone tissue in oral implants press fit process.* Journal of Biomedical Materials Research B, Applied Biomaterials, 91 (2009) 868-875.

Pan, J., Thierry, D., Leygraf, C. *Electrochemical and XPS studies of titanium for biomaterial applications with respect to the effect of hydrogen peroxide.* Journal of Biomedical Materials Research, 28 (1994) 113-122.

Prasad, S., Ehrensberger, M., Prasad Gibson, M., Kim, H., Monaco Jr., E.A. *Biomaterial properties of titanium in dentistry.* Journal of Oral Biosciences, 57 (2015) 192-199.

Radin, S.R. y Ducheyne, P. *Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on in vitro stability.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 3 (1992) 33-42.

Romeo, E., Chiapasco, M., Ghisolfi, M., Vogel, G. *Long-term clinical effectiveness of oral implants in the treatment of partial edentulism.* Clinical Oral Implant Research, 13 (2002) 133-143.

Schreckenbach, J.P., Marx, G., Schlottig, F., Textor, M., Spencer, N.D. *Characterization of anodic spark-converted titanium surfaces for biomedical applications.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 10 (1999) 453-457.

Shah, F.A., Nilson, B., Brånemark, R., Thomsen, P., Palmquist, A. *The bone-implant interface – nanoscale analysis of clinically retrieved dental implants.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 10 (2014) 1729-1737.

Shemtov-Yona, K. y Rittel, D. *On the mechanical integrity of retrieved dental implants.* Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 49 (2015) 290-299.

Sul, Y.T., Byon, E., Wennerberg, A. *Surface characteristics of electrochemically oxidized implants and acid-etched implants: Surface chemistry, morphology, pore configurations, oxide*

thickness, crystal structure, and roughness. The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 23 (2008) 631-640.

Sykaras, N., Iacopino, A.M., Marker, V.A., Triplett, R.G., Woody, R.D. *Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review.* The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 15 (2000) 675-690.

Tengvall, P., Elwing, H., Sjöqvist, L., Lundström, I., Bjursten, L.M. *Interaction between hydrogen peroxide and titanium: a possible role in the biocompatibility of titanium.* Biomaterials, 10 (1989) 118-120.

Yan, Y., Neville, A., Dowson, D. *Biotribocorrosion of CoCrMo orthopaedic implant materials- Assessing the formation and effect of the biofilm.* Tribology International, 40 (2007) 1492-1499.

**CAPÍTULO 6. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES DE
TITANIO Y ALEACIONES DE TITANIO CON
MODIFICACIONES FÍSICAS O QUÍMICAS QUE
MEJORAN SU OSTEINTEGRACIÓN**

6. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO Y ALEACIONES DE TITANIO CON MODIFICACIONES FÍSICAS O QUÍMICAS QUE MEJORAN SU OSTEINTEGRACIÓN

6.1. INTRODUCCIÓN

En capítulos anteriores de esta tesis ya se han resaltado las bondades de las técnicas de caracterización superficial XPS y TOF-SIMS para valorar las modificaciones que ocurren en la superficie de los biomateriales tras estar en contacto con medios fisiológicos. Así, en el capítulo 4 se utilizan ambas técnicas para estudiar la adsorción de diferentes proteínas sobre biomateriales que presentan modificaciones superficiales, obteniéndose información sobre cómo estas modificaciones influyen en la adsorción de las proteínas. Por otra parte, en el capítulo 5, se pone de manifiesto que mediante XPS es posible obtener información del envejecimiento sufrido en la superficie de implantes dentales retirados. Además, se comprueba que esta técnica permite la detección de restos orgánicos en la superficie del material y su difusión hacia el interior del mismo. En este capítulo, ambas técnicas se van a utilizar para la caracterización de superficies que han sido modificadas física o químicamente para conseguir mejorar la respuesta de los materiales ante un entorno biológico. Es de esperar que los cambios químicos realizados en la superficie de las muestras sean detectados mediante XPS y TOF-SIMS, debido a su especificidad química y a su sensibilidad superficial, pero se va a poner de manifiesto que estas técnicas también permiten generar información relevante cuando estas modificaciones no implican el uso de especies químicas diferentes.

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta tesis, la modificación superficial de los dispositivos médicos implantables es una estrategia común para resolver problemas de mala integración (Bauer, S. *et al.*, 2013). El perfeccionamiento de las características de la superficie del biomaterial pasa por procurar que sean menos proclives a la oxidación, a la rotura de la capa superficial, con la consiguiente liberación de fragmentos del material al entorno, o a que ofrezcan a las células un entorno más adecuado para su desarrollo. Por ello, al modificar las propiedades superficiales, alterando la funcionalidad de la superficie o mediante la deposición de películas delgadas sobre ella, se crean superficies con propiedades químicas y físicas optimizadas para la respuesta biológica posterior.

Una de las estrategias para mejorar la implantación en el organismo de los materiales metálicos, como el titanio, es modificar las características de su capa de óxido. Ya se ha mencionado que a pesar de que la capa de pasivación espontánea que se produce en las superficies de titanio está muy bien adherida, es posible mejorar su biocompatibilidad modificando las características de la misma, con el fin de que sea más resistente a los ataques, tanto químicos como mecánicos, que pueda sufrir una vez implantado. Un procedimiento para poder conseguir capas de óxido mejoradas es la oxidación térmica. Con esta técnica, en el caso del titanio, se generan capas de óxido, densas y con estructuras ordenadas, compuestas fundamentalmente por dióxido de titanio en la forma de rutilo altamente cristalino (Browne, M. y Gregson, P.J., 1994), que mejoran el rendimiento del biomaterial (García-Alonso, M.C. *et al.*,

2003). Sin embargo, esta técnica tiene algunas limitaciones, y la que mayores consecuencias puede tener para los biomateriales es que la pieza completa tiene que ser sometida a las condiciones de temperatura que requiere el procedimiento. Este hecho puede perjudicar algunas de sus propiedades mecánicas, como por ejemplo, su resistencia a la fatiga. Por lo tanto, aquellos tratamientos superficiales que promuevan la formación de capas de óxido resistentes en la superficie de los biomateriales sin comprometer sus propiedades mecánicas, son de gran interés en el campo de la implantología.

En este capítulo se estudian mediante XPS y TOF-SIMS las modificaciones que provoca en la química superficial una de las alternativas a la oxidación térmica, que es el proceso de percusión por láser pulsado, también conocido como láser peening (LP) (Fig. 1). En esta técnica las superficies son irradiadas con pulsos láser, muy energéticos y muy focalizados a una zona puntual que, dependiendo de los parámetros elegidos para estos, pueden conseguir modificar la rugosidad de la superficie del material, pudiendo llegar incluso a crear pequeños orificios (Mirhosseini, N. *et al.*, 2007) (Khosroshahi, M.E. *et al.*, 2007). Al incidir estos pulsos sobre el material, se produce una onda de choque que induce una deformación plástica de la zona superficial, originando la aparición de tensiones residuales que mejoran las propiedades mecánicas del implante (Montross, C.S. *et al.*, 2002), modifican la topografía de la zona irradiada (Mirhosseini, N. *et al.*, 2007) (Khosroshahi, M.E. *et al.*, 2007) y provocan una fuerte oxidación, consecuencia del gran aumento de la temperatura en la zona irradiada, especialmente si el material se encuentra inmerso en un medio confinante para las ondas de presión, como por ejemplo, agua.

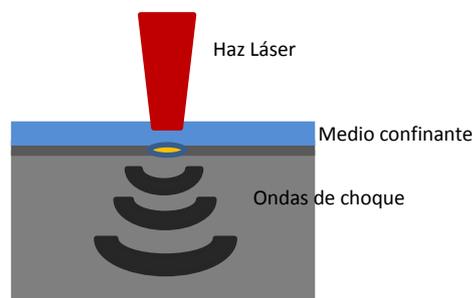


Figura 1. Esquema de tratamiento con láser peening sobre superficie metálica.

Otra de las posibles actuaciones para mejorar el resultado de la implantación de los materiales en el organismo sería hacer sus superficies bioactivas, es decir, hacerlas capaces de responder a señales provenientes del medio fisiológico, induciendo una respuesta específica del tejido biológico circundante. En la actualidad, la mayoría de los estudios realizados para conseguir este tipo de superficies se centran en su modificación química. Para ello se suelen inmovilizar en la superficie, o bien biomoléculas como las que intervienen en el sistema biológico, de modo que la superficie mimate en cierto grado el mismo ambiente, como por ejemplo, proteínas o péptidos extracelulares y factores de crecimiento (Guillot, R. *et al.*, 2013) (Yan Li *et al.*, 2011), o bien otras moléculas orgánicas que puedan proveer al material de características adecuadas para que sea reconocido favorablemente por las células humanas, promoviendo su adhesión y proliferación, es decir, mejorando su osteointegración (Fig. 2). En

este capítulo se va a poner de manifiesto cómo las técnicas de XPS y TOF-SIMS permiten obtener información sobre la modificación que se produce en la superficie por la incorporación de moléculas orgánicas de efectividad reconocida como son los flavonoides y las sales del ácido fítico.

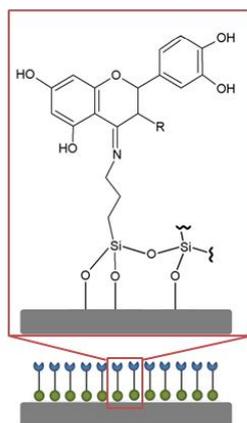


Figura 2. Esquema de la unión covalente de un flavonoide a una superficie de titanio, utilizando un silano como agente enlazante (Imagen recuperada de Córdoba, A. *et al.*, 2015-B).

Los flavonoides son pequeños compuestos polifenólicos con conocidas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y antialérgicas ubicadas en la naturaleza y presentes en la dieta humana (Amic, D. *et al.*, 2007). Los mecanismos de acción de los flavonoides no son muy conocidos, pero sus efectos protectores en los sistemas biológicos se atribuyen principalmente a sus potentes propiedades antioxidantes y su capacidad para interactuar con las proteínas (Heim, K.E. *et al.*, 2002). En algunos estudios se ha conseguido crear revestimientos de polifenoles sobre diferentes sustratos que se ha comprobado que tienen una influencia positiva sobre la regeneración ósea (Satué, M. *et al.*, 2013), aunque no está claro cuál es la estructura exacta de ese recubrimiento (Sileika, T.S. *et al.*, 2013) (Barrett, D.G. *et al.*, 2014).

Otra molécula natural que se utiliza para funcionalizar la superficie de biomateriales es la sal sódica del ácido fítico o hexafosfato de inositol (IP6), que es un ácido orgánico que contiene fósforo en su composición y que está presente en los vegetales, sobre todo en las semillas y legumbres (Irvine, R.F. y Schell, M.J., 2001). Entre las propiedades del IP6 beneficiosas para la biomedicina están la capacidad de estas moléculas de inhibir la aparición de calcificaciones, es decir la cristalización de sales de calcio (Grases, F. *et al.*, 2007), su potencialidad para reducir la pérdida de masa ósea, ya que estas moléculas se adsorben sobre la superficie de la hidroxiapatita, el constituyente mineral del hueso, inhibiendo su disolución (López-González, A.A. *et al.*, 2013) y sus efectos antioxidantes (Hawkins, P.T. *et al.*, 1993). Asimismo, se ha observado un interesante carácter antimicrobiano de las moléculas IP6, ya que se ha comprobado que frenan el crecimiento de varias bacterias gram-positivas y gram-negativas (Moon, J.H. *et al.*, 2011).

6.1.1. Objetivos de este capítulo

En este capítulo se pone de manifiesto cómo el uso de las técnicas de XPS y TOF-SIMS permite obtener información sobre las modificaciones que se provocan en las superficies de los materiales, ya sea por procesos físicos aplicados a estas, o como consecuencia de reacciones químicas que se producen sobre las superficies. Para ello se analizan los cambios sufridos en la capa de óxido de una superficie de Ti6Al4V al ser tratada físicamente mediante láser peening. Además, se pretende poder resaltar la capacidad de ambas técnicas para caracterizar el cambio sufrido en superficies de titanio al fijar sobre ellas moléculas de interés biológico. Con este fin se van a analizar los recubrimientos sobre titanio de dos flavonoides, quercitrina y taxifolina, que son moléculas formadas exclusivamente por carbono, oxígeno e hidrógeno, elementos generalmente presentes también en las superficies antes de ser recubiertas, y de la sal sódica de myo-inositol-hexafosfato, molécula que además de los elementos anteriores contiene fósforo y sodio.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

6.2.1. Modificaciones superficiales

6.2.1.1. Modificación física superficial de muestras de aleación de titanio

El material empleado para ser sometido a la modificación de su superficie por procedimientos físicos ha sido la aleación de titanio Ti6Al4V. Este material fue procesado en el Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas, CENIM-CSIC (Madrid, España) para ser tratado posteriormente mediante láser peening en el Centro de Aplicaciones Láser, AIMEN (Porriño, España).

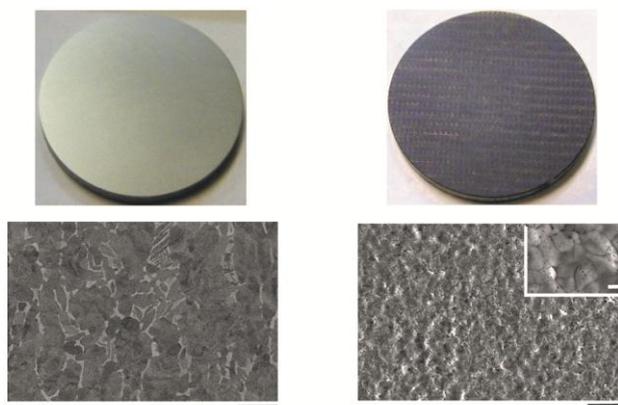


Figura 3. Cambios en la topografía producidos por el tratamiento con láser: a) muestras de Ti6Al4V control y b) muestra de Ti6Al4V tratada con láser. La barra negra corresponde a 200 μm y la blanca en el cuadro de ampliación a 20 μm .

Las muestras empleadas consisten en probetas de 2 mm de espesor y 21 mm de diámetro de la aleación Ti6Al4V (Surgival, España). Pevio a su tratamiento con láser, los sustratos fueron

sometidos a un proceso de pulido hasta acabado brillo espejo y posteriormente limpiados con un chorro de agua caliente y sonicados en alcohol, tal y como se describe en el trabajo publicado por L. Crespo *et al.* (Crespo, L., *et al.*, 2016). Parte de estas muestras pulidas se reservaron como controles. El resto de discos fueron tratados con un papel de lija de carburo de silicio de 2400 y posteriormente irradiados con un equipo Spectra Physics Quanta Ray Pro, compuesto por un láser PRO 290-30 Q-switched que produce pulsos de 10 ns, con una frecuencia de 30 Hz y una energía de 1,6 J/pulso. Las muestras fueron sumergidas en una cubeta con agua destilada, empleada como medio confinante y fueron irradiadas con el haz láser enfocado con una lente, a una densidad de 421 pulsos/cm², de tal forma que se generaron huellas en la superficie de 2,4 mm de diámetro con una superposición del 80% (Crespo, L., *et al.*, 2016) (Fig. 3). Tras el tratamiento con láser, las muestras fueron limpiadas con agua destilada.

6.2.1.2. Modificación química superficial de muestras de titanio

El material base sobre el que se hicieron modificaciones químicas con el fin de conseguir superficies bioactivas fue titanio. Estos recubrimientos fueron preparados en conjunto por el Grupo de Terapia Celular e Ingeniería Tissular, del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, IUNICS (Palma de Mallorca, España) y el Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (Palma de Mallorca, España).

En este caso, las muestras consistieron en probetas de 6,2 mm de diámetro y 2 mm de espesor de titanio (Implantmedia, España). Estas fueron pulidas mecánicamente hasta un acabado brillo espejo y limpiadas de la forma descrita por S.F. Lamolle *et al.* (Lamolle, S.F. *et al.*, 2009) antes de ser funcionalizadas. Las moléculas seleccionadas para recubrir las superficies de titanio fueron los flavonoides quercitrina (QR) y taxifolina (TX) (Sigma Aldrich, USA), y fitato de hexasodio (sal sódica de myo-inositol-hexafosfato, IP6Na6) (Almac Sciences, U.K), cuyas estructuras moleculares se presentan en la figura 4. Las muestras que se funcionalizaron con flavonoides, previamente, fueron pasivadas con HNO₃ (Scharlab, España) y silanizadas con (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (Sigma Aldrich, USA), tal y como se describe en los trabajos presentados por A. Córdoba *et al.* (Córdoba, A. *et al.*, 2015-A y B). En el caso de los sustratos en los que se fijaron moléculas de IP6Na6, estos fueron sometidos a un pasivado con HNO₃ o HF (Fisher Scientific, España), como paso previo a la funcionalización, tal y como se presenta en el trabajo de A. Córdoba *et al.* (Córdoba, A., *et al.*, 2016).

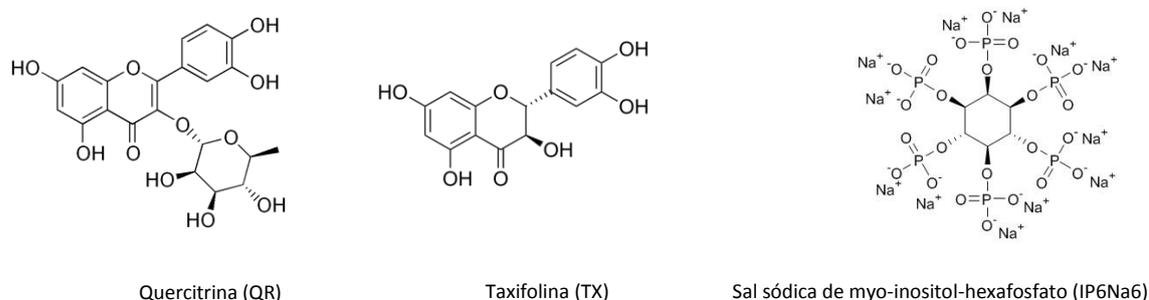


Figura 4. Estructura molecular de quercitrina (QR), taxifolina (TX) (Imágenes recuperadas de Córdoba, A. *et al.*, 2015-B) y sal sódica de myo-inositol-hexafosfato (IP6Na6) (Imagen recuperada de página web 1).

6.2.2. Técnicas de caracterización

6.2.2.1. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La caracterización de la superficie de las muestras con modificaciones superficiales físicas o químicas mediante XPS se realizó con un equipo K-Alpha (Thermo Scientific, UK), que ya ha sido descrito en los capítulos anteriores. El punto del haz incidente elegido para estas medidas tenía un tamaño de 300 μm , en disposición elipsoidal, y todas las medidas se realizaron en el interior de la cámara de ultra alto vacío, que operaba entorno a 1E^{-8} mbar. Sobre las muestras sometidas a tratamiento con láser se realizó un proceso de limpieza superficial aplicando un bombardeo de iones de Ar^+ de 3 KeV durante 5 s, tras el que posteriormente se tomaron las medidas utilizadas en el análisis mediante XPS. El análisis de los espectros de XPS se realizó con el software Advantage, proporcionado por la casa comercial del equipo y para la corrección de posibles desplazamientos en las energías de enlace de los elementos se utilizó como referencia el pico del C1s, que está situado a 285 eV de energía. Para restar el fondo de los espectros generales se utilizó el método de Shirley. Los picos de alta resolución se ajustaron utilizando una mezcla de curvas Gaussiana y Lorentziana con el software XPSPeak (version 4,1), tal y como se describe en capítulos previos.

6.2.2.2. Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo (TOF-SIMS)

Además de la caracterización mediante XPS, algunas de las muestras tratadas con láser y funcionalizadas con IP6Na6 fueron caracterizadas mediante TOF-SIMS, con un equipo TOF-SIMS⁵ (ION TOF, Alemania), que ya ha sido descrito en capítulos anteriores. Para el caso de estas muestras se utilizó como haz primario Bi^+ , que opera a 25 kV y las medidas se realizaron en modo estático. El área analizada fue de $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ para las muestras tratadas con láser y de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ para las muestras funcionalizadas, con una densidad iónica de recogida por encima de 1E^{12} iones/ cm^2 en cada espectro. Todas las medidas se realizaron en el interior de una cámara de ultra alto vacío a una presión de $1,2\text{E}^{-8}$ mbar. La energía de extracción aplicada a los iones secundarios fue de 11 kV. Para obtener los espectros de masas de estas muestras se recogieron los iones negativos y se realizó una calibración de espectros con los siguientes iones: H^- , C^- , CH^- , CH_2^- , O^- , OH^- , OH_2^- , C_2^- y C_3^- . Además, en las muestras sometidas a tratamiento con láser se realizó un estudio en profundidad, aplicando un bombardeo de iones Cs a 2kV.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Caracterización de la superficie de los sustratos de Ti6Al4V sometidos a una modificación física mediante LP

Los resultados obtenidos tras el análisis mediante XPS de las muestras de Ti6Al4V control y sometidas a un tratamiento de tipo físico mediante láser peening (LP) se muestran en la figura 5. En ambos tipos de muestras se detectan los picos relacionados con los elementos que componen el sustrato; Al2p, Ti2p, V2p y O1s (este último por la capa de óxido presente en la

superficie de las muestras). Además, se observan elementos procedentes de la contaminación ambiental, como C y N, y de restos que se pueden haber transferido a la muestra durante el proceso de fabricación o pulido, como Si, P, F, Fe y Zn.

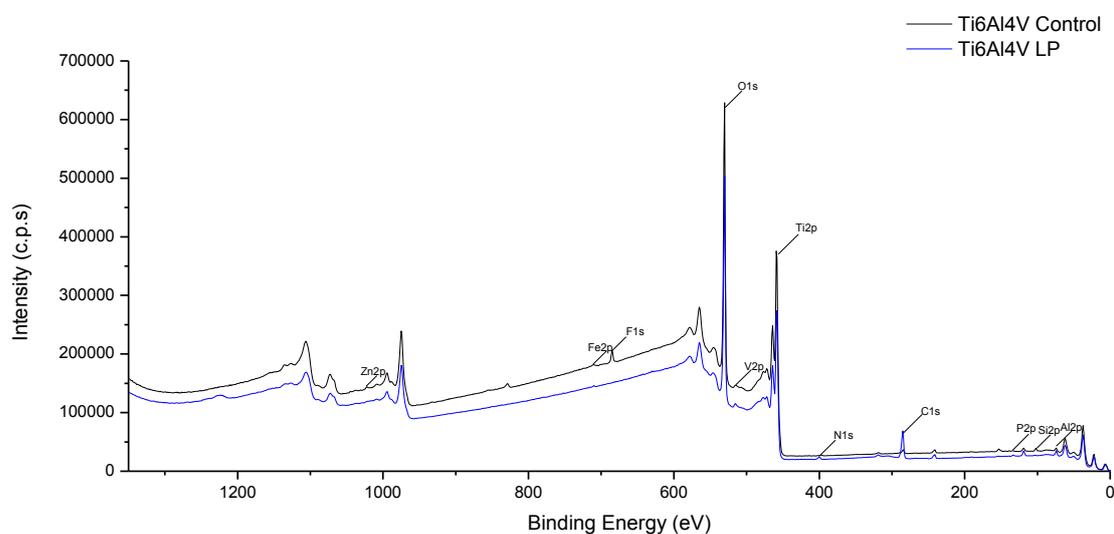


Figura 5. Espectro XPS de la superficie de las muestras de Ti6Al4V control (representado en negro) y tratada con láser peening (representado en azul).

Se espera que los cambios en composición química más significativos que provoca el tratamiento mediante LP estén relacionados con la oxidación de la superficie de los sustratos de la aleación Ti6Al4V. Por este motivo se tomaron los picos del Ti2p, O1s, C1s y Al2p en alta resolución para así poder hacer un análisis mediante deconvolución de los mismos. En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos en el pico del Ti2p y del Al2p, ya que el resto de picos de alta resolución analizados arrojó los mismos resultados para las muestras control y las tratadas con láser. Para ambas muestras, tras la deconvolución del pico del Ti2p, se detecta un pico principal situado a 458,2 eV de energía de enlace, que corresponde con el estado del titanio $Ti^{4+}2p_{3/2}$ y está relacionado con el óxido TiO_2 . El pico correspondiente al desdoblamiento espín-órbita, $Ti^{4+}2p_{1/2}$, se encuentra desplazado 5,7 eV con respecto al anterior. Se puede observar una segunda contribución a este pico, relacionada con el óxido Ti_2O_3 , cuyas picos se encuentran a unas energías de enlace de 456,4 eV y 461,9 eV para los estados $Ti^{3+}2p_{3/2}$ y $Ti^{3+}2p_{1/2}$, respectivamente. Este estado de oxidación del titanio contribuye de forma mucho menor a la muestra control que a la muestra tratada con láser. Además, en el análisis realizado para en el pico Ti2p de la muestra control (Fig. 6a), se detecta una pequeña cantidad de titanio metálico, Ti^0 , cuyo pico $Ti^0 2p_{3/2}$ se sitúa a 454,0 eV de energía de enlace. De estos resultados se puede deducir que la capa de óxido que se crea sobre las superficies de Ti6Al4V que son sometidas a tratamiento con LP es más gruesa que la película de pasivado natural que se encuentra sobre las muestras control. Además, las muestras tratadas con láser contienen una cantidad importante del óxido de titanio Ti_2O_3 (Fig. 6b). Las energías de enlace obtenidas para los distintos estados de oxidación del titanio concuerdan con los resultados descritos en el capítulo 3 de esta tesis y además están de acuerdo con los datos publicados en los estudios realizados por A.F. Carley *et al.* (Carley, A.F. *et al.*, 1987) y por M.C. Biesinger *et al.* (Biesinger, M.C. *et al.*, 2010).

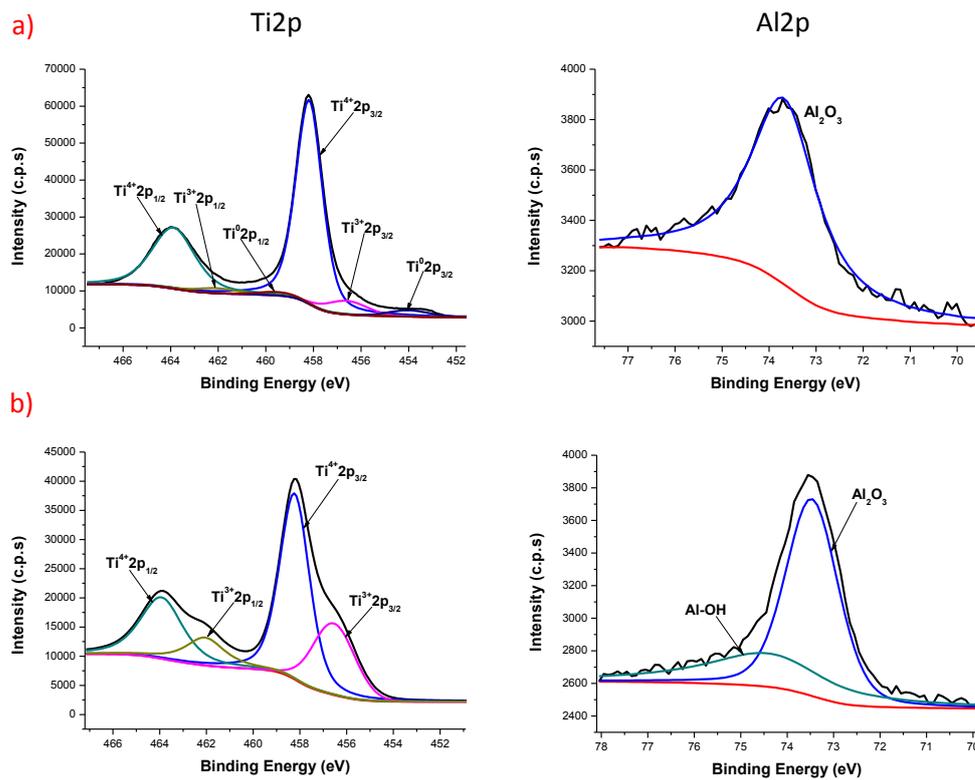


Figura 6. Picos de alta resolución del Ti2p y Al2p: a) para las muestras de Ti6Al4V control y b) para las muestras de Ti6Al4V tratadas con láser.

La forma y la posición del pico del Al2p (Fig. 6) muestran que el estado de oxidación del aluminio se encuentra principalmente en la forma Al^{3+} , que corresponde al óxido Al_2O_3 , cuyo pico se centra en una energía de enlace de 73,7 eV, tanto para las muestras control como para las tratadas con láser (Iatsunskyi, I. *et al.*, 2015). Además, para las muestras tratadas mediante LP se detectó otra contribución en el pico del Al2p, situada a 74,5 eV de energía de enlace, y que está asociada al enlace Al-OH (Iatsunskyi, I. *et al.*, 2015). La presencia de grupos OH enlazados con el aluminio puede estar relacionado con el uso de agua como medio confinante en el proceso de tratamiento mediante LP. Los valores obtenidos de la energía de enlace para los picos que se corresponden con los estados de oxidación de aluminio son un poco más bajos que los publicados en otros estudios (Yu-Jhen Liou *et al.*, 2013), hecho que puede estar causado también por la exposición a una atmósfera húmeda durante el proceso de oxidación (Nylund, A. y Olefjord, I., 1994).

Los perfiles de profundidad obtenidos mediante TOF-SIMS para las muestras tratadas con láser se muestran en la figura 7. Se ha realizado un estudio de la evolución de los iones OH, TiO, TiO_2 y AlO en las muestras de Ti6Al4V control (representado en negro en la figura 7) y en las de la aleación Ti6Al4V LP (representado en azul en la figura 7). Para estimar la profundidad alcanzada en las muestras tras el bombardeo con iones Cs realizado con TOF-SIMS, se enviaron las muestras al CENIM-CSIC para realizar medidas del tamaño de los cráteres que se generan en las mismas utilizando perfilometría óptica, usando un perfilómetro óptico Zeta-20 (Zeta Instruments, CA, USA). Con los resultados aportados por esta técnica y observando los perfiles

de profundidad obtenidos mediante TOF-SIMS se determina que los iones estudiados se observan a mayor profundidad para las muestras tratadas con láser que para las control. El perfil de profundidad obtenido para el ion OH en la muestra tratada con LP confirma que este ion está presente en la parte más externa de la capa de óxido de estas muestras, tal y como se obtiene en los estudios realizados mediante XPS. Este hecho se puede constatar observando que el ion OH se encuentra en las muestras hasta un tiempo de arrase similar al del ion TiO_2 . Los iones de los óxidos de titanio en las muestras tratadas con LP muestran una diferencia en cuanto a su distribución en la capa de óxido, ya que el máximo de la cantidad del ion TiO_2 observada se encuentra situado a tiempos de arrase mucho más cortos que el del ion TiO. Este resultado indica que los óxidos de titanio que se encuentran en la capa más externa de las muestras Ti6Al4V LP están más saturados en oxígeno que los que se sitúan en capas más profundas, debido a una menor disponibilidad de oxígeno.

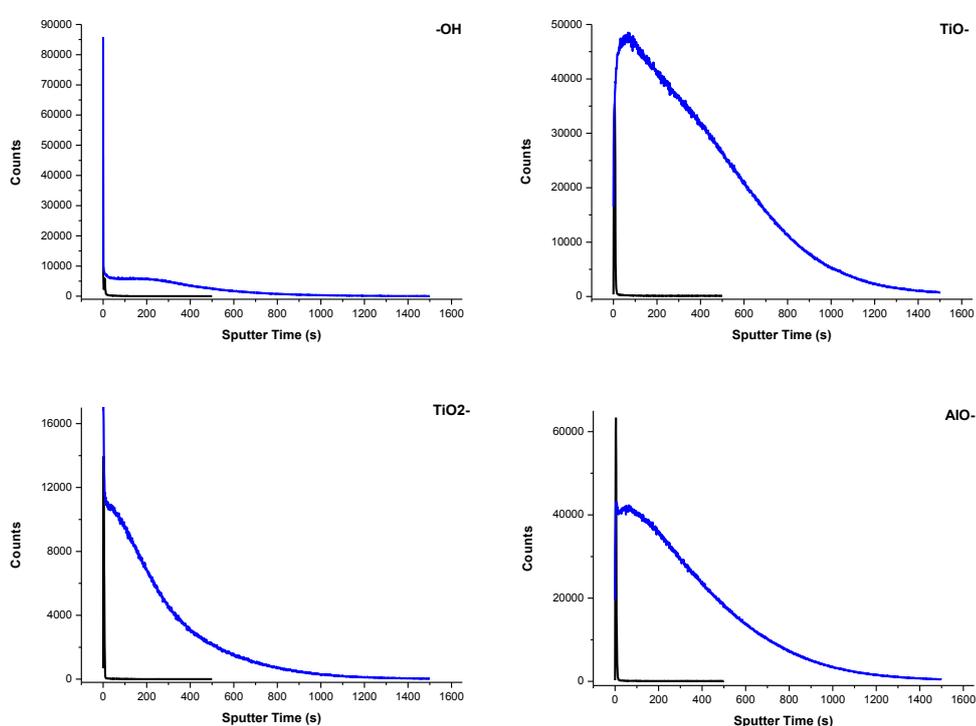


Figura 7. Perfiles de profundidad de los iones OH, TiO, TiO_2 y AlO obtenidos mediante TOF-SIMS para las muestras de Ti6Al4V (representada en negro) y Ti6Al4V LP (representada en azul).

El estudio posterior que se realizó con las muestras tratadas mediante LP probó que los cambios producidos en la topografía y en la composición química de la superficie de Ti6Al4V LP afecta favorablemente la adhesión de células madre mesenquimales humanas y osteoblastos, incluyendo cambios morfológicos (Crespo, L. *et al.*, 2016). Además hay estudios sobre cómo estos cambios pueden afectar a la adsorción de las proteínas que actúan como mediadoras entre la superficie del material y las células (Deligianni, D.D. *et al.*, 2001) (MacDonald, D.E. *et al.*, 2004).

6.3.2. Caracterización de la superficie de los sustratos de titanio sometidos a modificaciones químicas

Los resultados obtenidos mediante XPS para las superficies que han sido modificadas químicamente, junto con sus controles, se presentan en la figura 8, para el caso de los sustratos de titanio funcionalizados con flavonoides.

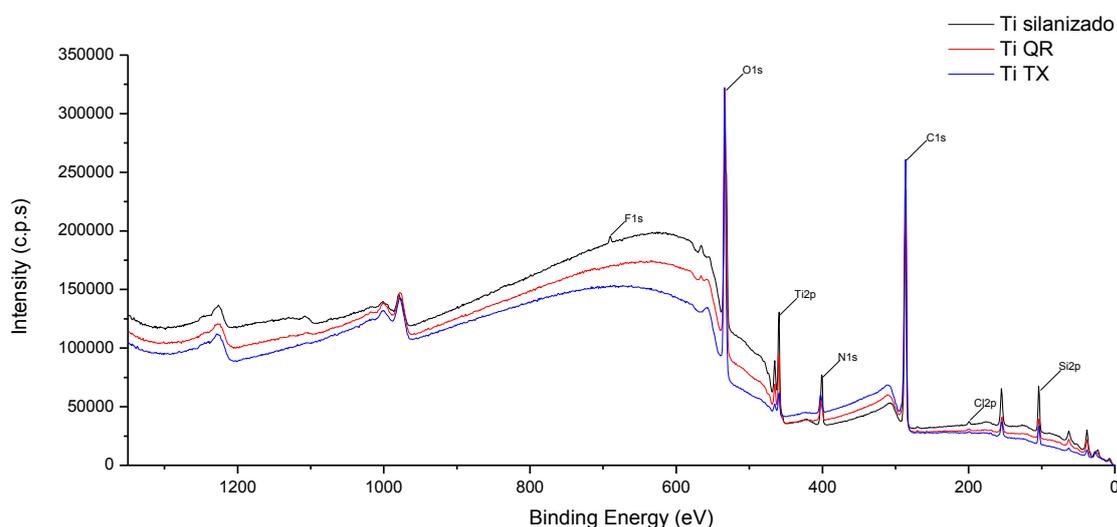


Figura 8. Espectro XPS obtenido de la superficie de los sustratos de Ti silanizados (representado en negro) y de esos sustratos tras ser funcionalizados con quercitrina (QR, representados en rojo) y taxifolina (TX, representados en azul).

La figura 8 representa el espectro de la muestra de titanio que se ha utilizado como control (representado en negro) y que como ya se ha indicado está silanizada para permitir la fijación posterior de los flavonoides. En este espectro se observa la presencia en la superficie de los elementos Ti, O, Si y N junto con C, que son elementos característicos del material del que está compuesto el sustrato, titanio y del silano (APTES) empleado como molécula de enlace, que está compuesto por C, O, Si y N. Aunque también es posible que parte de la contribución de C y O provenga de especies contaminantes del ambiente adsorbidas sobre la muestra. Asimismo, se detecta la presencia de F y Cl, contaminantes probablemente incorporados a las superficies en los pasos previos de preparación de las muestras. En la figura 8 también se muestran los espectros que corresponden a las superficies ya funcionalizadas con quercitrina (representado en rojo) y taxifolina Representado en azul). En comparación con el espectro de la muestra control, destaca especialmente el aumento de los picos C1s y O1s, indicativos de la existencia de un recubrimiento sobre la superficie de estas moléculas, compuestas fundamentalmente por los elementos C, O e H. También destaca el hecho de que los elementos contaminantes que aparecían en el espectro de la muestra control, no son ahora detectables, ya que es probable que el espesor del recubrimiento obtenido sea suficiente como evitar su presencia en la capa más externa. Como ya se ha indicado, los sustratos de Ti funcionalizados con flavonoides fueron previamente silanizados y este hecho se refleja claramente en los resultados obtenidos mediante XPS, ya que se detectan, en mayor o menor medida, los picos característicos de los elementos que componen el sustrato silanizado, como son Ti, O, Si y N.

Puesto que las moléculas de QR y TX están compuestas por C, H y O, el análisis de los picos de alta resolución de estos elementos, exceptuando el hidrógeno que está fuera de las posibilidades de esta técnica, tomados en la superficie de las muestras funcionalizadas (Fig. 9) permite conocer más detalladamente el cambio provocado en la superficie como consecuencia del tratamiento químico. La deconvolución del pico de alta resolución del C1s muestra tres contribuciones a este pico, tanto para las muestras con QR como para las que están funcionalizadas con TX (Fig. 9 a y b). La primera contribución está situada a 288,0 eV de energía de enlace y se relaciona con la unión C=O. La segunda está situada a una energía de enlace de 287,1 eV y está relacionada con la unión C=N. Por último, la tercera contribución al pico del C1s se encuentra situada a 285,2 eV, que puede estar relacionada con la unión C-OH. Es especialmente relevante la presencia de la unión correspondiente al grupo imina (C=N), ya que su presencia en las muestras funcionalizadas confirma la existencia de una unión covalente entre las moléculas de los flavonoides y las de los silanos que conforman la muestra control. Este resultado permite confirmar que sobre la superficie del material ha tenido lugar una reacción química entre las moléculas de los flavonoides y el APTES, indicada en el trabajo presentado por A. Córdoba *et al.* (Córdoba, A. *et al.*, 2015-B). Por otra parte, la deconvolución del pico del O1s obtenido en la superficie de estas muestras, presenta dos contribuciones a este pico, una situada entre 530,5 eV y 531,5 eV y la otra a 533,5 eV de energía de enlace. Ambas contribuciones se relacionan con los enlaces Ti-O (el rango de energías de enlace que se encuentra en la literatura para esta unión varía entre 529,6 eV y 531,7 eV, página web 2) y C-OH, respectivamente, sugiriendo la presencia de una capa hidratada en la superficie.

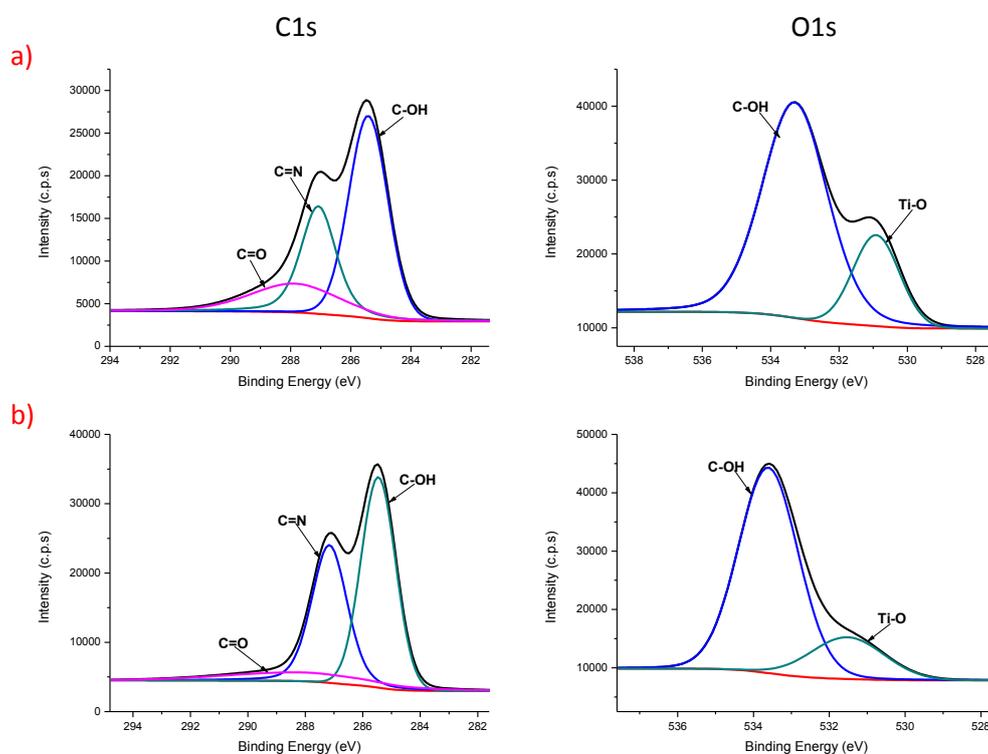


Figura 9. Picos de alta resolución del C1s y O1s: a) para las muestras de Ti QR, b) para las muestras Ti TX.

Para el caso de las muestras cuya funcionalización se hizo con fitato de hexasodio (IP6Na6), los resultados obtenidos mediante XPS se presentan en la figura 10. En esta figura se muestran los espectros de la muestra control (representado en negro) y de las muestras recubiertas y pasivadas con ácido nítrico (representado en rojo) o con ácido fluorhídrico (representado en azul). En el espectro de la muestra control se encuentran los picos correspondientes al material utilizado como sustrato, titanio, es decir, Ti y O, puesto que la capa más externa del titanio está oxidada. Además se detectan N y C, probablemente provenientes de moléculas adsorbidas del ambiente. En los espectros de las muestras funcionalizadas con IP6Na6 se aprecian claramente las diferencias que la funcionalización proporciona a los sustratos de Ti. En ellas siguen estando presentes los elementos relacionados con el sustrato (O y Ti) pero además se observa P y Na, que forman parte de la composición de la molécula de fitato de hexasodio. Los espectros de las muestras que han sido pasivadas con diferentes ácidos presentan restos de los mismos, ya que se puede observar un pequeño pico de F en la muestra Ti-IP6 (HF) y un aumento en la cantidad del N en la Ti-IP6 (HNO₃). El resto de elementos detectados, Si, Mg, Ca y S están relacionados con la contaminación de las muestras en el proceso de pulido, de pasivado o en la funcionalización.

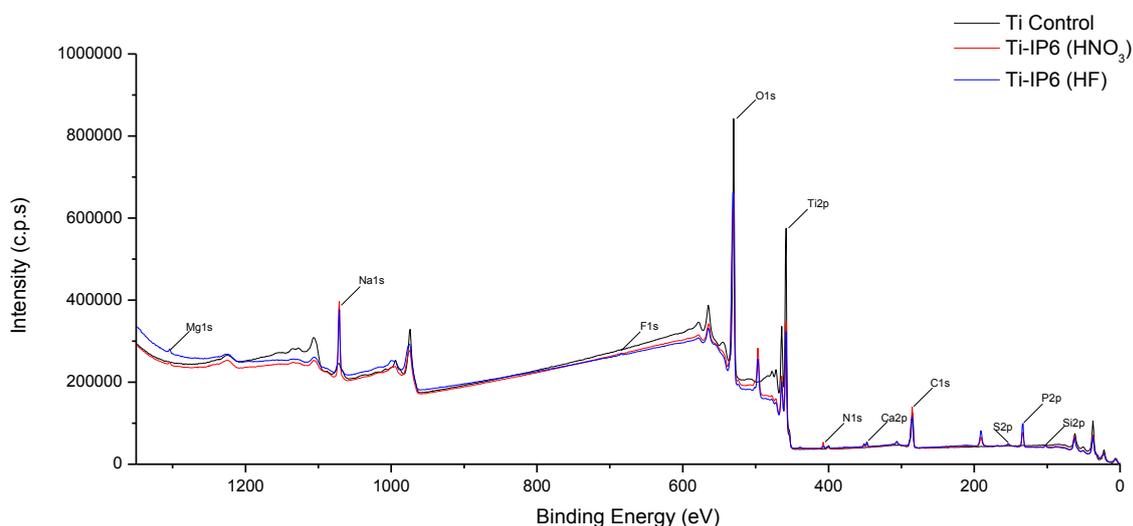


Figura 10. Espectro XPS obtenido de la superficie de los sustratos de Ti control (representado en negro) y de esos sustratos tras ser pasivados con HNO₃ y funcionalizados con IP6Na6 (Ti-IP6 HNO₃, representados en rojo) y pasivados con HF y funcionalizados con IP6Na6 (Ti-IP6 HF, representados en azul).

La deconvolución de los picos de C1s y O1s que se obtiene para los espectros de alta resolución obtenidos en la superficie de las muestras de titanio tratadas previamente con HNO₃ y HF y funcionalizadas con IP6Na6 se muestran en la figura 11. Independientemente del ácido empleado (HNO₃ y HF), la deconvolución del pico del C1s muestra tres contribuciones. La mayor de ellas está relacionada con el enlace C-C y C-H, la cual se encuentra a 284,2 eV de energía de enlace. Las otras dos contribuciones situadas a 286,1 eV y 287,9 eV, respectivamente, están asociadas con los enlaces C-OH y C=O y estarían relacionadas con la contaminación ambiental. A diferencia del recubrimiento con flavonoides, para este recubrimiento, se obtiene mayor información a partir de la deconvolución del pico de oxígeno que del carbono. La deconvolución del pico del O1s obtenida para estas muestras es más compleja, ya que presenta cuatro

contribuciones. La situada a menor energía de enlace, 530,0 eV, está relacionada con el enlace Ti-O. Se observa una segunda contribución a 531,3 eV de energía de enlace, asociada a los enlaces P-O-Ti y P=O (Adden, N. *et al.*, 2006) (Milošev, I. *et al.*, 2012) (Mani, G. *et al.*, 2008). La presencia de estos enlaces nos indica que ha tenido lugar una reacción química superficial, que está relacionada con la unión covalente entre la molécula de fitato de hexasodio y el sustrato de titanio. Para energías de enlace mayores, se detecta una contribución situada a 533,1 eV, relacionada con la unión C=O, y una contribución adicional, relacionada con el agua adsorbida en la superficie de las muestras, que está a 536,1 eV de energía de enlace (Puziy, A.M. *et al.*, 2008).

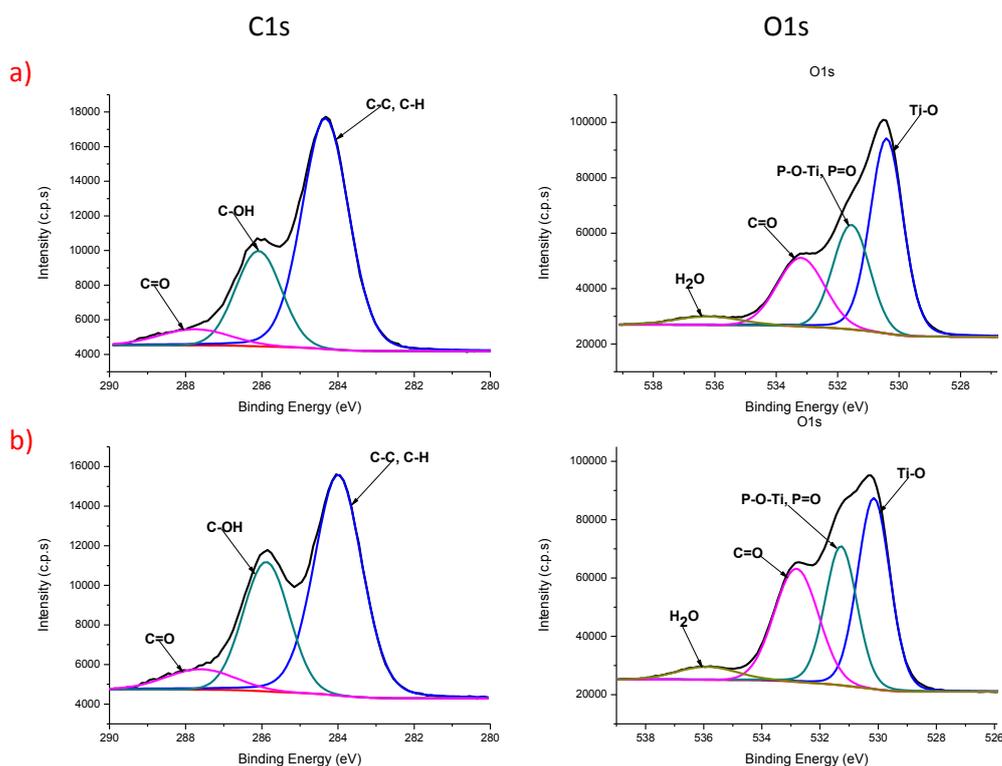


Figura 11. Picos de alta resolución del C1s y O1s: a) para las muestras Ti-IP6 HNO₃ y b) para las muestras Ti-IP6 HF.

Para confirmar la presencia del enlace covalente entre la molécula IP6Na6 y la superficie de Ti, en estas muestras se realizaron análisis mediante TOF-SIMS y los resultados se muestran en la tabla 1. En esta tabla se presentan los fragmentos de los iones negativos más característicos de las superficies de titanio funcionalizadas con el fitato. Los iones con valores de m/z comprendidos entre 46 y 79 se corresponden con los fragmentos de las moléculas de IP6Na6 y por lo tanto indican que dicha molécula está presente en la superficie de las muestras. Por otro lado, los iones con valores de m/z comprendidos entre 126 y 222 demuestran que se ha producido la unión covalente P-O-Ti entre la sal sódica del ácido fítico y el sustrato de Ti, en concordancia con los resultados obtenidos mediante XPS.

Tabla 1. Iones negativos obtenidos mediante TOF-SIMS en la superficie de las muestras pasivadas con HNO₃ o HF y funcionalizadas con Ip6Na6.

Ion	m/z
PO ⁻	46,9695
CHPO ⁻	59,9673
PO ₂ ⁻	62,9668
PO ₃ ⁻	78,9614
TiO ₂ ⁻	79,9338
TiO ₂ OH ⁻	96,9404
TiOPO ₂ ⁻	126,9023
TiO ₂ PO ₂ ⁻	142,9002
TiO ₂ PO ₃ ⁻	158,8972
TiOP ₂ O ₄ ⁻	189,8726
TiO ₂ P ₂ O ₄ ⁻	205,8689
TiO ₂ (PO ₂) ₂ CH ₂ ⁻	219,8716
TiOP ₂ O ₆ ⁻	221,8632

Estudios posteriores realizados en ambos grupos de superficies funcionalizadas muestran que, tanto los flavonoides taxifolina y quercitrina, como la molécula IP6Na6, tienen actividad biológica (Córdoba, A. *et al.*, 2015-A y B) (Córdoba, A. *et al.*, 2016). Estos hallazgos pueden tener un impacto clínico significativo ya que estas superficies bioactivas podrían tener aplicación para implantes dentales, mejorando su osteointegración, reduciendo la ocurrencia de periimplantitis y, por lo tanto, aumentando las tasas de éxito.

6.3.3. Estudio comparativo de las modificaciones superficiales físicas y químicas realizadas en muestras de Ti y Ti6Al4V

Para poder comparar los cambios en composición química que se producen en la superficie de los sustratos tratados con las modificaciones físicas y químicas estudiadas en este capítulo, se calculan las relaciones entre algunos de los elementos mayoritarios detectados en la superficie de las muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Relaciones entre los elementos presentes en la superficie de las muestras modificadas con láser y funcionalizadas con flavonoides e IP6Na6.

	Ti6Al4V Control	Ti6Al4V LP	Ti Silanizado	Ti QR	Ti TX	Ti Control	Ti-IP6 HNO ₃	Ti-IP6 HF
O/Ti	2,8	2,8	6,3	12,8	32,8	2,5	4,3	5,4
P/Ti	0,1	0,1	-	-	-	-	0,5	0,9
N/Ti	0,1	0,1	1,8	1,4	3,6	0,1	0,2	0,1
Al/Ti	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-
Na/Ti	-	-	-	-	-	-	0,8	0,7
C/N	18,1	17,8	6,8	19,1	23,4	20,7	10,8	17,7
Si/N	1,5	0,3	1,4	1,3	1,4	-	0,4	1,0

La relación entre los elementos presentes en la superficie de las muestras de Ti6Al4V no es muy diferente para las muestras control y para las tratadas con láser. Ya se ha visto anteriormente que la mayor diferencia que produce el tratamiento con LP en estas superficies está relacionado con el estado de oxidación de sus elementos y no tanto con los cambios en composición.

Tras la silanización de las superficies de Ti, la proporción Si/N encontrada es de 1,4 y la de C/N de 6,8, datos que concuerdan con los publicados para otros sustratos silanizados con APTES (Howarter, J.A. y Youngblood, J.P., 2006) (Song, Y-Y. *et al.*, 2010). Después de funcionalizar estas superficies con los flavonoides, la cantidad detectada de C aumenta considerablemente (51,1% para el Ti silanizado, 60,7% para el Ti QR y 66,3% para el Ti TX), hecho que concuerda con la presencia de moléculas orgánicas unidas a la superficie. Por otro lado, la relación Si/N para las muestras funcionalizadas se mantiene constante, indicando la presencia de la capa de APTES.

Por último para las muestras funcionalizadas con fitato de hexasodio, se aprecia un aumento en la cantidad de oxígeno con respecto a la muestra de titanio control. Además, en las superficies funcionalizadas, aparecen elementos como P y Na, que no están presentes en la superficie control. Todos estos datos son indicativos de la presencia de la molécula IP6Na6 en la superficie de los sustratos de Ti.

Por lo tanto, tras analizar los datos presentados en la tabla 2, se puede afirmar que el proceso de funcionalización de las superficies de titanio, tanto con flavonoides como con fitato de hexasodio, produce modificaciones en la superficie de las muestras que pueden ser detectados mediante XPS. Y por el contrario, en las superficies modificadas con láser no se aprecian cambios en la composición química, pero sí se detectan cambios significativos en el estado de oxidación de los elementos que componen el sustrato. Y estos cambios también se detectan mediante la técnica XPS.

BIBLIOGRAFÍA

Adden, N., Gamble, L.J., Castner, D.G., Hoffmann, A., Gross, G., Menzel, H. *Phosphonic acid monolayers for binding of bioactive molecules to titanium surfaces.* Langmuir, 22 (2006) 8197-8204.

Amic, D., Davidovic-Amic, D., Bešlo, D., Rastija, V., Lucic, B., Trinajstic, N. *SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids.* Current Medicinal Chemistry, 14 (2007) 827-845.

Barrett, D.G., Sileika, T.S., Messersmith, P.B. *Molecular diversity in phenolic and polyphenolic precursors of tannin-inspired nanocoatings.* Chemical Communications, 50 (2014) 7265-7268.

Bauer, S., Schmuki, P., von der Mark, K., Park, J. *Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces.* Progress in Materials Science, 58 (2013) 261-326.

Biesinger, M.C., Lau, L.W.M., Gerson, A.R., Smart, R.St.C. *Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn.* Applied Surface Science, 257 (2010) 887-898.

Browne, M. y Gregson, P.J. *Surface modification of titanium alloy implants.* Biomaterials, 15 (1994) 894-898.

Carley, A.F., Chalker, P.R., Riviere, J.C., Roberts, M.W. *The Identification and Characterisation of Mixed Oxidation States at Oxidised Titanium Surfaces by Analysis of X-Ray Photoelectron Spectra.* Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1, 83 (1987) 351-370.

Córdoba, A., Hierro-Oliva, M., Pacha-Olivenza, M.A., Fernández-Calderón, M.C., Perelló, J., Isern, B., González-Martín, M.L., Monjo, M., Ramis, J.M. *Direct covalent grafting of phytate to titanium surfaces through Ti-O-P bonding shows bone stimulating surface properties and decreased bacterial adhesion.* ACS Applied Materials and Interfaces, 8 (2016) 11326-11335.

Córdoba, A., Monjo, M., Hierro-Oliva, M., González-Martín, M.L., Ramis, J.M. *Bioinspired quercitrin nanocoatings: a fluorescence-based method for their surface quantification, and their effect on stem cell adhesion and differentiation to the osteoblastic lineage.* ACS Applied Materials and Interfaces, 30 (2015-A) 16857-16864.

Córdoba, A., Satué, M., Gómez-Florit, M., Hierro-Oliva, M., Petzold, C., Lyngstadaas, S.P., González-Martín, M.L., Monjo, M., Ramis, J.M. *Flavonoid-modified surfaces: multifunctional bioactive biomaterials with osteopromotive, anti-inflammatory, and anti-fibrotic potential.* Advanced Healthcare Materials, 4 (2015-B) 540-549.

Crespo, L., Hierro-Oliva, M., Barriuso, S., Vadillo-Rodríguez, V., Montealegre, M.A., Saldaña, L., Gómez-Barrena, E., González-Carrasco, J.L., González-Martín, M.L., Vilaboa, N. *On the interactions of human bone cells with Ti6Al4V thermally oxidized by means of laser shock processing.* Biomedical Materials, 11 (2016) 1-16.

Deligianni, D.D., Katsala, N., Ladas, S., Sotiropoulou, D., Amedee, J., Missirlis, Y.F. *Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption.* *Biomaterials*, 22 (2001) 1241-1251.

García-Alonso, M.C., Saldaña, L., Vallés, G., González-Carrasco, J.L., González-Cabrero, J., Martínez, M.E., Gil-Garay, E., Munuera, L. *In vitro corrosion behaviour and osteoblast responses of thermally oxidised Ti6Al4V alloy.* *Biomaterials*, 24 (2003) 19-26.

Grases, F., Isern, B., Sanchis, P., Perello, J., Torres, J. J., Costa-Bauza, A. *Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi.* *Frontiers in Bioscience*, 12 (2007) 2580-2587.

Guillot, R., Gilde, F., Becquart, P., Sailhan, F., Lapeyrere, A., Logeart-Avramoglou, D., Picart, C. *The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium.* *Biomaterials*, 34 (2013) 5737-5746.

Hawkins, P.T., Poyner, D.R., Jackson, T.R., Letcher, A.J., Lander, D.A., Irvine, R.F. *Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate.* *Biochemical Journal*, 294 (1993) 929-934.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.* *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (2002) 572-584.

Hofer, R., Textor, M., Spencer, N.D. *Alkyl phosphate monolayers, self-assembled from aqueous solution onto metal oxide surfaces.* *Langmuir*, 17 (2001) 4014-4020.

Howarter, J.A. y Youngblood, J.P. *Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane.* *Langmuir*, 22 (2006) 11142-11147.

Iatsunskyi, I., Kempinski, M., Jancelewicz, M., Zaleski, K., Jurga, S., Smyntyna, V. *Structural and XPS characterization of ALD Al₂O₃ coated porous silicon.* *Vacuum*, 113 (2015) 52-58.

Irvine, R.F. y Schell, M.J. *Back in the water: the return of the inositol phosphates.* *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2 (2001) 327-338.

Khosroshahi, M.E., Mahmoodi, M., Tavakoli, J. *Characterization of Ti6Al4V implant surface treated by Nd:YAG laser and emery paper for orthopaedic applications.* *Applied Surface Science*, 253 (2007) 8772-8781.

Lamolle, S.F., Monjo, M., Lyngstadaas, S.P., Ellingsen, J.E., Haugen, H.J. *Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: Surface characterization and in vivo performance.* *Journal of Biomedical Materials Research A* (2009) 581-588.

López-González, A.A., Grases, F., Monroy, N., Marí, B., Vicente-Herrero, M.T., Tur, F., Perelló, J. *Protective effect of myo-inositol hexaphosphate (phytate) on bone mass loss in postmenopausal women.* *European Journal of Nutrition*, 52 (2013) 717-726.

MacDonald, D.E., Rapuano, B.E., Deo, N., Stranick, M., Somasundaran, P., Boskey, A.L. *Thermal and chemical modification of titanium–aluminum–vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment.* *Biomaterials*, 25 (2004) 3135-3146.

Mani, G., Johnson, D.M. Marton, D., Dougherty, V.L., Feldman, M.D., Patel, D., Ayon, A.A., Agrawal, C.M. *Stability of Self-Assembled Monolayers on Titanium and Gold.* Langmuir, 24 (2008) 6774-6784.

Milošev, I., Metikoš-Huković, M., Petrović, Z. *Influence of preparation methods on the properties of self-assembled films of octadecylphosphonate on Nitinol: XPS and EIS studies.* Materials Science and Engineering C, 32 (2012) 2604-2616.

Mirhosseini, N., Crouse, P.L., Schmidh, M.J.J., Li, L., Garrod, D. *Laser surface micro-texturing of Ti-6Al-4V substrates for improved cell integration.* Applied Surface Science, 253 (2007) 7738-7743.

Montross, C.S., Florea, V., Swain, M.V. *Influence of coatings on subsurface mechanical properties of laser peened 2011-T3 aluminum.* Journal of Materials Science, 36 (2001) 1801-1807.

Montross, C.S., Wei, T., Ye, L., Clark, G., Mai, Y-W. *Laser shock processing and its effects on microstructure and properties of metal alloys: a review.* International Journal of Fatigue, 24 (2002) 1021-1036.

Moon, J.H., Park, J.H., Lee, J.Y. *Antibacterial action of polyphosphate on porphyromonas gingivalis.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55 (2011) 806-812.

Nylund, A. y Olefjord, I. *Surface analysis of oxidized aluminium. 1. Hydration of Al₂O₃ and decomposition of Al(OH)₃ in a vacuum as studied by ESCA.* Surface and Interface Analysis, 21 (1994) 283-289.

Puziy, A.M., Poddubnaya, O.I. Socha, R.P., Gurgul, J., Wisniewski, M. *XPS and NMR studies of phosphoric acid activated carbons.* Carbon, 46 (2008) 2113-2123.

Satué, M., Arriero, M.M., Monjo, M., Ramis, J.M. *Quercitrin and Taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells.* Biochemical Pharmacology, 86 (2013) 1476-1486.

Sileika, T.S., Barrett, D.G., Zhang, R., Lau, K.H.A., Messersmith, P.B. *Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine.* Angewandte Chemie International Edition, 52 (2013) 10766 -10770.

Song, Y-Y., Hildebrand, H., Schmuki, P. *Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile TiO₂.* Surface Science, 604 (2010) 346-353.

Yan Li, Jun Wang, Chengzhi Cai. *Rapid grafting of azido-labeled oligo(ethylene glycol)s onto an alkynyl-terminated monolayer on nonoxidized silicon via microwave-assisted "click" reaction.* Langmuir, 27 (2011) 2437-2445.

Yu-Jhen Liou, Yijia J. Chen, Bo-Ruei Chen, Lun-Ming Lee, Chia-Hua Huang. *XPS study of aluminum coating on TiO₂ anode of dye-sensitized solar cells.* Surface & Coatings Technology, 231 (2013) 535-538.

WEBGRAFÍA

Página web número 1: <http://www.chemicalbook.com>

Página web número 2: NIST Standard Reference Database. <http://srdata.nist.gov/xps/>.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- El análisis de los resultados obtenidos aplicando las técnicas de caracterización Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X y Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo nos permite afirmar que ambas técnicas son adecuadas para valorar las modificaciones que ocurren en la superficie de los biomateriales tras estar en contacto con medios fisiológicos.
- La técnica Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X permite la observación del crecimiento secuencial de la capa pasiva de Ti6Al4V, pudiendo establecerse la distribución de los óxidos de los distintos elementos que componen la aleación a lo largo de la capa de pasivado.
- La mojabilidad de las superficies de Ti6Al4V es muy dependiente de los protocolos de preparación a los que son sometidas. Se han obtenido condiciones de hidrofobicidad homogéneas realizando una pasivación controlada en medio acuoso para estos materiales.
- A pesar de ser el TiO₂ el compuesto predominante en las capas de óxido superficial presentes en titanio, Ti6Al4V y Ti6Al7Nb, no todas tienen el mismo comportamiento respecto a su mojabilidad frente a la dosis de radiación de luz UV-C recibida.
- En general, en el rango de concentraciones seleccionado, la cantidad de proteínas adsorbidas es dependiente no solo de la hidrofobicidad del sustrato sino también del tiempo durante el que fue sometido a irradiación UV-C. Asimismo, los diferentes elementos que componen las aleaciones estudiadas inducen distintos comportamientos de adsorción para una misma proteína.
- El análisis por componentes principales de los resultados obtenidos mediante Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo de la adsorción competitiva de proteínas permite diferenciar entre el comportamiento sobre superficies con distinta hidrofobicidad y tiempo de irradiación UV-C.
- Han podido ser detectados cambios en la topografía y en la composición química de la superficie de piezas dentales implantadas durante un largo periodo de tiempo como consecuencia de su envejecimiento por la interacción con el medio biológico.
- Las técnicas de caracterización empleadas en el estudio de las superficies modificadas físicamente mediante percusión con láser pulsado han permitido detectar los cambios producidos en los estados de oxidación de los elementos presentes en la superficie de la aleación Ti6Al4V.
- Ha sido posible confirmar la existencia de enlaces covalentes entre las moléculas orgánicas empleadas para la funcionalización del titanio y su superficie mediante

Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X y Detección de Iones Secundarios mediante Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo.

LISTA DE PUBLICACIONES

Three-dimensional and chemical changes on the surface of a 3-year clinically retrieved oxidized titanium dental implant. Raúl González-García, Alberto Monje, María Coronada Fernández-Calderón, Margarita Hierro-Oliva, María Luisa González-Martín, Florencio Monje. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 34 (2014) 273-282.

XPS Analysis of Ti6Al4V Oxidation under UHV Conditions. Margarita Hierro-Oliva, Amparo María Gallardo-Moreno and María Luisa González-Martín. *Journal of Metallurgical and Materials Transactions A*, 45 (2014) 6285-6290.

Flavonoid-Modified Surfaces: Multifunctional Bioactive Biomaterials with Osteopromotive, Anti-Inflammatory, and Anti-Fibrotic Potential. Alba Córdoba, María Satué, Manuel Gómez-Florit, Margarita Hierro-Oliva, Christiane Petzold, Staale P. Lyngstadaas, María Luisa González-Martín, Marta Monjo and Joana M. Ramis. *Journal of Advanced Healthcare Materials*, 4 (2015) 540-549.

Bioinspired Quercitrin Nanocoatings: A Fluorescence-Based Method for Their Surface Quantification, and their Effect on Stem Cell Adhesion and Differentiation to the Osteoblastic Linage. Alba Córdoba, Marta Monjo, Margarita Hierro-Oliva, María Luisa González-Martín and Joana M. Ramis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 30 (2015) 16857-16864.

Experimental approach towards the water contact angle value on the biomaterial alloy Ti6Al4V. Margarita Hierro-Oliva, Amparo María Gallardo-Moreno, Abraham Rodríguez-Cano, José Morales Bruque and María Luisa González-Martín. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*, vol. LXX, 1, (2015) 1-13.

Dendronized Anionic Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antiviral Activity. Cornelia E. Peña-González, Pilar García-Broncano, M. Francesca Ottaviani, Michela Cangiotti, Alberto Fattori, Margarita Hierro-Oliva, María Luisa González-Martín, Jorge Pérez-Serrano, Rafael Gómez, M. Ángeles Muñoz-Fernández, Javier Sánchez-Nieves and F. Javier de la Mata. *Chemistry European Journal*, 22 (2016) 2987-2999.

Surface Topographical Changes of a Failing Acid-Etched Long-Term in Function Retrieved Dental Implant. Alberto Monje, Raúl González-García, María Coronada Fernández-Calderón, Margarita Hierro-Oliva, María Luisa González-Martín, Fernando Suarez-Lopez del Amo, Pablo Galindo-Moreno, Hom-Lay Wang and Florencio Monje. *Journal of Oral Implantology* (2016) 12-16.

Direct covalent grafting of phytate to titanium surfaces through Ti-O-P bonding shows bone stimulating surface properties and decreased bacterial adhesion. Alba Córdoba, Margarita Hierro-Oliva, Miguel Ángel Pacha-Olivenza, María Coronada Fernández-Calderón, J. Perelló, B. Isern, María Luisa González-Martín, Marta Monjo y Joana M. Ramis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8 (2016) 11326-11335.

On the interactions of human bone cells with Ti6Al4V thermally oxidized by means of laser shock processing. L. Crespo, Margarita Hierro-Oliva, Sandra Barriuso, Virginia Vadillo-Rodríguez, M.A. Montealegre, L. Saldaña, E. Gómez-Barrena, José Luis González-Carrasco, María Luisa González-Martín y Nuria Vilaboa. *Biomedical Materials*, 11 (2016) 1-16.