

# RESUMEN

---

Todo implante, al introducirse en el organismo, posee un cierto porcentaje de rechazo. Diversas investigaciones en curso están intentando disminuir este valor, al igual que el presente proyecto. El estudio realizado pretende mejorar la osteointegración del implante de titanio una vez ha sido implantado en el individuo. Para ello se ha llevado a cabo la biofuncionalización de superficies de probetas de titanio comercialmente puro de grado dos mediante una previa silanización y posterior unión covalente con un péptido el cual contiene una secuencia de adhesión celular.

La primera parte de la memoria se centra en la elección del silano a utilizar y en la mejora del proceso de silanización. Mediante la técnica de ToF-SIMS y la fluorescencia ha sido demostrado que el silano que genera un enlace estable sobre la superficie de titanio corresponde al CPTES. Éste genera una monocapa estable en la superficie de titanio u es fácil de detectar. Para poder obtener los resultados de fluorescencia se ha utilizado el péptido 5(6)-Carboxyfluorescein-GGGK el cual consiste en un péptido sintético con la característica de poseer un fluoróforo en su estructura. Como mejora en el proceso de silanización se han estudiado y evaluado todos los pasos del proceso a fin de optimizarlo. Además ha sido posible demostrar mediante el ángulo de contacto entre otras técnicas que un aumento en la rugosidad aumenta el carácter hidrofóbico expuesto por el material de estudio.

Una segunda parte está basada en el enlace CPTES-péptido. Para su estudio se han utilizado técnicas de gran resolución como es el XPS demostrándose su estabilidad y su carácter covalente.

Finalmente se ha realizado un ensayo de adhesión celular con una línea osteoblástica. Para una buena cuantificación y análisis de los resultados han sido teñidos los núcleos, filamentos de actina y los puntos focales de las integrinas de las células osteoblásticas MG63 fijadas sobre la superficie de titanio. Bajo el microscopio ha sido posible observar las mejoras obtenidas en comparación al titanio sin tratar tanto en el número de células obtenidas como en su área expandida sobre el material.

Para concluir es importante comentar que el estudio realizado forma parte de un proyecto de mayor alcance pudiendo ver que los resultados obtenidos dan una idea de los interesantes resultados que pueden esperarse de éste.





# SUMARIO

<b>GLOSARIO</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS DEL PROYECTO</b> .....	<b>11</b>
<b>ALCANCE DEL PROYECTO</b> .....	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1: ESTADO DEL ARTE</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>17</b>
<b>2.1 .- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 .- FUNDAMENTOS SOBRE EL TITANIO</b> .....	<b>18</b>
2.2.1 .- INTRODUCCIÓN AL TITANIO .....	18
2.2.2 .- TITANIO COMERCIALMENTE PURO .....	18
2.2.3 .- PROPIEDADES DEL TITANIO COMERCIALMENTE PURO .....	19
2.2.3.1 .- PROPIEDADES MECÁNICAS .....	19
2.2.3.2 .- RESISTENCIA A LA CORROSIÓN .....	20
<b>2.3 .- FUNDAMENTOS SOBRE EL TITANIO COMO BIOMATERIAL</b> .....	<b>20</b>
2.3.1 .- INTRODUCCIÓN .....	20
2.3.2 .- OSTEOINTEGRACIÓN .....	20
2.3.3 .- FUNCIONALIZACIÓN .....	21
2.3.4 .- SILANIZACIÓN .....	21
2.3.4.1 .- ESTRUCTURA GENERAL DE LOS SILANOS ORGANOFUNCIONALES. ....	22
2.3.4.2 .- UNIÓN DEL AGENTE ACOPLADOR CON EL TITANIO .....	23
2.3.4.3 .- UNIÓN DEL AGENTE ACOPLADOR CON EL PÉPTIDO .....	24
<b>2.4 .- FUNDAMENTOS SOBRE PÉPTIDOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5 .- FUNDAMENTOS SOBRE LA OSTEOINTEGRACIÓN</b> .....	<b>26</b>
2.5.1 .- EL HUESO .....	26
2.5.2 .- OSTEOINDUCCIÓN.....	27
2.5.3 .- INTEGRINAS .....	27
2.5.3.1 .- ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS.....	27
2.5.3.2 .- UNIÓN CON LIGANDOS EXTRACELULARES Y ESPECIFICIDAD DE RECEPTORES .....	29
<b>2.6 .- FUNDAMENTOS SOBRE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS</b> .....	<b>30</b>



2.6.1 .- TÉCNICAS DE PROCESO .....	30
2.6.1.1 .- PLASMA CLEANING .....	30
2.6.1.2 .- REACCIÓN DE PIRAÑA .....	31
2.6.1.3 .- RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO .....	32
2.6.2 .-CULTIVOS CELULARES .....	33
2.6.2.1 .- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS CULTIVOS CELULARES .....	33
2.6.2.2 .- CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS EN LOS CULTIVOS CELULARES .....	34
2.6.2.3 .- PASES DE UN CULTIVO CELULAR .....	35
2.6.2.4 .- LAS FASES DE UN CULTIVO.....	36
2.6.2.5 .- LA IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS ASÉPTICAS/ESTERILIZADAS .....	37
2.6.2.6 .- CONDICIONES DE CULTIVO .....	37
2.6.2.7 .- MEDIO DE CULTIVO .....	38
2.6.3 .- TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN .....	39
2.6.3.1 .- FUNDAMENTOS DE RUGOSIDAD.....	39
2.6.3.2 .- FUNDAMENTOS DE FLUORESCENCIA.....	41
2.6.3.3 .- FUNDAMENTOS DE INTERFEROMETRÍA .....	43
2.6.3.4 .- ÁNGULO DE CONTACTO Y TENSIÓN SUPERFICIAL .....	45
2.6.3.5 .- FUNDAMENTOS DE ToF-SIMS.....	47
2.6.3.6 .- FUNDAMENTOS DE XPS .....	48
2.6.3.7 .- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA .....	50
<b>2.7 .- FUNDAMENTOS SOBRE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
2.7.1 .- CÁLCULO DE LOS RATIOS .....	51
2.7.2 .- ANOVA DE UNA SOLA DIRECCIÓN .....	52
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 .- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ENSAYO .....</b>	<b>54</b>
3.1.1 .-INTRODUCCIÓN.....	54
3.1.2 .-CORTE DEL CILINDRO A SEGMENTOS.....	54
3.1.3 .- CORTE DE LOS SEGMENTOS A DISCOS DE 2 MM DE ESPESOR.....	55
3.1.4 .- PULIDO MANUAL Y AUTOMÁTICO .....	55
3.1.5 .- PROCESO EXPERIMENTAL DE LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	55
<b>3.2 .- INTERFEROMETRÍA DE LAS MUESTRAS PULIDAS MANUALMENTE Y AUTOMÁTICAMENTE .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 .- SILANIZACIÓN .....</b>	<b>58</b>
3.3.1 .- INTRODUCCIÓN .....	58
3.3.2 .- PLASMA CLEANING .....	58
3.3.3 .- REACCIÓN DE PIRAÑA .....	59
3.3.4 .- PROCESO DE SILANIZACIÓN.....	59



<b>3.4 .- ELECCIÓN DEL SILANO .....</b>	<b>60</b>
3.4.1 .- FLUORESCENCIA .....	61
3.4.2 .- ToF-SIMS .....	62
<b>3.5 .- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN .....</b>	<b>63</b>
3.5.1 .- ÁNGULO DE CONTACTO .....	63
3.5.2 .- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA .....	64
3.5.3 .- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO .....	65
3.5.4 .- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN .....	66
3.5.5 .- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SILANIZACIÓN POR XPS .....	66
<b>3.6 .- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING .....</b>	<b>67</b>
<b>3.7 .- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA .....</b>	<b>67</b>
<b>3.8 .- ESTUDIO DE LA UNIÓN PÉPTIDO-SILANO .....</b>	<b>69</b>
3.8.1 .- FLUORESCENCIA .....	69
3.8.2 .- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO-CPTES POR XPS .....	70
3.8.3 .- ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO SILANO POR ULTRASONIDO .....	70
<b>3.9 .- ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 .- INTERFEROMETRÍA DE MUESTRAS PULIDAS MANUAL Y AUTOMÁTICAMENTE .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 .- ELECCIÓN DEL SILANO .....</b>	<b>78</b>
4.2.1 .- FLUORESCENCIA .....	78
4.2.2 .- ToF-SIMS .....	80
<b>4.3 .- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN .....</b>	<b>80</b>
4.3.1 .- ÁNGULO DE CONTACTO .....	81
4.3.2 .- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA .....	82
4.3.3 .- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO .....	83
4.3.4 .- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN .....	84
4.3.5 .- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SILANIZACIÓN POR XPS .....	85
<b>4.4 .- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING .....</b>	<b>86</b>
<b>4.5 .- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA .....</b>	<b>86</b>
<b>4.6 .- ESTUDIO DE LA UNIÓN PÉPTIDO-SILANO .....</b>	<b>87</b>
4.6.1 .- FLUORESCENCIA .....	87
4.6.2 .- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO-CPTES POR XPS .....	93
4.6.3 .- ESTABILIDAD DE LA UNIÓN DEL PÉPTIDO SILANO POR ULTRASONIDOS .....	93
<b>4.7 .- ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR.....</b>	<b>94</b>



<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>99</b>
5.1.- INTERFEROMETRÍA DE MUESTRAS PULIDAS MANUAL Y AUTOMÁTICAMENTE .....	99
5.2.- ELECCIÓN DEL SILANO .....	99
5.2.1.- FLUORESCENCIA .....	99
5.2.2.- ToF-SIMS .....	100
5.3.- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN .....	100
5.3.1.- ÁNGULO DE CONTACTO .....	100
5.3.2.- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA .....	101
5.3.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO .....	101
5.3.4.- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN .....	101
5.3.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SILANIZACIÓN POR XPS .....	102
5.4.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING .....	102
5.5.- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA .....	102
5.6.- ESTUDIO DE LA UNIÓN PÉPTIDO-SILANO .....	103
5.6.1.- FLUORESCENCIA .....	103
5.6.2.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO-CPTES POR XPS .....	103
5.6.3.- ESTABILIDAD DE LA UNIÓN DEL PÉPTIDO SILANO POR ULTRASONIDOS .....	103
5.7.- ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR .....	104
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</b>	<b>.105</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>.109</b>
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA .....	110
<b>ANEXO A: IMPACTO ECONÓMICO</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO B: IMPACTO MEDIOAMBIENTAL</b>	<b>123</b>
B.1.- GESTIÓN DE RESIDUOS .....	123
B.1.1.- LABORATORIO DE BIOMATERIALES .....	123
B.1.2.- LABORATORIO IBEC DEL EDIFICIO HÉLIX DEL PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA .....	124
B.2.- CONTAMINACIÓN ASOCIADA A LOS MATERIALES EMPLEADOS .....	125
B.2.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	125
B.2.2.- PROCESO DE SILANIZACIÓN .....	126



B.2.3.- FLUORESCENCIA.....	126
B.2.4.- COLORIMETRÍA CON BCA .....	126
<b>B.3.- CONTAMINACIÓN ASOCIADA A LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.....</b>	<b>126</b>
<b>B.4.- OTROS IMPACTOS.....</b>	<b>126</b>
<hr/>	
<b>ANEXO C: AMPLIACIÓN DE KIS RESULTADOS EXPERIMENTALES</b>	<b>127</b>
<b>C.1.- INTERFEROMETRÍA DE MUESTRAS PULIDAS MANUALMENTE Y AUTOMÁTICAMENTE .....</b>	<b>127</b>
<b>C.2.- SELECCIÓN DEL SILANO .....</b>	<b>128</b>
C.2.1.- ToF-SIMS.....	128
<b>C.3.- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN.....</b>	<b>130</b>
C.3.1.- ÁNGULO DE CONTACTO.....	130
C.3.2.- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA .....	131
C.3.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO .....	132
C.3.3.1.-RÉPLICAS DE PDMS.....	132
C.3.3.2.- RECUBRIMIENTO CON ORO .....	133
C.3.4.- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN .....	135
C.3.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING .....	136
<b>C.4.- RESULTADOS DEL APARTADO DEL ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA .....</b>	<b>137</b>
<b>C.5.- RESULTADOS DEL APARTADO DEL ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR .....</b>	<b>137</b>







# GLOSARIO

---

aa: aminoácidos.

APTES: 3-aminopropyltriethoxysilane.

BCA: ácido bicinconínico.

BSA: suero bovino de albúmina.

c.p: comercialmente puro.

CPTES: 3-Chloropropyl)triethoxysilane.

Cu<sup>1+</sup>: cobre en estado de oxidación 1+.

Cu<sup>2+</sup>: cobre en estado de oxidación 2+.

DMEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium.

FBS: suero fetal bovino.

FN: fibronectina.

Gly: glicina.

GPTES: 3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane.

HA: hidroxiapatita.

PBS: sodium phosphate buffer.

PFA: paraformaldehído.

TCA: ciclo del tricarbóxico.

Ti: titanio.





# INTRODUCCIÓN

En el presente proyecto se ha realizado un estudio sobre la biofuncionalización del titanio mediante la utilización de oligopéptidos. Con ello se han planteado los siguientes objetivos:

## OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Desarrollo de una técnica para la inmovilización covalente de oligopéptidos en la superficie del titanio.
2. Incrementar la adhesión de las células óseas en superficies de titanio comercialmente puro de grado 2 a partir de su biofuncionalización utilizando péptidos como punto de unión entre la célula y la superficie de titanio.

Para la ejecución de los anteriores objetivos se han usado las siguientes herramientas:

- Caracterizar mediante técnicas de fluorescencia, ToF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy), XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), colorimetría y ángulo de contacto la presencia de péptido sobre la superficie de titanio.
- Caracterizar mediante técnicas de fluorescencia la adhesión de las células sobre el titanio.

Durante la realización del proyecto han aparecido nuevos objetivos pudiéndose considerar secundarios. Éstos son:

- I. Estudio de las diferencias entre la rugosidad obtenida mediante el pulido manual y el pulido automático.
- II. Modificación de la técnica de silanización para reducir el tiempo de ejecución.
- III. Caracterización y comparación mediante fluorescencia y espectrometría de masas la presencia de silano en la superficie de titanio entre el protocolo de silanización sin modificar y modificado.
- IV. Estabilidad de los grupos -OH en la superficie de titanio por plasma mediante la técnica de ángulo de contacto.

## ALCANCE DEL PROYECTO

Este proyecto pretende ser un estudio preliminar de un proyecto de mayor alcance. Durante su ejecución se han utilizado solamente probetas de titanio para facilitar el estudio de los procesos que se han desarrollado.

El proyecto puede dividirse en diferentes capítulos importantes:

1. Estado del arte: relato del pasado y presente de los implantes.



2. Fundamentos teóricos: se dota al lector de las bases necesarias para poder llegar a entender y comprender los pasos realizados y las conclusiones llegadas en el proyecto. Dicho apartado está dividido en diferentes secciones:
  - a. Introducción.
  - b. Fundamentos sobre el titanio.
  - c. Fundamentos sobre péptidos.
  - d. Fundamentos sobre la adhesión celular.
  - e. Fundamentos sobre las técnicas utilizadas.
    - Técnicas de proceso: plasma cleaning, reacción de piraña, proceso de silanización y cultivos celulares.
    - Técnicas de caracterización: fundamentos de rugosidad, fundamentos de fluorescencia, fundamentos de interferometría, ángulo de contacto y tensión superficie, ToF-SIMS, XPS, réplicas de PDMS y de oro y colorimetría con BCA.
3. Materiales y métodos: son detallados los materiales y métodos utilizados.
4. Resultados y discusiones: contiene los resultados obtenidos en cada ensayo junto con una breve discusión y explicación de ellos.
5. Conclusiones: conclusiones generales de los resultados obtenidos de todo el estudio realizado.



# CAPÍTULO 1

## ESTADO DEL ARTE

---

Actualmente existen diversas metodologías utilizadas para bioactivar el titanio las cuales corresponden a:

- Tratamientos con fosfatos de calcio y/u otros iones: provoca una precipitación de capas de apatita y modifica la composición superficial.
- Recubrimiento sol-gel: recubre con un material bioactivo.
- Recubrimiento por magnetron "sputtering": recubre con un material bioactivo y aumenta la rugosidad.
- Recubrimiento por proyección por plasma de hidroxiapatita: recubre con un material bioactivo y aumenta la rugosidad.
- Ablación láser: recubre con un material bioactivo.
- Adsorción fisicoquímica de moléculas biológicas: interacción débil con proteínas aportando bioactividad.
- Enlace covalente de moléculas biológicas: interacción selectiva con proteínas aportando bioactividad.
- Recubrimiento de moléculas biológicas por inclusión en materiales portadores: interacción selectiva con proteínas aportando bioactividad.[1]

Pueden observarse en muchas de las metodologías anteriores el uso de fosfato de calcio, concretamente de apatita. El recubrimiento con dicha capa es una perfecta opción ya que la apatita, al tratarse de fosfato de calcio, posee la misma composición química que la fase mineral del hueso siendo aceptada por el organismo y no dando reacciones inflamatorias importantes como respuesta. Tiene la capacidad de hacer proliferar y diferenciar los osteoblastos sobre su superficie de manera que el tejido óseo puede crear un enlace químico directo. Sin embargo, al ser una cerámica posee una tenacidad a la fractura limitada por lo que suele usarse como recubrimientos de implantes de titanio y no como piezas enteras.

Todos los procesos utilizados tradicionalmente para generar la capa cerámica se basan en una unión física entre la hidroxiapatita y el titanio y/o aleaciones de titanio. Como método de depósito puede considerarse los más empleados la proyección por plasma.

Referente a la proyección térmica por plasma se diferencian el atmosférico (APS) y al vacío (VPS). Ambas técnicas se basan en el flujo de un gas inerte a elevada temperatura a través del espacio comprendido entre dos electrodos. Mediante un impulso eléctrico se genera un arco eléctrico que llevará a cabo la disociación de



dicho gas en el interior de la pistola. De este modo el gas que se encuentra en el interior del arco se transforma en un conjunto de iones y electrones muy energéticos, es decir, en plasma. Al llegar el plasma a la boquilla de la pistola genera una llama de plasma.[2]

El material que va a originar el recubrimiento es transportado por medio de un gas portador y es inyectado a la llama pudiendo encontrarse el inyector del polvo dentro o fuera de la pistola. La llama de plasma acelera las partículas de polvo inyectadas fundiéndolas por la elevada temperatura que tiene. Estas gotas del material fundido salen hacia la superficie del sustrato solidificando y acumulándose.

Esta técnica presenta el inconveniente de degradar térmicamente las partículas de HA ya que se alcanzan temperaturas de 1000°C durante el vuelo por lo que pueden generarse dificultades a la hora de controlar su composición, heterogeneidad de unión con el sustrato, tensiones residuales acumuladas etc. Como consecuencia existe desprendimiento y degradación del material a largo plazo a pesar de que a corto plazo se consigue una integración más rápida.[1]

Una alternativa a esta opción podría ser la conocida proyección térmica por alta velocidad (HVOS) pero actualmente no se utiliza en recubrimientos biocompatibles. Ella se basa en la combustión de un combustible por un gradiente de presión llegando a temperaturas menores por lo que la HA no se degradaría y teniendo velocidades de impacto mayores.

Otras metodologías que han sido estudiadas y utilizadas son los tratamientos químicos a donde la temperatura de trabajo es inferior que los comentados anteriormente por lo que la cerámica no se degradaría parcialmente a lo largo del tiempo.

Como métodos químicos más utilizados se encuentran el método de T. Kokubo y col. Éste se basa en atacar el metal pulido con una disolución de hidróxido de sodio 5M, durante 24 horas a una temperatura de 333 K. Seguidamente se secan las placas de titanio en un horno a 313 K durante 24 horas. Posteriormente se realiza un tratamiento térmico a 873 K durante una hora y se deja enfriar en el interior del horno. Finalmente se sumerge en SBF (body Fluid Solution) a 310 K. Tres días después pueden observarse apatita sobre la superficie del metal. [1]

Otra opción que últimamente se está estudiando, y en concreto en este proyecto, hace referencia a una modificación superficial de tipo bioquímico de la superficie del implante agregándole moléculas tales como proteínas, enzimas o péptidos bioactivos. [3]

Existen varias metodologías para modificar la superficie del implante como es la adsorción física o química. La adsorción química o quimisorción es la fijación de una molécula en la superficie del implante a través de un enlace intermedio iónico o covalente. Debido a la interacción entre los estados electrónicos del implante y de la proteína se generado un verdadero enlace.



Otra fuerza de adsorción reconocida es la que tiene lugar entre fuerzas de tipo Van der Waals. En este caso no existe ningún tipo de rearrreglo electrónico entrando en juego tan solo fuerzas de tipo electrostáticas o dipolares. Este tipo de interacción se conoce como adsorción física o fisisorción.

Las biomoléculas adsorbidas físicamente pueden presentar un proceso de desorción indeseado quedando en zonas alejadas del implante. Además es posible un intercambio entre las biomoléculas adsorbidas y las presentes en el medio fisiológico de una manera no específica. Por ello existe un pobre control sobre la fijación de las moléculas, de su distribución y de su orientación. Dichas desventajas dificultan su caracterización y su función superficial. A pesar de todos los aspectos negativos se ha podido ser demostrar que el titanio puede bioactivarse mediante la fisisorción dando lugar en él la adhesión celular y por lo tanto mejorando la reparación ósea y la integración del implante.

El proceso de quimisorción es más complicado que el de fisisorción pudiendo controlar con éste aspectos que con la fisisorción no son controlables como es la orientación de las biomoléculas fijadas. Dichas uniones en el caso del titanio tienen lugar mediante los grupos hidroxilos de las capas oxidadas inertes de su superficie pudiendo ser válidos como puntos de anclaje los grupos amino, carboxilo y tiol insertados por plasma.[3]

En la tabla 1.1 quedan plasmadas las principales diferencias entre ambos tipos de adsorción.

	<b>Fisisorción</b>	<b>Quimisorción</b>
<b>Energía de activación</b>	baja	Alta
<b>Velocidad</b>	Alta	Baja
<b>Estructura molecular</b>	No cambia	Cambia
<b>Entalpía (valor absoluto)</b>	Baja	Alta
<b>Capas</b>	Multicapas	Monocapas
<b>Especificidad</b>	Baja	Alta

Tabla 1.1.- Propiedades mecánicas del Ti comercialmente puro.

Es necesario tener presente la existencia de otras reacciones de adsorción de proteínas justo en el momento que tiene lugar la implantación teniendo que ser controladas y minimizadas para que no entren en competencia con las reacciones que realmente se están buscando. Como ejemplo de parámetro a controlar es el tiempo de permanencia de las moléculas ya que las moléculas deben de estar adsorbidas por el metal durante un cierto periodo de manera estable para que las células colonizadoras del tejido circundante tengan acceso. Por otro lado la concentración y la distribución de los puntos bioactivos del implante también deben de tenerse en consideración debido a la necesidad de trabajar con concentraciones situadas en un intervalo asegurando así la accesibilidad de las células. [3]







# CAPÍTULO 2

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

En el presente capítulo se ha intentado dotar al lector de los conocimientos necesarios para poder entender los pasos realizados a lo largo del proyecto y analizar los resultados mostrados en el capítulo 4.

### 2.1.- INTRODUCCIÓN

Cada vez estamos más acostumbrados, sobre todo las personas mayores, a llevar en nuestro cuerpo alguna parte del resultado de la innovación en biomedicina y biomecánica. Nadie se sorprende al conocer a alguien con algún tipo de prótesis. Así pues es bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y la necesidad de todo tipo de implantes habiendo más de cincuenta millones de personas en todo el mundo transportando alguno de ellos.

Ya desde tiempos de civilizaciones egipcias esta mentalidad de sustituir aquellas partes del organismo dañadas existía como ha sido corroborado por los yacimientos encontrados. Éstos detallan como intentaban reemplazar aquellos dientes perdidos por dientes de animales o simple marfil.

Inicialmente los biomateriales empezaron siendo materiales industriales a los que se les pedían ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. En la actualidad, sin embargo, los materiales a considerar como biomateriales deben de responder a un seguido de exigencias para que su uso sea fiable. Entre ellas se encuentran las propiedades mecánicas, biocompatibilidad, pasividad química extrema y propiedades adecuadas para un buen comportamiento a largo plazo. [4]

En los últimos años el campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular cambio y según diversos estudios. Esto es debido por un lado al aumento considerable de la esperanza de vida y por otro lado a la mejora de las técnicas quirúrgicas.

Como materiales destacados para su uso como biomaterial se encuentran el titanio y algunas de sus aleaciones, aceros inoxidable y aleaciones CoCr.

En el presente proyecto se ha trabajado con titanio comercialmente puro de grado 2 el cual tiene un uso importante en implantes dentales.



## 2.2.- FUNDAMENTOS SOBRE EL TITANIO

### 2.2.1.- INTRODUCCIÓN AL TITANIO

Es el noveno elemento más abundante de la tierra, con un 0.8% en peso, siendo su concentración viable para su extracción en minerales tales como el rutilo ( $\text{TiO}_2$ ) y la ilmenita ( $\text{FeO}\cdot\text{TiO}_2$ ).

El descubrimiento del titanio data del siglo XVIII pero en esa época no se le pudo dar un uso adecuado. No fue hasta el 1795 cuando un químico alemán, Heinrich Klaproth, lo redescubrió pero no fue capaz de obtener el metal en estado puro.

A pesar de su gran presencia en la corteza terrestre no fue hasta 1937 cuando empezó a utilizarse en gran variedad de aplicaciones gracias a la separación eficiente del mineral lograda por Kroll con ayuda de Siemens y Helske.

Actualmente mediante técnicas más avanzadas que las existentes en 1937 pero partiendo de la misma base, se ha logrado la obtención de titanio en grandes cantidades pudiendo satisfacer así la demanda existente para su uso comercial dando el conocido titanio comercialmente puro (pueden diferenciarse diferentes grados), aleaciones de titanio o titanio utilizado como aleante. [1]

El titanio posee una transformación alotrópica a la temperatura de 1155 K pasando de una estructura HCP (Hexagonal Compacta) conocida como  $\alpha$  a una estructura BCC (Cúbica Centrada en el Cuerpo) o llamada  $\beta$ . Por ello, se considera el titanio como el único metal ligero capaz de padecer tratamientos térmicos con transformación total en sus aleaciones. Además, esta capacidad da lugar a poder obtener aleaciones con estructuras  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\alpha+\beta$  dependiendo de los elementos aleantes que estabilizan una u otra fase. Como elementos  $\alpha$ -estabilizantes encontramos elementos de 4 electrones de valencia por átomo, como es el caso del Al, O, C y N. Para  $\beta$ -estabilizantes se encuentran el V, Mo y Ta. [5]

### 2.2.2.- TITANIO COMERCIALMENTE PURO

La elevada reactividad del titanio hace que la obtención del metal puro sea un trabajo muy laborioso y difícil por lo que comercialmente se trabaja con el conocido titanio comercialmente puro. Así pues pueden diferenciarse cuatro grados según la cantidad de elementos intersticiales presentes (Tabla 2.1).

Titanio comercialmente puro	Fe máx.	O aprox.	N máx.	C máx.	H máx.	Ti
Grado I	0.2	0.18	0.03	0.1	0.0125	Balance
Grado II	0.3	0.25	0.03	0.1	0.0125	Balance
Grado III	0.3	0.35	0.05	0.1	0.0125	Balance
Grado IV	0.5	0.40	0.05	0.1	0.0125	Balance

Tabla 2.1.- Clasificación del Ti según su composición química en % en peso.[6]



Los valores anteriores dejan de manifiesto que las propiedades del titanio comercialmente puro varían según su grado, no obstante, posee buenas propiedades mecánicas para su uso como implante. [1]

A mayor proporción de aleantes mayor es la resistencia a la fractura pero menor es la capacidad de deformación sin fractura.

c.p-Titanio	Resistencia a la tracción (MPa)	Límite elástico (MPa)	Elongación (%)	Reducción de área %
Grado I	240	170	24	30
Grado II	345	275	20	30
Grado III	450	380	18	30
Grado IV	550	483	15	25

Tabla 2.2.- Propiedades mecánicas del Ti comercialmente puro. [7]

Como puede observarse en la tabla 2.2 el titanio comercialmente puro presenta una serie de limitaciones en sus propiedades mecánicas lo cual limita su uso siendo básicamente su aplicación en implantes dentales y en recubrimientos porosos de otras aleaciones de titanio.[7]

## 2.2.3.- PROPIEDADES DEL TITANIO COMERCIALMENTE PURO

### 2.2.3.1.- PROPIEDADES MECÁNICAS

Cualquier implante dental además de ser biocompatible debe de presentar unos requerimientos mecánicos tales como elasticidad, resistencia a la tracción, resistencia específica y fatiga, que soporten las fuerzas ejercidas sobre éste. Como ha sido expuesto en la tabla 2.2 los valores que corresponden tanto de la resistencia a la tracción como del límite elástico son suficientes para soportar las cargas ejercidas por la boca al masticar.[1]

Es importante remarcar que la resistencia mecánica posee una dependencia con el grado del titanio con el que se está trabajando y con el tipo de conformado y tratamientos térmicos usado para la fabricación del implante.

El módulo elástico (100-110 GPa) es inferior al módulo de las aleaciones de base cobalto (220-234 GPa) y del acero inoxidable (200-210 GPa) lo cual es un aspecto a favor del titanio c.p ya que el módulo elástico del hueso cortical es de 20 GPa. Por lo tanto puede decirse que el titanio posee una mayor compatibilidad elástica con el tejido natural que las otras dos aleaciones siendo por lo tanto más usada en aplicaciones biomédicas. [7]

Sobre la fatiga del implante dental existen pocos estudios. No obstante los resultados apuntan que la vida a fatiga es baja. A pesar de ser la principal causa de su rotura corresponde sólo a un 0.2% de todos los implantes que fracasan en boca. [1]



### 2.2.3.2.- RESISTENCIA A LA CORROSIÓN

El titanio es un material con una reactividad elevada cuya oxidación tiene lugar en tiempos de nanosegundos. Por ello siempre está recubierto de una capa de óxido ( $Ti_3O$ ,  $Ti_2O$ ,  $Ti_3O_2$ ,  $TiO$ ,  $Ti_2O_3$ ,  $Ti_3O_5$  y  $TiO_2$ ) siendo el más estable el  $TiO_2$  con el Ti en estado de oxidación +IV. Dicha capa protege el metal de un aumento de la oxidación, reacciones químicas y biológicas indeseables, y de la corrosión.[1]

## 2.3.- FUNDAMENTOS SOBRE EL TITANIO COMO BIOMATERIAL

### 2.3.1.- INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores requerimientos que debe de ser cumplido por un biomaterial es la resistencia a la corrosión, biocompatibilidad, bioadhesión, biofuncionalidad (adecuado a las propiedades mecánicas, especialmente el límite de fatiga ya que no debe de producirse la rotura del implante antes de éste y el módulo de Young que deben de ser lo más similar al del hueso como sea posible), procesabilidad y disponibilidad. [4][6]

Un aspecto que aporta al titanio el reconocimiento como biomaterial es su capacidad de no reaccionar con el organismo gracias a su elevada resistencia a la corrosión tanto en algunos medios inorgánicos como en casi todos los orgánicos, es decir, se trata de un material bioinerte.

Otro aspecto positivo y que aporta al titanio el reconocimiento como biomaterial es la biocompatibilidad que fue definida en 1987 por la Sociedad Europea de Biomateriales: *“La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial de realizar su función en lo que concierne a una cierta terapia médica, sin desencadenar ningún efecto indeseable a nivel local o sistémico en el cuerpo del paciente, para generar el beneficio celular más apropiado o la mejor respuesta del tejido en esta situación específica, y optimizando la ejecución clínica de la terapia”*. [8]

Así pues, el titanio junto con sus aleaciones es considerado como un excelente biomaterial.

A pesar de todos los aspectos positivos comentados sobre el titanio este presenta unas ciertas carencias, como es la bioactividad. El titanio, a pesar de ser biocompatible, no es capaz de interactuar directamente con el hueso creando enlaces fuertes interfaciales entre él y el tejido circundante.

### 2.3.2.- OSTEOINTEGRACIÓN

Al implantar un material en el organismo inicialmente tiene lugar una interacción entre él y los fluidos del medio fisiológico, ya sea sangre, saliva o fluidos extracelulares. Así pues, proteínas y otras moléculas, independientemente de su naturaleza, al ser biomoléculas con una elevada afinidad con el agua interactúan con la nueva superficie de manera que son adsorbidas. Por una parte el cuerpo humano ejerce una influencia sobre el material provocando un cambio en sus características debido principalmente a procesos de corrosión y degradación, y por otra, la presencia del material provoca cambios en los tejidos circundantes a través de



procesos de inflamación. [9][10]

Estas inflamaciones aparecen en los tejidos blandos que rodean el implante de manera que se pueden diferenciar dos etapas. Primero, como respuesta inmediata a la presencia del implante se produce una inflamación aguda de manera que hay dilataciones vasculares aumentando así la permeabilidad del capilar. Como consecuencia, y entrando en la segunda etapa, las células perciben la nueva superficie y dependiendo de la conformación, la orientación y el tipo de proteínas adsorbidas interaccionan con ellas segregando un cierto tipo y número de citoquinas (mensajero biológico molecular) que atraen a los fibroblastos.

Así pues los fibroblastos son mayoritarios en el proceso reparador y los leucocitos (neutrófilos) protegen al cuerpo de microorganismo, apareciendo posteriormente la fibrina que aporta las células al tejido conectivo del hueso.[1][9][11]

En el caso de no tratar con biomateriales o biomateriales que no tienen las mismas propiedades que el titanio, la presencia del implante prolonga el proceso inflamatorio y de reparación por lo que se genera una cápsula fibrótica alrededor de éste de manera que los fagocitos y los fibroblastos generan un granuloma asociado a la formación de un edema. [9][11]

En el caso de tratarse del titanio c.p la cápsula de tejido blando que se genera sobre el implante es relativamente despreciable, siendo de unos escasos 5-10 nm de grosor.[1] Este comportamiento se conoce como osteointegración y es lo que caracteriza al titanio c.p.

### **2.3.3.- FUNCIONALIZACIÓN**

Una material bioactivo es aquel material capaz de provocar una respuesta o acción beneficiosa sobre el tejido vivo. El titanio es un biomaterial inerte que interacciona mínimamente con el tejido circundante. No obstante para mejorar dicho comportamiento existe la acción de funcionalizarlo.

El término funcionalización se refiere a modificar la composición química superficial del material a base de fijar grupos funcionales en él. Existe el caso concreto en que las cadenas fijadas son cadenas orgánicas con grupos funcionales tales como son el carboxilo (-COOH), tiol (-SH) o amino (-NH<sub>2</sub>) hablándose por lo tanto de biofuncionalización. Dichas cadenas son capaces de formar enlaces covalentes con diversas moléculas bajo ciertas condiciones fisiológicas permitiendo una interacción estable entre el material y el sistema biológico. [12] Como método de funcionalización se ha utilizado la silanización ya que es una de las técnicas más estudiada considerándose sencilla.

### **2.3.4.- SILANIZACIÓN**

La silanización consiste en una reacción química entre organosilanos funcionales y grupos hidroxilo (-OH) superficiales del titanio.



Los organosilanos son agentes de acoplamiento que se caracterizan por poseer una doble funcionalidad química la cual le permite reaccionar tanto con compuestos orgánicos como inorgánicos. Por ello tiene lugar la unión entre dos materiales tan disimilares como son un metal y una biomolécula.

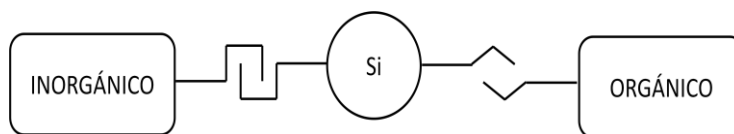


Figura 2.1.- Mecanismo de unión del silano.

El porqué de la necesidad de agentes acopladores entre dos medios diferentes como es el orgánico y el inorgánico es debido a las diferentes propiedades que presentan afectando a comportamientos como es la adhesión. Otro aspecto a tener en cuenta es la afinidad al agua, siendo la proteína un compuesto hidrófobo mientras que el metal es hidrófilo. De esta manera, al migrar el agua de la superficie hidrofóbica a la hidrofílica destruye los posibles enlaces existentes entre ambos pero no altera el enlace creado por el agente acoplador de silano. Además de lo comentado anteriormente puede decirse que lo más importante es su resistencia con el tiempo y con el uso del conjunto. [13]

#### 2.3.4.1.- ESTRUCTURA GENERAL DE LOS SILANOS ORGANOFUNCIONALES.

La estructura química de un organosilano es:



La unidad central del agente acoplante corresponde a un átomo de silicio combinado con dos grupos funcionales diferentes: [14]

- El grupo Organofuncional Y: está fuertemente unido al silicio por medio de una cadena de carbonos no reactivos. La adhesión con la biomolécula tiene lugar por éste, pudiendo adquirir las estructuras:

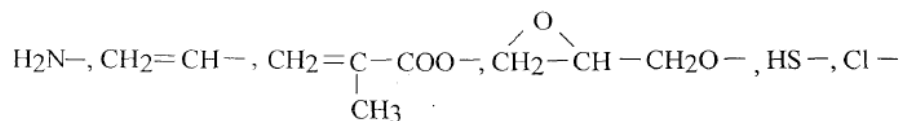


Figura 2.2.- Grupos Organofuncionales.[14]

- El grupo Silicofuncional R: Después de realizar la hidrólisis puede reaccionar con centros activos de substratos orgánicos o inorgánicos o por condensación con otros átomos de silicio y así formar enlaces estables. Este grupo puede presentar cualquiera de las siguientes estructuras (aunque generalmente son grupos alcoxi unidos directamente con el silicio):



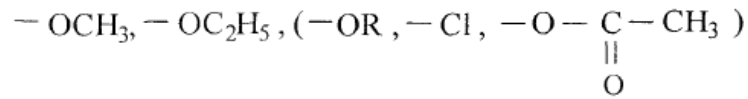


Figura 2.3.- Grupos Silicofuncionales.[14]

**2.3.4.2.- UNIÓN DEL AGENTE ACOPLADOR CON EL TITANIO**

La unión del agente acoplador con el titanio tiene lugar por el grupo silicofuncional. Las etapas del proceso son las siguientes: [13]

1.- Hidrólisis del silano: Es necesario que el silano sea hidrolizado dando lo que se conoce como silanoles. Dicha etapa puede darse vía acuosa o hidroalcohólica.

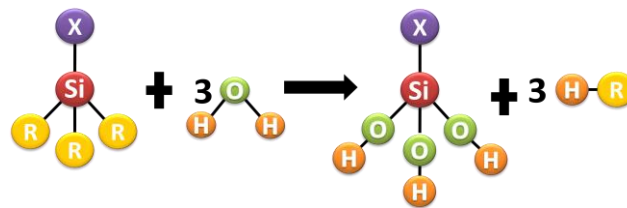


Figura 2.4.- Primera etapa de la silanización. El grupo representado por una X corresponde al grupo organofuncional y a los carbonos no reactivos.

2.- Adhesión a la superficie inorgánica:

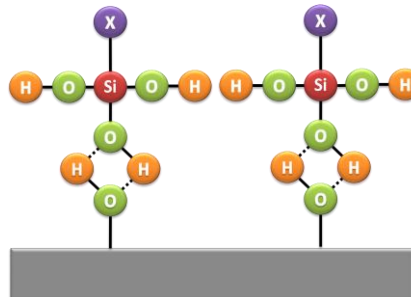


Figura 2.5.- Segunda etapa de la silanización.

3.- Condensación:

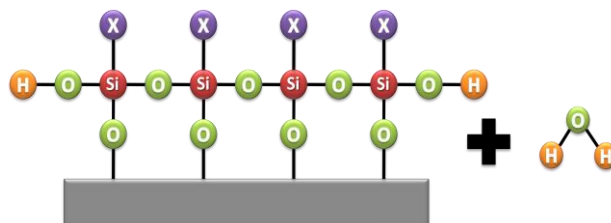


Figura 2.6.- Tercera etapa de la silanización.







carboxílicos.

Los aminoácidos pueden experimentar una reacción ácido-base interna para dar los iones dipolares conocidos también como zwitterion (del alemán zwitter, "híbrido").

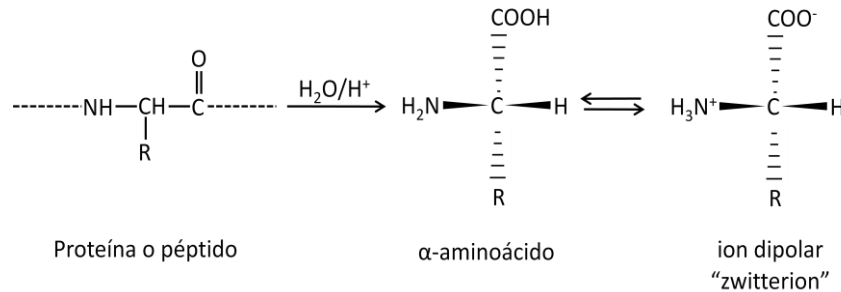


Figura 2.9.- Reacción ácido-base interna.

Debido a la presencia del anión carboxílico y del catión amoníaco son anfóteros pudiendo reaccionar tanto con ácidos como con bases.

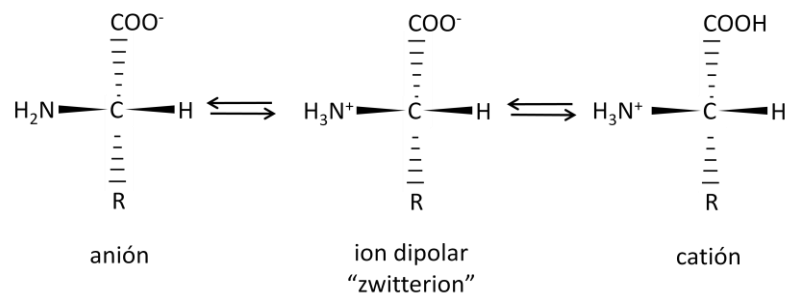


Figura 2.10.- Carácter anfótero de los aminoácidos.

Se define el punto isoeléctrico como el pH en el cual el aminoácido no lleva carga iónica neta siendo constantes características para cada aminoácido.

Todos los péptidos son polímeros cuyos monómeros corresponden a aminoácidos conociéndose cada uno de ellos como residuo o unidad. Los aminoácidos pueden unirse entre ellos covalentemente por formación de un enlace amida entre el grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido y el grupo  $\alpha$ -amino del otro aminoácido aportando al medio como consecuencia una molécula de agua. Este enlace se conoce como enlace peptídico. [15]

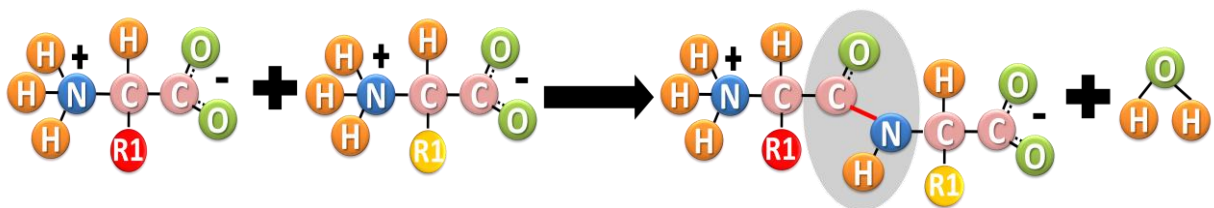


Figura 2.11.- Formación de un dipéptido.



El enlace peptídico presenta resonancia. Como consecuencia se considera que dicho enlace posee un 40% de carácter de doble enlace y es por ello la no posible rotación del enlace C-N.

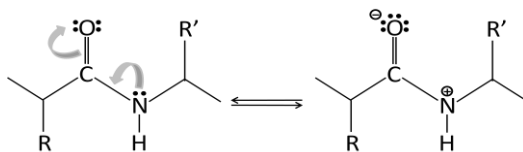


Figura 2.12.- Resonancia del enlace peptídico.

Cuando se combinan dos aminoácidos se forma un dipéptido como es el caso de la Figura 2.11. La reacción puede continuar añadiéndose otro aminoácido por cada uno de los extremos dando otros enlaces peptídicos y dando por lo tanto un tetrapéptido. La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido:

- Oligopéptido: Número de aminoácidos < 10.
- Polipéptido : 100>Número de aminoácidos > 10.
- Proteína: Número de aminoácidos > 100.

La mayoría de péptidos (no cíclicos) contienen un grupo amino que no ha reaccionado, llamado también N-terminal o amino terminal y un grupo carboxílico en el otro extremo, conocido también como carboxilo terminal o C-terminal. [15]Por convenio suele situarse el N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha.

A la hora de nombrar un péptido se ha optado por utilizar abreviaturas de tres letras o de una letra ya que resulta complicado de llamarlos a partir de los aminoácidos que lo componen. Suelen numerarse los aminoácidos a partir del N-terminal.

## 2.5.- FUNDAMENTOS SOBRE LA OSTEOINTEGRACIÓN

Antes de entender el concepto de adhesión celular es necesario comprender diferentes conceptos que están relacionados con ella.

### 2.5.1.- EL HUESO

El tejido óseo se compone por células y una matriz ósea (constituida por fibras y por una sustancia impregnada por sales minerales).

La matriz ósea consta de una matriz orgánica (sustancia fundamental y fibras) impregnada de sales minerales, principalmente cálcicas. Las fibras que componen la matriz son fibras de colágeno, presentando el colágeno un 95% del peso de la matriz orgánica del hueso en seco. Entre las fibras de colágeno existe una sustancia fundamental de glucosaminoglicanos (condroitinsulfato, ácido hialurónico, queratanosulfato) asociado a proteínas. Las sales minerales las componen principalmente el carbono y fosfato cálcico que se encuentra en forma de fosfato cálcico amorfo (40% de sustancias minerales en un adulto) y de cristales de hidroxiapatita



(calcio óseo fijado). También pueden encontrarse sales de magnesio y de estroncio. [16]

Como células del hueso pueden describirse tres tipos: los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Los osteoblastos son las células responsables de la formación del tejido óseo (secreción de la sustancia fundamental y de las moléculas de tropocolágeno). Los osteocitos son las células óseas (derivan de los osteoblastos) alojadas en una laguna ósea que aseguran la renovación de la matriz y desempeñan un importante papel en los intercambios cálcicos (tejido óseo ↔ sangre). Finalmente, los osteoclastos son células multinucleadas que desempeñan un papel esencial en la resorción del tejido óseo. [16][17]

### **2.5.2.- OSTEOINDUCCIÓN**

Una vez el titanio ha sido sometido al tratamiento de silanización y enlazado al péptido, no sólo ha dejado de ser bioinerte sino que ahora también es considerado como un material osteoinductivo, es decir, posee la capacidad de que las células madres puedan diferenciarse en células óseas (osteoblastos y condrocitos). Esto es así ya que al adherirse las células mesenquimales sobre la superficie del titanio éstas comienzan a diferenciarse dando osteoblastos y por lo tanto la formación del hueso (osteogénesis). A pesar de no existir un estímulo directo para que tenga lugar dicha diferenciación puede considerarse el contacto péptido-célula un de las causas más importantes pudiéndose conseguir mediante la biofuncionalización.

### **2.5.3.- INTEGRINAS**

La adhesión celular tiene lugar mediante diferentes clases de receptores superficiales. En la naturaleza las células se unen entre ellos mediante unas proteínas no colagénicas como son la fibronectina y la vitronectina que son conocidas como proteínas de adhesión celular. Estas proteínas tienen en común una secuencia de aminoácidos de arginina-glicina-ácido aspártico-serina (RGDS), que es un dominio de adhesión peptídico, reconocido por los receptores superficiales llamados integrinas. [18]

#### **2.5.3.1.- ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS**

Las integrinas son consideradas como el mayor y más importante grupo de receptores para proteínas de la matriz extracelular. Corresponden a la superfamilia de glicoproteínas de membrana que median la adhesión de células con la matriz extracelular y entre células.

Como su nombre indica son glicoproteínas integrales de membrana de manera que son el nexo funcional de la matriz y el citoesqueleto. Dicha asociación es de vital importancia para mecanismos de adhesión y migración celular y propagación de varios tipos de señalización. [18]

Todas las integrinas son heterodímeros constituidos por dos subunidades conocidas como  $\alpha$  y  $\beta$  asociadas de una manera no covalente. Ambas subunidades son glicoproteínas de transmembrana cuya combinación define la propiedad de adhesión y de señalización.

Es imposible poder obtener una imagen estructural de un heterodímero intacto por ello se analizan las dos



subunidades por separado y posteriormente se unen los resultados montando así una imagen de la integrina en su totalidad. Cada subunidad contiene un gran dominio extracelular, otro de transmembrana y finalmente uno pequeño citoplasmático. La mayor parte de la proteína se encuentra hacia el medio extracelular mientras que el citoesqueleto es de actina y la máquina de señalización se encuentra en el pequeño dominio citoplasmático. [18]

Actualmente se conocen 18 tipos de subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  en los mamíferos. Con la excepción de la subunidad  $\beta_4$ , todas las integrinas de la subunidad  $\beta$  poseen en su longitud entre 760-790 aminoácidos. Para la subunidad  $\alpha$  su longitud es de unos 1000-1200 aminoácidos. [18]

La subunidad  $\beta$  presenta en su dominio extracelular unos 56 residuos de cisteína localizándose la mayoría dentro de un rango de 260 aminoácidos separados de la membrana plasmática unos 50 residuos. La subunidad  $\alpha$  extracelularmente posee una secuencia repetitiva de 60 aminoácidos los cuales incluyen motivos EF HAND<sup>1</sup> con una secuencia repetitiva del tipo DxDxDGxxD capaces de atrapar cationes divalentes. Este dominio de enlace metálico es de importancia para el proceso de unión de la integrina y para los cambios conformacionales que afectan a la afinidad de la integrina con el ligando. [18]

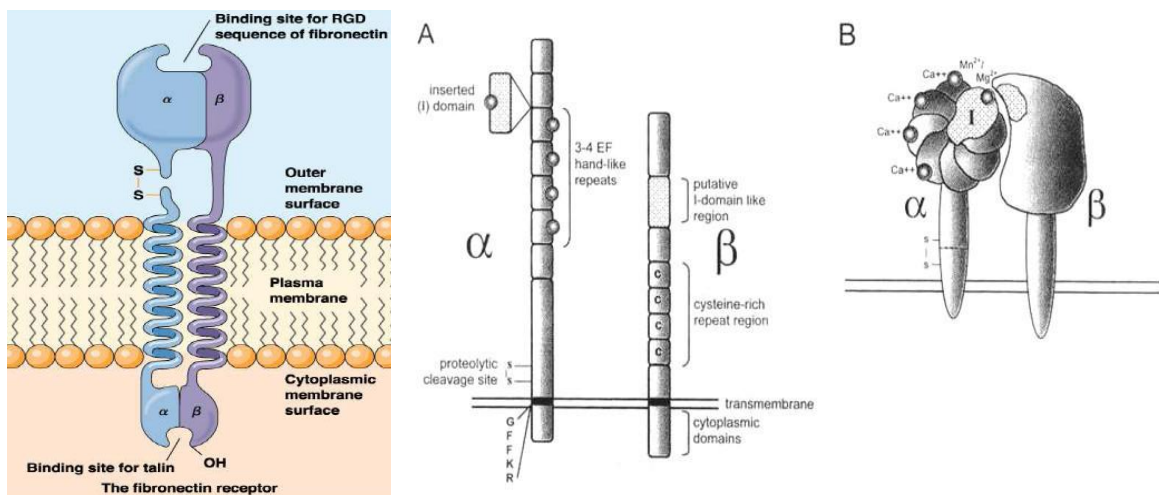


Figura 2.13.- Esquema de una integrina cualquiera y representación esquemática de una integrina. [18]

No todas las subunidades  $\alpha$  son iguales habiendo algunas que presentan un corte en la secuencia de aminoácidos en la zona extracelular. Normalmente dicho corte se encuentra próximo a la membrana plasmática uniendo ambas partes de la subunidad mediante un puente disulfúrico. Otras subunidades en cambio presentan dicha partición a mayor distancia de la membrana y no poseen el puente disulfúrico. La mitad de las subunidades  $\alpha$  de los vertebrados presentan otra carencia de proteólisis extracelular pero en su lugar contienen un dominio de inserción cerca de la región N-terminal conocido como Dominio I. [18]

<sup>1</sup> Motivos que se unen al calcio compuestos de dos hélices (E y F) unidas por un lazo. El calcio se une en la región del lazo. Estos motivos se encuentran en muchas proteínas que son reguladas por calcio.



### 2.5.3.2.- UNIÓN CON LIGANDOS EXTRACELULARES Y ESPECIFICIDAD DE RECEPTORES

Las integrinas pueden reconocer a una gran cantidad de ligandos extracelulares y además con una especificidad variada. No se conoce con exactitud la causa de que una integrina sea capaz de reconocer a un amplio grupo de proteínas y en cambio otra tan sólo sea capaz de reconocer a unas pocas. En lo que no hay duda alguna es en que su especificidad como receptor es debido a la asociación  $\alpha\beta$ . [18] Esto ha llevado a considerar como posible causa las secuencias situadas a los lados del RGD y las diferentes conformaciones tanto de los puntos adhesivos de las integrinas como de los ligandos. [18]

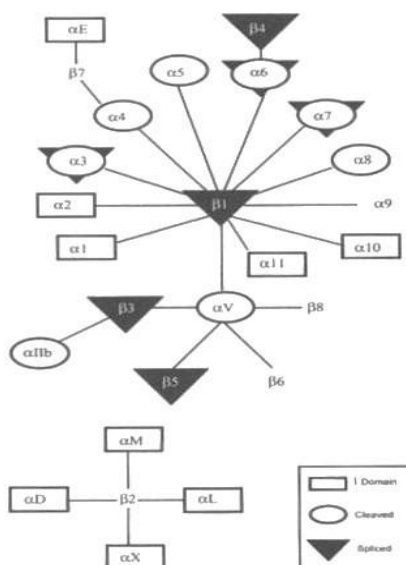


Figura 2.14.- Tipos de integrinas existentes según la combinación de las subunidades  $\alpha\beta$ . [18]

Como resultado de varios estudios se ha llegado a deducir que las integrinas presentan diferentes grados de activación entendiendo como activación los cambios existentes en la afinidad del enlace con el ligando. El proceso capaz de modificar la afinidad es definido como Modulación de la Afinidad y consiste en un seguido de señales que van desde dentro a fuera, “inside out”, siendo por lo tanto la regulación adhesiva una respuesta a estímulos fisiológicos.[18]

Como mecanismos involucrados en la Modulación de la Afinidad pueden diferenciarse dos. El receptor puede activarse mediante un seguido de cambios conformacionales realizados por otro tipo de ligandos o por cationes divalentes como deja pensar la presencia de MIDAS (Metal Ion Dependent Adhesión Sites) pudiendo modular de manera positiva o negativa. Por ejemplo, el  $Mn^{2+}$  aumenta la afinidad de receptor por su ligando mientras que el  $Ca^{2+}$  estabiliza la conformación de baja afinidad o de reposo. Actualmente se desconoce el motivo de dicho comportamiento pero muchos investigadores han comentado que el  $Mn^{2+}$  estabiliza la conformación de enlace del receptor con el ligando.[18]

También es posible modificar su nivel de activación sin ningún cambio conformacional. Para ello se forman clústeres de los receptores aumentando por lo tanto la necesidad de enlazarse con un ligando siendo



independiente del estado de activación del receptor. Como consecuencia de tener varios receptores y varios ligandos la difusión en la membrana será limitada y aumentará por lo tanto la fuerza de adhesión. [18]

## 2.6.- FUNDAMENTOS SOBRE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

Las técnicas utilizadas han sido diferenciadas en técnicas de proceso y técnicas de caracterización. Las técnicas de proceso hacen referencia a aquellas técnicas que involucran la bioactivación del titanio mediante la silanización y la adhesión de las células mediante los cultivos celulares. Por otro lado, las técnicas de caracterización incluyen aquellos métodos que hacen posible la determinación de algún factor que de evidencia de algún resultado de los ensayos realizados.

### 2.6.1.- TÉCNICAS DE PROCESO

El titanio es un material que contiene por sí solo pocos grupos hidroxilos en su superficie y por ello es necesario primero fijarlos. Existen diferentes metodologías que ayudan a obtenerlos como es el anodizado. No obstante en el estudio realizado se optó por el uso de otras dos técnicas las cuales son el plasma cleaning y la reacción de piraña.

#### 2.6.1.1.- PLASMA CLEANING

Como el término plasma cleaning dice, dicha técnica limpia y sella las probetas de titanio de estudio. Actúa modificando la superficie del material mediante el acoplamiento y la adsorción de grupos funcionales y variando su mojabilidad mediante la aportación de hidrofiliidad. Además también aporta los grupos hidroxilos necesarios a la superficie del disco para poder aplicar una silanización satisfactoria posterior sobre ellos. [19]

El plasma realizado es conocido comúnmente como plasma en frío a donde un gas es llevado a baja presión y al mismo tiempo es sometido a un campo electromagnético de elevada frecuencia oscilante. Bajo estas condiciones los iones acelerados del campo colisionan con las moléculas de gas de manera que éstos últimos son ionizados, es decir, forman el plasma. Seguidamente el gas que ha sido ionizado a plasma interacciona con la superficie del sólido situado en el medio. Como consecuencia de la interacción se producen varios efectos como es la eliminación de la materia orgánica ya que las partículas de plasma se combinan con la materia orgánica formando dióxido de carbono o metano, dependiendo del gas utilizado.

El tipo de interacción entre el plasma y la superficie de la muestra depende de parámetros como son la intensidad y la frecuencia de la radiofrecuencia usada para excitar el plasma, el tipo de gas ionizado, la presión y la velocidad del flujo de gas, el tipo de muestra y la cantidad de tiempo de la superficie expuesta en el plasma. [19]

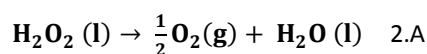
En el caso de este estudio el gas a ionizar utilizado es el oxígeno el cual posee la capacidad de eliminar la contaminación formando dióxido de carbono, oxidar la superficie, activar la superficie (mojabilidad y adhesión) y realizar el proceso de deposición (w/Si). [19]



### 2.6.1.2.- REACCIÓN DE PIRAÑA

La reacción de piraña es una reacción química en la cual están involucrados el ácido sulfúrico y el peróxido de hidrógeno. Ambos reactivos tienen dos funciones totalmente diferentes pero son dependientes el uno del otro.

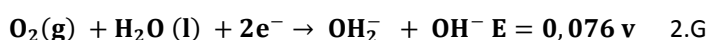
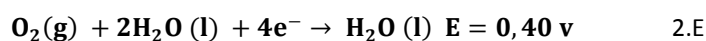
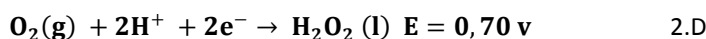
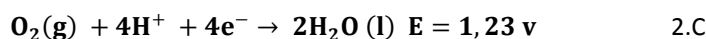
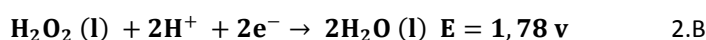
El peróxido de hidrógeno es un compuesto muy inestable de manera que con la sola presencia de polvo, iones metálicos, sangre, metales o luz da lugar a su descomposición dando oxígeno y agua tal y como es mostrado en la reacción siguiente:



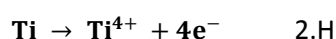
Es una reacción muy exotérmica de manera que la temperatura es elevada considerablemente. Por cada aumento de 283 K la velocidad de la reacción se multiplica por dos.

El ácido sulfúrico se caracteriza por ser capaz de disolver el óxido de titanio a elevada temperatura. Así pues, una vez la temperatura ha sido elevada como consecuencia de la descomposición del peróxido de hidrógeno el ácido sulfúrico disuelve el óxido de titanio de la superficie de la muestra dotando de una coloración anaranjada a la solución.

Una vez la muestra superficialmente posee titanio puro el peróxido de hidrógeno al estar en medio ácido es capaz de volver a oxidar el titanio mediante las siguientes reacciones de reducción.



El titanio se oxidará según la reacción



Puede considerarse que mediante la reacción de piraña se llega a generar una capa de óxido de titanio sobre la superficie con cierta homogeneidad, siendo la oxidación del titanio de manera natural más heterogénea.

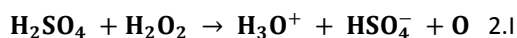
La solución piraña realiza otras funciones como es la eliminación de residuos orgánicos mediante dos procesos cuya velocidad de reacción es notablemente diferente.

El primero y el más rápido es la deshidratación del ácido sulfúrico la cual da lugar a la carbonización rápida de



los materiales orgánicos típicos como son los carbohidratos.

Como segundo proceso y más interesante es el que queda mostrado en la reacción 2.1.



Puede observarse una deshidratación del peróxido de hidrógeno dando iones hidronio, iones de bisulfato y en estado transitorio un átomo de oxígeno.

Es el átomo de oxígeno cuya reactividad es muy elevada, el encargado de disolver el carbono elemental de la siguiente manera.

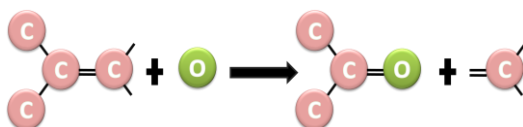


Figura 2.15. Reacción a donde puede observarse el efecto del átomo de oxígeno sobre el carbono.

El átomo de oxígeno puede considerarse que roba un electrón del enlace formado por el carbono central dando como consecuencia un grupo carbonilo y simultáneamente deja en estado de transición el carbono vecino de éste. Una oxidación posterior puede convertir el carbonilo inicial en un dióxido de carbono y crear un nuevo carbonilo con el carbono vecino cuyo enlace fue roto.

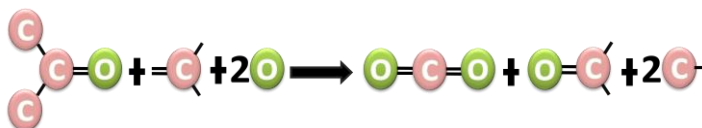


Figura 2.16. Reacción de oxidación de los compuestos obtenidos en la reacción anterior.

Una muestra sometida a la reacción de piraña aumenta considerablemente la rugosidad de la superficie como consecuencia de la violencia de la reacción.

### 2.6.1.3.- RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO

El polidimetilsiloxano, o también conocido como PDMS, es caracterizado por poseer una elevada hidrofiliidad y ser un polímero moldeable. Su estructura viene representada por la figura 2.17.

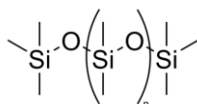


Figura 2.17. Estructura del PDMS.

Un aspecto importante a la hora de trabajar con polímeros una vez han sido formados es llevar a cabo su





conformado. En el caso del PDMS dicho proceso tiene lugar en dos etapas. Primero el polímero es preparado con estructura lineal en una fase líquida cuyo punto de fusión es bajo. Éste se introduce en un molde. En la segunda etapa tiene lugar el curado, es decir, su endurecimiento. Para ello debe de aumentarse la temperatura, añadirse un catalizador o llegar a baja presión. Durante el curado existen reacciones químicas y estructurales en las cuales las cadenas poliméricas son entrecruzadas y aumentando mucho las interacciones intermoleculares de naturaleza covalente. Después del curado el PDMS se ha convertido en un polímero estable dimensionalmente por lo que es posible extraerlo del molde no cambiando mucho su tamaño con la temperatura. [29]

En el caso del ensayo se ha llevado a cabo únicamente la segunda etapa ya que el polímero se ha obtenido del fabricante en su forma lineal y en fase líquida. Para su curado se ha utilizado un crosslinker.

Para recubrir las muestras de titanio con oro se ha llevado a cabo la conocida técnica de evaporación térmica en vacío la cual consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. El vapor del material termina condensándose en forma de lámina delgada sobre la superficie fría del sustrato y las paredes de la cámara de vacío. Normalmente la evaporación se hace a presiones reducidas, del orden de  $10^{-6}$  o  $10^{-5}$  Torr, para evitar la reacción del vapor con la atmósfera ambiente. A estas presiones bajas, las partículas viajan en línea recta desde la fuente de evaporación (crisol) hasta el sustrato. En las técnicas de evaporación térmica, el calentamiento del material puede llevarse a cabo por diferentes métodos siendo en el caso utilizado mediante una resistencia (efecto Joule). [30]

## **2.6.2.-CULTIVOS CELULARES**

Toda célula es capaz de continuar su crecimiento una vez ha sido extraída del tejido animal siempre y que el nuevo medio en el cual se encuentra contenga la cantidad suficiente y las condiciones apropiadas de nutrientes o de factores de crecimiento. Este proceso es conocido como cultivo celular pudiéndose dar *in vitro* (en un recipiente externo al animal) o *in vivo* (en vida).

Las células animales sometidas a cultivos son consideradas como unidades independientes al igual que otros microorganismos como son las bacterias o los hongos. Dichas células a pesar de que suelen ser células de un mismo tipo pueden ser genéticamente idénticas (población homogénea) o pueden ser genéticamente diferentes (población heterogénea). [20]

### **2.6.2.1.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS CULTIVOS CELULARES**

Ventajas:

- Se obtiene una buena consistencia y reproducibilidad de los resultados principalmente en cultivos cuyas poblaciones son homogéneas.
- En laboratorios a donde se realizan ensayos con animales han sido establecidos diversos procedimientos toxicológicos siendo más baratos en cultivos celulares que en ensayos con animales.



- En la producción de productos biológicos a gran escala la no presencia de ciertos contaminantes como son virus o ciertas proteínas es un factor importante. Dicha acción es más fácil de llevar a cabo en cultivos celulares bien caracterizados que con un conjunto de tejidos de animales.

Desventajas:

- La mayor desventaja en el uso de cultivos celulares es que después de un cierto periodo de crecimiento las características de las células pueden cambiar pudiendo ser bastantes diferentes las células de la original. Esto es debido a que las células pueden adaptarse a diferentes nutrientes introduciendo así cambios en la actividad de las enzimas intracelulares. [20]

### 2.6.2.2.- CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS EN LOS CULTIVOS CELULARES

Algunas células son obtenidas de una colección de cultivos o aisladas del tejido animal de manera que los cultivos son iniciados por la inoculación de células en un medio de crecimiento esterilizado. Con la finalidad de obtener una velocidad de crecimiento razonable, la inoculación de las células debería de realizarse a una densidad de  $10^4$ - $10^5$  células/ml.[20]

Para que la célula pueda crecer es necesario que ésta esté anclada a un sustrato. Con un par de horas de inoculación aparece su anclaje con el sustrato. A nivel de laboratorio dicho sustrato suele hacer referencia a los

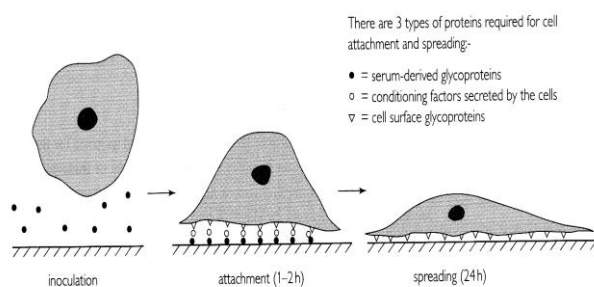


Figura 2.18. Adhesión célula-sustrato.[20]

El crecimiento celular tiene lugar hasta un límite ya que pasado un cierto tiempo las células entran en una fase de envejecimiento en la cual no crecen. Dicho límite depende entre otros factores de los nutrientes existentes en el medio, una acumulación de sustancias tóxicas procedentes del metabolismo de las células etc. Por ello es necesario y de vital importancia cambiar el medio cada dos días pudiendo tener incluso una mayor densidad.

frascos utilizados. La interacción entre la membrana celular y la superficie de crecimiento es crítica y envuelve interacciones tipo Van der Waals o electrostáticas. La adhesión celular tiene lugar mediante cationes divalentes (normalmente  $Ca^{2+}$ ) y diversas proteínas básicas formando una capa entre la célula y el sustrato.

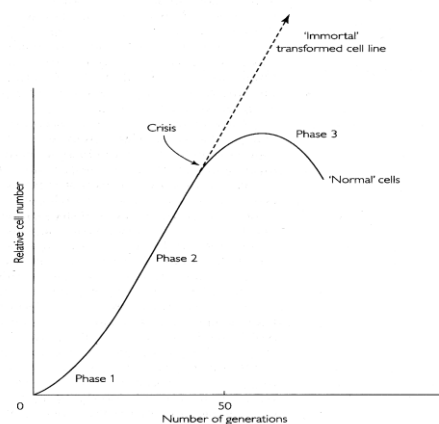


Figura 2.19. Comportamiento de crecimiento de una célula.[20]



Previamente a la división celular tiene lugar la duplicación del ADN, incluida la secuencia de bases que constituyen el telómero. El telómero presenta una forma de capucha y está situado en los extremos de los cromosomas de tal manera que el cromosoma está protegido de la degradación y de la unión de los extremos del ADN a enzimas reparadoras. Al dividirse las células normales no es posible una total duplicación de la secuencia del telómero y por ello éste se hace cada vez más corto.

Como consecuencia su función protectora no es del todo buena haciéndose el cromosoma inestable y dando errores en la segregación, anomalías e incluso mutaciones. Las células que poseen estos defectos no son capaces de dividirse y dejan de ser viables dándose procesos de apoptosis o de muerte celular programada. [21]

Dicho comportamiento se da en tejidos somáticos pero no se da en células germinales y embrionarias (el cuerpo no puede prescindir de ellas) ya que existe un elemento capaz de restaurar el telómero manteniendo su capacidad de duplicación. Este elemento es conocido como telomerasa que consiste en un complejo de proteínas y ADN. [21]

Cuando los telómeros están en el punto crítico de encogimiento en varios cromosomas (es irreversible el ciclo celular), las células entran en crisis.

### **2.6.2.3.- PASES DE UN CULTIVO CELULAR**

Dependiendo de los pasos realizados con los cultivos celulares se les dota de una nomenclatura para poder diferenciar los procesos que han tenido lugar sobre ellos.

De esta manera se nombra como cultivo primario a aquellos cultivos cuyas células proceden directamente del tejido animal y son añadidos al medio de cultivo. Normalmente dichas células proceden de tejidos embrionarios ya que estas células poseen una mayor capacidad de crecimiento y de dispersión.

Cuando las células del cultivo primario ya no son capaces de crecer más debe de realizarse un nuevo cultivo celular y para ello se traspasan algunas células a un nuevo medio. Dicha acción es conocida como pase y el nuevo cultivo se llama cultivo secundario. A cada pase realizado se le dota de un número de pase.

Es importante de realizare el primer pase de las células al día siguiente de inocularlas o cuando la densidad celular es tan elevada que impide su crecimiento. Además la temperatura del nuevo medio y su pH debe de ser de 310 K y de 7,4 aproximadamente respectivamente. [20]

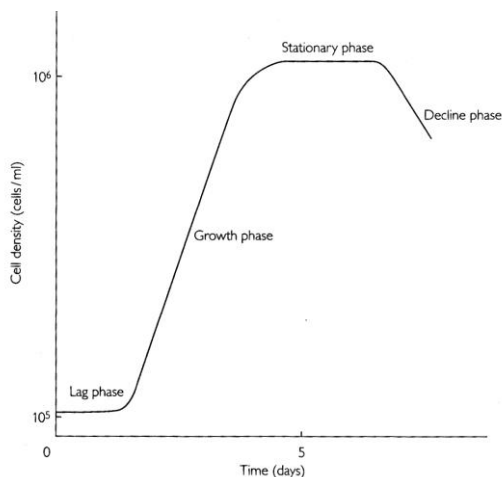
Al realizar el pase, como que las células están adheridas al soporte del frasco es necesario de desengancharlas mediante el proceso de tripsinización. La tripsina es una enzima proteolítica la cual descompone las cadenas que funcionan como nexo de unión entre el sustrato y la célula. La tripsina es añadida para limpiar las células en el frasco de cultivo durante un periodo de tiempo no lo suficientemente corto como para poder extraer las células del frasco pero no lo suficientemente largo como para dañarlas. El efecto de la tripsina es mayor



siempre y que no exista calcio ni magnesio en el medio.

#### 2.6.2.4.- LAS FASES DE UN CULTIVO

Las células poseen un modelo de crecimiento tal y como viene representado en la Figura 2.20.



**Fase inicial:** Durante la fase inicial no existe un aparente crecimiento de células ya que este tiempo es utilizado para la formación de los factores de crecimiento. Éstos son necesarios para poder alcanzar la concentración crítica celular sin la cual el crecimiento celular no puede tener lugar.

La duración de dicha fase depende del medio de cultivo, de la concentración inicial y del estado de las células. Así pues, a menores densidades de células la fase inicial es mayor.[20]

Figura 2.20. Fases de crecimiento de una célula.[20]

**Fase de crecimiento:** Durante esta fase las células aumentan de manera exponencial, respondiendo a la siguiente ecuación dicho aumento:

$$N = N_0 \times 2^X \quad 2.1$$

A donde N es la concentración final de células,  $N_0$  es la concentración inicial celular y X es el número de generaciones de crecimiento celular.

**Fase estacionaria:** Esta fase aparece cuando no hay un mayor crecimiento en la concentración de células de manera que durante dicha fase la velocidad de muerte celular es igual a la velocidad de crecimiento celular.

En este punto el crecimiento celular es limitado por varias condiciones:

- Los nutrientes han sido reducidos a un nivel tal que actúan como inhibidores del crecimiento celular.
- Existe una acumulación de productos procedentes del metabolismo tal que actúan como inhibidores del crecimiento.
- Las células han generado una capa la cual cubre totalmente la superficie de crecimiento de manera que el crecimiento es afectado.

Durante la fase estacionaria las células continúan siendo activas metabólicamente hablando a pesar de no crecer.



**Fase de deterioro:** Esta fase tiene lugar como consecuencia de la muerte celular. Existen dos posibles mecanismos de la muerte celular:

- Apoptosis: es conocida como suicidio celular ya que es una muerte programada donde la célula al morir empaqueta su contenido evitando así que se produzca una respuesta inflamatoria. De esta manera son fácilmente englobadas vía fagocitosis por lo que sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente.
- Necrosis: comprende un estado irreversible de la célula la cual no es capaz de mantener la integridad de la membrana plasmática de manera que se hincha y revienta derramando todo su contenido, posiblemente dañino, por todo el espacio intercelular. Como consecuencia se crea la respuesta inflamatoria.

#### **2.6.2.5.- LA IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS ASÉPTICAS/ESTERILIZADAS**

En el ámbito de cultivos celulares la contaminación es el principal problema de muchos de los fracasos. Los cultivos son susceptibles a la presencia de bacterias debido a la diferencia existente en la velocidad de crecimiento, siendo en el caso de bacterias mucho mayor.

#### **2.6.2.6.- CONDICIONES DE CULTIVO**

Las mejores condiciones establecidas en los cultivos celulares son de 310 K y de pH de 7,4. Cuando la temperatura es menor a la óptima la velocidad de crecimiento disminuye pero las células no serán dañadas. En cambio, si la temperatura es mayor a 312-313K las células son destruidas. [20]

El pH del cultivo es mantenido por el tampón bicarbonato-CO<sub>2</sub> el cual es el principal proceso que opera en la sangre en vivo.



El pK<sub>s</sub> del tampón es de 6,3 el cual es adecuado pero no el ideal para mantener los cultivos a un pH de 7,4.

El equilibrio del tampón en fase líquida depende de la presencia de CO<sub>2</sub> en la fase gas. Por ello, como es descrito en los protocolos de pH, la atmosfera de la incubadora es rica en CO<sub>2</sub>. Así pues, el bicarbonato presente en el medio cuya concentración normalmente es de 24 mM se mantiene en equilibrio con el CO<sub>2</sub> presente en la fase gaseosa siendo su porcentaje de un 5%. No obstante para asegurar el buen mantenimiento del pH del cultivo suele ponerse un 10% de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa. Además de esto debe de tenerse en cuenta el medio que se utiliza a la hora de sumergir las células ya que dependiendo del medio dicho porcentaje variará. [20]

A pesar de todas las medidas tomadas para mantener el pH estable existen otros factores no controlables los cuales lo hacen variar. Por ejemplo, durante el proceso de crecimiento existe una descomposición del bicarbonato del medio generando un aumento del pH. Por otro lado, a medida que las células crecen su



metabolismo se perfecciona y como resultado generan ácido láctico el cual hace disminuir gradualmente el pH. Estas variaciones no deben de salirse del intervalo de pH de 6,8 a 7,6. Para poder controlar en qué situación de pH se encuentra el medio es utilizado el rojo fenol el cual está presente normalmente en el medio. De esta manera puede estimarse el pH según el color que el medio presenta: [20]

- pH 6,5 = amarillo
- pH 7,0 = naranja
- pH 7,4 = rojo
- pH 7,8 = violeta

### 2.6.2.7.- MEDIO DE CULTIVO

Las células son cultivadas en un medio líquido de química compleja útil para soportar el crecimiento de diferentes generaciones. Hay algunos medios de formulación estándar que han sido desarrollados para el crecimiento particular de determinados tipos de células.

Media	Comments
BME	Eagle's basal medium; originally designed for mouse L and HeLa cells
EMEM	Eagle's minimum essential medium; used for a wide variety of cell lines
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium; has 4× the amino acid and vitamin concentration of BME
GMEM	Glasgow's modification of Eagle's medium; has 2× the amino acid and vitamin concentration of BME
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium; used for lymphocyte and hybridoma cultures
Leibovitz	Used for fibroblast growth in the absence of a CO <sub>2</sub> -enriched atmosphere
Ham's F-12	Has a complex composition and used for a variety of cell lines
199	Extremely complex medium (61 components) and can support cell growth without serum

Tabla 2.3.- Tipos de medios y su composición.[20]

Para determinar el medio a utilizar en una línea celular específica es recomendable consultar la literatura para poder ver si hay experimentos previos que aconsejen el uso de un medio con una formulación particular. Como alternativa, algunos procesos de crecimiento utilizan más de un medio.

### COMPONENTES DE UN MEDIO DE CULTIVO TIPICO

A continuación se comentan los componentes de un medio usados comúnmente: [20]

- Carbohidratos: La glucosa está presente en la mayoría de compuestos del medio debido a que es una fuente de energía así como el precursor de la biosíntesis.
- Alternativas a los carbohidratos deben de ser utilizados como es la fructosa la cual disminuye la producción del ácido láctico y estabiliza el pH del cultivo.



- Los aminoácidos son incluidos en concentraciones de 1-0,2 mM como fuente precursora de la síntesis de proteínas.
- Las sales son incluidas en el medio ya que la solución es isotónica y no tiene desequilibrios con el contenido intracelular.
- El bicarbonato es normalmente incluido para actuar como un tampón al reaccionar con los gases atmosféricos los cuales contienen una 5-10% de dióxido de carbono aportado por la incubadora. Esto permite mantener el cultivo a un pH establecido entre 6,9 y 7,4. Como desventaja del tampón bicarbonato-CO<sub>2</sub> es que el medio se convierte en alcalino muy rápidamente al ser extraído de la incubadora. Para evitar este efecto o disminuir su acción se añade un tampón orgánico conocido como HEPES (pKa=7,3 a 37 °C) a una concentración de 10-20 mM. Existen otros tipos de tampones orgánicos también útiles como son el MES (pKa = 6,5) y CHES (pKa = 9,5). El HEPES es el mejor de ellos para cultivos celulares ya que las células pueden crecer sin la presencia de una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.
- A bajas concentraciones hay vitaminas y hormonas y son utilizadas como co-factores metabólicos.
- El rojo fenol es añadido normalmente como un indicador de pH ya que es muy sensible a las pequeñas variaciones del medio que tienen lugar alrededor de las condiciones óptimas de crecimiento celular. A bajos pH el rojo fenol cambia a naranja (pH 7) o amarillo (pH 6,5). Una contaminación bacteriana es normalmente indicada por una variación de rojo a amarillo.
- El suero promueve el crecimiento de las células. Normalmente se añade suero en el medio a una concentración del 10% (v/v). El suero es el líquido sobrante de la sangre coagulada la cual contiene material no definido esencial para la proliferación celular.
- La función de los antibióticos es de reducir el riesgo de contaminación de cultivos de poco tiempo de vida. Suelen utilizarse en combinación con el medio además de debe de controlarse mucho su concentración a que pueden ser citotóxicos.

### **2.6.3.- TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN**

Las técnicas comentadas a continuación han sido utilizadas para poder estudiar toda acción realizada sobre la superficie del titanio para satisfacer los objetivos planteados inicialmente.

#### **2.6.3.1.- FUNDAMENTOS DE RUGOSIDAD**

En el presente proyecto se caracteriza la rugosidad superficial en diferentes lugares de una misma estructura y en diferentes muestras.

Antes de discutir los parámetros de rugosidad es necesario diferenciar el concepto de rugosidad propiamente dicha y otros componentes de la textura o morfología como es la ondulación (waviness) y curvatura e inclinación o tendencia (trend), es decir, error de forma. [22]



- Rugosidad: conjunto de irregularidades de la superficie real, definidas convencionalmente en una sección a donde los errores de forma y las ondulaciones han sido eliminados.
- Ondulación superficial: conjunto de irregularidades de la superficie cuyo espaciado es superior a la presentada en la rugosidad.
- Error de forma: aparece cuando existe una gran desviación de la forma nominal de la pieza.

Al realizar la caracterización de la superficie de la muestra aquello que interesa obtener como resultado es la rugosidad pudiendo eliminar las otras dos mediante filtros proporcionados por el software del equipo.

En general los parámetros utilizados para cuantificar la rugosidad pueden interpretarse como parámetros propios de la distribución estadística de alturas del perfil o superficies bajo análisis. Pueden darse en dos o en tres dimensiones.

Los parámetros de rugosidad dependen de la longitud, del área de medida y de la resolución del equipo utilizado. Por ello, los resultados obtenidos de diferentes técnicas se podrán comparar siempre y que las frecuencias utilizadas sean del mismo orden. Además, si han sido utilizados filtros éstos deben de ser lo más parecidos posibles y presentar toda la información posible de éstos en los resultados finales. [1][8]

Existe gran cantidad de parámetros que describen la rugosidad superficial siendo presentados a continuación los utilizados. En su descripción se hace referencia a una línea media que es una línea de referencia para el cálculo de los distintos parámetros.[1][8]

#### **S<sub>a</sub> (Medida aritmética de la desviación del perfil):**

Es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil R (X<sub>i</sub>, Y<sub>i</sub>) dentro de la longitud de la muestra. Es utilizado normalmente para cuantificar de manera general la rugosidad de una superficie.

$$S_a = \frac{1}{NM} \times \sum_{j=1}^N \sum_{l=1}^M \eta |X_j; Y_l| \quad 2.2$$

#### **S<sub>q</sub> (Medida de la raíz cuadrada de las desviaciones de la superficie):**

Representa la desviación estándar de la distribución de las alturas respecto de la superficie.

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{NM} \times \sum_{j=1}^N \sum_{l=1}^M \eta^2 |X_j; Y_l|} \quad 2.3$$

#### **S<sub>sk</sub> (Skewness):**

Parámetro estadístico que describe la distribución gaussiana de la altura respecto del plano medio. Si el valor es menor que cero indica el predominio de valles y si el valor es mayor que cero, el predominio de picos.





$$S_{sk} = \frac{1}{NS_q^4} \times \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \eta^4 |X_j; Y_i| \quad 2.4$$

#### **S<sub>ku</sub> (Kurtosis):**

Parámetro estadístico que describe la distribución de alturas de la superficie respecto al plano medio. Una superficie con distribución gaussiana tiene un parámetro de kurtosis igual a 3. Un valor >3 indica una distribución de picos y valles irregular (defectos con carácter local) y un valor <3, una distribución progresiva de picos y valles (patrón de defectos geométricos).

$$S_{ku} = \frac{1}{MNS_q^4} \times \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \eta^4 (X_i, Y_i) \quad 2.5$$

#### **S<sub>m</sub> (Paso medio de las irregularidades del perfil):**

Es un parámetro horizontal, calculado como su parámetro equivalente bidimensional. Es la distancia media entre picos medidos a lo largo de la longitud de medida, el pico se define como el punto más alto del perfil que cruza en subida o en bajada la línea media.

$$S_m = \frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^N S_i \quad 2.6$$

**S<sub>real</sub> (Superficie real):** es el límite que separa el cuerpo del resto del espacio tanto incluyendo valles como picos.

**Superficie nominal:** es la superficie prescrita técnicamente y dada en el dibujo con sus medidas normalizadas.

**S<sub>i</sub> (índice de superficies):** es el cociente entre la superficie real y la nominal.

$$S_i = \frac{S_{real}}{S_{nominal}} \quad 2.7$$

#### **2.6.3.2.- FUNDAMENTOS DE FLUORESCENCIA**

El proceso de fluorescencia se basa en la excitación por absorción de átomos o moléculas a partir de un haz electromagnético de manera que al relajarse las especies excitadas a su estado fundamental devuelven el exceso de energía en forma de fotones.

En la figura 2.21 puede observarse un diagrama parcial de energía de una molécula hipotética el cual puede ayudar a entender de mejor manera lo anteriormente comentado. Están representados el nivel fundamental ( $E_0$ ) y dos niveles excitados ( $E_1$  y  $E_2$ ). Además cada uno de los estados electrónicos posee estados vibracionales excitados. Así pues, cuando una molécula de estas características es expuesta a una banda de radiación visible, (de  $\lambda'_1$  a  $\lambda'_5$ ) los estados electrónicos del nivel energético  $E_1$  son poblados. De manera similar sucede lo mismo cuando la molécula es radiada con una banda de radiación ultravioleta (de  $\lambda''_1$  a  $\lambda''_5$ ) pero en este caso se puebla en nivel energético  $E_2$  el cual es más energético.[23]



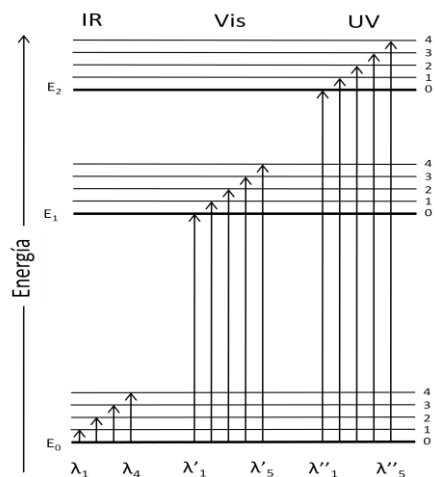


Figura 2.21. Absorción molecular de un caso hipotético.

2.6.3.2.1.- PROCESO DE RELAJACIÓN

El tiempo de vida de una molécula excitada es muy corto, dándose lo que se conoce como proceso de relajación, es decir, relajación de la especie a su nivel energético fundamental. Los procesos más importantes son los no radiantes y el proceso de fluorescencia. En la figura 2.22 quedan esquematizados éstos.

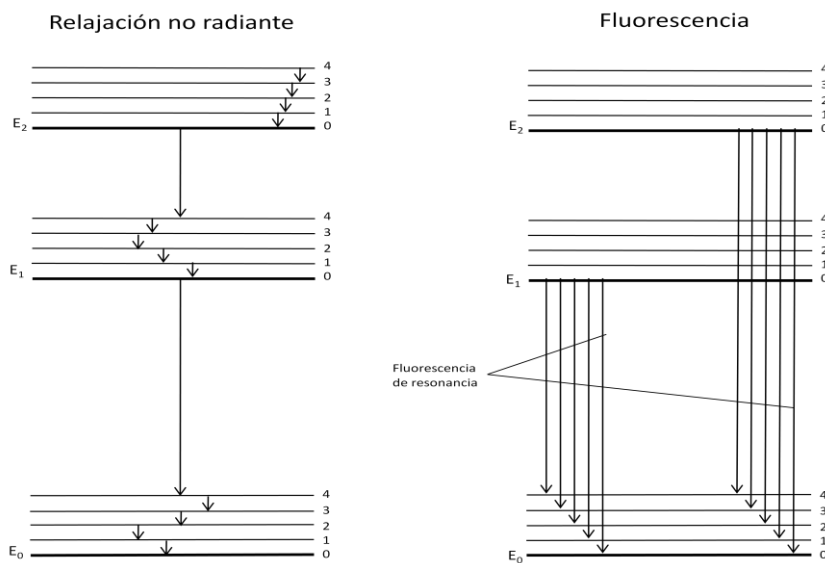


Figura 2.22. Procesos de relajación más importantes.

En el proceso de relajación no radiante pueden diferenciarse a la misma vez dos tipos:

- Desactivación o relajación vibracional: Aparece cuando las moléculas excitadas y las del disolvente colisionan entre ellas de manera que el exceso de energía vibracional es pasado a las moléculas el disolvente, aumentando la temperatura del medio como resultado. Queda representado por flechas pequeñas entre niveles energéticos vibracionales.



- Conversión interna: Consiste en una relajación entre el nivel vibracional más bajo de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional más elevado de otro estado electrónico. Los mecanismos que siguen éste no son bien conocidos pero se ha observado un aumento de la temperatura del medio como resultado.

En el proceso de fluorescencia las moléculas electrónicamente excitadas pueden relajarse a cualquier estado vibracional del nivel fundamental. Por ello, todas las especies absorbentes son potencialmente fluorescentes. Sin embargo, no lo son ya que su estructura permite caminos no radiantes los cuales son procesos de relajación más rápidos que los fluorescentes.[23]

#### 2.6.3.2.2.- ESPECIES FLUORESCENTES

Los compuestos que contienen anillos aromáticos son los que proporcionan una emisión de fluorescencia molecular más intensa y más útil. También especies con dobles enlaces presentan fluorescencia pero ésta es de menor intensidad.

La fluorescencia está favorecida por la rigidez de la molécula ya que ésta disminuye la velocidad de relajación no radiante de tal manera que hay el tiempo suficiente para que tenga lugar la fluorescencia.

#### **2.6.3.3.- FUNDAMENTOS DE INTERFEROMETRÍA**

Existe un gran abanico de métodos que pueden describir y caracterizar la rugosidad superficial de una muestra tanto en un perfil bidimensional como tridimensional y dar información de manera cualitativa o cuantitativa.

Todas estas técnicas están limitadas principalmente por el principio físico en el que está basado el método, interfiriendo en la resolución lateral y/o vertical, accesibilidad al detalle, longitud de medida máximo, rango de área y/o altura capaces de ensayar. [1]



Método	Ventajas	Inconvenientes
<b>Perfilometría con punta palpadora</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muy utilizada.</li> <li>- Normalizada (ISO, DIN...)</li> <li>- Posibilidad de obtener perfiles bidimensionales de entre mm y cm con facilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resolución lateral limitada.</li> <li>- Deforma las superficies blandas.</li> <li>- Poco común para la caracterización lateral.</li> </ul>
<b>Microscopía interferométrica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No hay contacto mecánico: no destructiva.</li> <li>- Obtención rápida de perfiles bidimensionales.</li> <li>- Resolución: Vertical (ap.): 1 nm Lateral (ap.): 0.2 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Para altas mediciones laterales sólo es posible medir áreas muy pequeñas.</li> <li>- Para grandes áreas se debe de combinar añadiendo imágenes de alta resolución.</li> </ul>
<b>Microscopía confocal láser</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No hay contacto mecánico: no destructiva.</li> <li>- Resolución: Vertical (ap.): 500nm Lateral (ap.): 0.25<math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Artefactos: para pendientes &gt;20°.</li> <li>- Necesidad de superficies reflectoras a la luz.</li> <li>- Para altas resoluciones laterales sólo es posible medir áreas muy pequeñas.</li> </ul>
<b>Microscopía óptica de barrido (SEM)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta resolución: Vertical (ap.): 1nm Lateral (ap.): 10nm</li> <li>- Alta profundidad de foco.</li> <li>- Información morfológica.</li> <li>- Análisis químico local (energía de dispersión de rayos X).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No proporciona información cuantitativa.</li> <li>- Necesidad de recubrir las muestras no conductoras.</li> <li>- Trabajo sólo en vacío.</li> </ul>
<b>Microscopía electrónica de barrido ambiental (SEM)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta resolución: Vertical (ap.): 1nm Lateral (ap.): 10nm</li> <li>- Alta profundidad de foco.</li> <li>- Información morfológica.</li> <li>- Posibilidad de observar muestras hidratadas.</li> <li>- Posibilidad de observar muestras no conductoras.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No proporciona información cuantitativa.</li> </ul>
<b>Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La más alta resolución tanto vertical como lateral (atómica a nm).</li> <li>- Alta versatilidad en términos de condiciones de medida en diversos ambientes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitado rango en dirección z (problemas con la rugosidad elevada).</li> <li>- Artefactos: distorsión de la superficie por la forma de la punta, particularmente para superficies con relación de aspecto elevada.</li> <li>- Generalmente sólo se miden pequeñas áreas.</li> </ul>

Tabla 2.4.- Técnicas que pueden definir y caracterizar la rugosidad de las muestras.

A la hora de seleccionar la metodología a realizar se han tenido en cuenta los siguientes aspectos:

- Las muestras poseen un área relativamente grande.
- Interesan medidas cuantitativas.
- Se requieren ensayos no destructivos para una posterior silanización de la muestra.

Teniendo presentes las consideraciones anteriores junto con el tiempo de ensayo y la exactitud requerida se decantó por el uso de la Microscopía interferométrica.

La microscopía óptica interferométrica se basa en las interferencias obtenidas a partir de las diferencias de camino óptico recorrido por la luz incidente y la luz reflejada en la superficie de la muestra a diferentes distancias entre el objetivo y la superficie. [23]



El microscopio en sí se basa en una fuente de iluminación, tradicionalmente una bombilla halógena de tungsteno, unida a un sistema óptico con diferentes objetivos. La luz se divide en dos haces, uno se transmite a la superficie de la muestra y la otra a una superficie de referencia. La luz refleja en ambas superficies se combina y forma un dibujo de franjas de interferencia cuya intensidad es registrada en una cámara CCD. Así pues, la superficie de referencia se mueve de manera vertical, primero hacia arriba y después hacia abajo, registrando diferentes puntos de superficie y su intensidad. Estos datos posteriormente son analizados por el software del equipo que determina la altura de cada uno de los puntos de la superficie. [23]

#### 2.6.3.4.- **ÁNGULO DE CONTACTO Y TENSIÓN SUPERFICIAL**

Puede definirse el ángulo de contacto como el ángulo formado por la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido.

Debido a los diferentes tratamientos a los que ha sido sometido el disco de titanio su mojabilidad ha ido variando. Por ello una buena manera de entender la variación de su superficie es estudiar las variaciones del ángulo de contacto en cada uno de los pasos realizados.

Mediante el plasma cleaning se han depositado sobre la superficie de titanio grupos hidroxilos los cuales son dipolos cargados negativamente. Por ello se considera que en este caso la superficie de titanio es hidrofílica, es decir, debido a que el agua es otro dipolo presentará una cierta afinidad por los grupos hidroxilos y por lo tanto la gota formada presentará un ángulo de contacto menor.

En el caso del piraña se puede observar el mismo comportamiento pero la rugosidad es una variable que afecta a los resultados obtenidos. Según diferentes autores, a mayor rugosidad el comportamiento de hidrofilidad o hidrofobia que presenta la muestra se verá acentuado.

Durante la silanización se han introducido grupos silanos sobre la superficie de manera que los dipolos negativos del hidroxilo han sido compensados. De esta manera la afinidad con el agua ha disminuido considerándose la muestra más hidrofóbica y consecuentemente el ángulo de contacto formado será mayor.

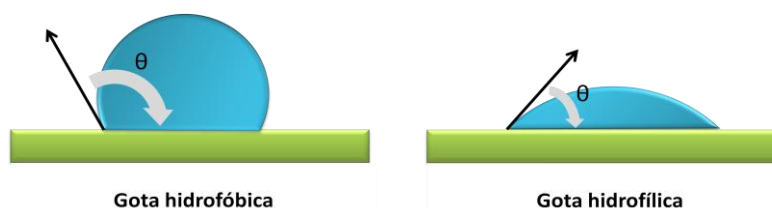


Figura 2.23. Representación de una gota hidrofóbica y hidrofílica.

Una vez es conocido el valor del ángulo de contacto del material puede conocerse el valor de la energía superficial del sistema. Para calcular el valor de ésta se utiliza la ecuación de Young la cual relaciona las tensiones de interfase en un punto a donde están en contacto tres fases.



$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cdot \cos\theta \quad 2.8$$

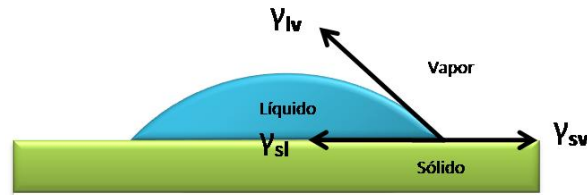


Figura 2.24. Representación de las diferentes energías involucradas en el cálculo de la tensión superficial.

$\gamma_{sv}$  es la energía libre interfacial sólido-vapor,  $\gamma_{sl}$  es la energía libre de la interfase sólido-líquido y  $\gamma_{lv}$  es la energía libre de la interfase líquido-vapor. Normalmente la energía libre de la interfase sólido-vapor y líquido-vapor son equivalentes a la energía superficial libre del sólido y del líquido respectivamente. De esta manera la ecuación anterior queda como:

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cdot \cos\theta \quad 2.9$$

Tan sólo son calculables directamente de la ecuación de Young dos variables, la energía libre superficial del líquido y el ángulo de contacto. Para obtener el valor de la energía libre superficial del sólido es necesaria una ecuación más compleja y que es capaz de relacionar la energía interfacial libre sólido-líquido con las dos variables anteriores. [25]

Han sido desarrolladas diferentes formas de cálculo las cuales tienen presente las interacciones electrostáticas, el factor termodinámico, el comportamiento polar de las especies involucradas etc. En el cálculo de la tensión superficial de este proyecto se ha utilizado el método conocido como Ecuación de Estado.

La ecuación de estado se basa en el cálculo de la tensión superficial a partir de la medida del ángulo de contacto y de la tensión superficial del líquido usado. Partiendo de la ecuación de Young puede observarse la necesidad de una segunda ecuación la cual también describa la energía superficial del sólido como función de la tensión de interfase sólido/líquido y la tensión superficial del líquido. [26]

$$\gamma_s = f(\gamma_{sl}, \gamma_l) \quad 2.10$$

A partir de consideraciones termodinámicas se llegó a afirmar la existencia de una ecuación válida para todos los sistemas. Utilizando por lo tanto gran cantidad de valores de ángulos de contacto pudo formularse de manera empírica la ecuación de estado:

$$\gamma_{sl} = \gamma_l + \gamma_s - 2\sqrt{\gamma_l \cdot \gamma_s} \cdot e^{-\beta(\gamma_s - \gamma_l)^2} \quad 2.11$$

El valor de la constante  $\beta$  corresponde a 0.0001247. Cuando dicha ecuación de estado es introducida en la ecuación de Young resulta una de nueva la cual hará posible el cálculo de la tensión superficial del sólido



conociendo tan sólo el ángulo de contacto siempre y que la tensión superficial del líquido sea conocida. [26]

$$\cos \theta = -1 + 2 \sqrt{\frac{\gamma_s}{\gamma_l}} \times e^{-\beta(\gamma_s - \gamma_l)^2} \quad 2.12$$

El método utilizado no tiene en cuenta las interacciones principales causantes de la tensión de interfase siendo demostrado por un seguido de experimentos que el único conocimiento de la tensión superficial del líquido no es suficiente. En estos ensayos se calculó el ángulo de contacto de líquidos con similitud en sus tensiones superficiales obteniendo diferencias en las interacciones polares. Por ello deben de tenerse en cuenta éstas, lo cual significa que la ecuación de estado es útil en situaciones a donde sólo hay interacciones dispersas o cuando éstas son la mayoría. [26]

### 2.6.3.5.- FUNDAMENTOS DE ToF-SIMS

La Espectrometría de Masas de Iones Secundarios por Tiempo de Vuelo (ToF-SIMS) es una de las técnicas más sensitivas superficialmente hablando que da información molecular de films orgánicos y/o contaminantes.[27] Su análisis superficial permite una caracterización completa de la superficie de trazas de metales y de compuestos orgánicos. [27]

Como características pueden encontrarse:[27][27]

- Detección de todos los elementos.
- Sensibilidad de isótopos.
- Obtención de información química a partir de las moléculas, fragmentos y clústeres.
- Información en profundidad.
- Alta resolución lateral.
- Bajo límite de detección (ppm-ppb).
- Puede considerarse semidestructiva.
- Sensibilidad óptima.
- Alta resolución espacial.
- Elevada resolución másica >10000.
- Exactitud elevada en su determinación de 1 a 10 ppm.

Entre las características comentadas cabe destacar la obtención de información elemental y molecular imposible de obtener con otras técnicas como son el XPS o AES. Por ello las ventajas que presenta es la información aportada al detalle de moléculas, su elevada sensibilidad, su elevada resolución con aislantes, la facilidad de neutralización de carga, utiliza el primer haz de ion pulsado por lo que los daños son minimizados, elevada resolución espacial de la imagen y detección de isótopos tales como  $D^2$ ,  $O^{18}$  Y  $C^{13}$ . [27]



Como toda técnica existen limitaciones. En este caso es la utilización de estándares para el proceso de cuantificación, los estándares deben de estar en la misma matriz, la sensibilidad varía de elemento a elemento X1000, la base de datos del espectro de masa orgánico ha empezado relativamente hace poco tiempo a realizarse por lo que carece de una información variada. [27]

Pueden diferenciarse tres modos de operación:

- Espectroscopía Superficial.
  - o Información elemental y molecular.
  - o Sensibilidad en ppm.
  - o Resolución de masas mayor a 10000.
- Imagen analítica de la superficie.
  - o Resolución lateral mayor de 100 nm.
  - o Detección en paralelo de masas.
- Perfiles en profundidad.
  - o Resolución en profundidad menor a 1 nm.
  - o Rango situado entre 1 nm y 10  $\mu\text{m}$ .
  - o Ideal para aislantes.

El espectrómetro utilizado usa el ion de Bismuto y no el de Oro como es habitual para bombardear la superficie. Ello es debido a que el Bismuto posee una mayor masa (209) que el Oro (197); posee una mayor resolución lateral (100 nm); aporta una mayor intensidad de emisión de clústeres; forma una doble carga ( $\text{Bi}_3^{2+}$ ) cuya proporción es elevada y genera un doble impacto de energía además de algunos iones secundarios; posee un buen enfoque dando una resolución lateral de 100 nm.[27]

La sensibilidad de la técnica es tan elevada que es capaz de obtener datos con sólo arrancar una fracción de la monocapa más externa de manera que la superficie visiblemente no se ve modificada. Por ello es considerado el ToF-SIMS como una técnica semidestructiva.

Durante la adquisición cada ion primario debe de golpear un área no dañada siendo bombardeadas tan sólo un 0.1% de las zonas atómicas durante la medida. La densidad atómica de la superficie es de  $10^{15}$  at/cm<sup>2</sup>. [27]

### **2.6.3.6.- FUNDAMENTOS DE XPS**

Los rayos-X son muy útiles para caracterizar los sólidos y sus estructuras. El material puede responder de diferentes maneras a la absorción de los rayos X generando un conjunto de técnicas relacionadas pero que dan también información complementaria.

Entre ellas se encuentran:

- XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy): analiza las energías de los electrones emitidos.





- Auger: analiza la energía de los electrones secundarios emitidos (electrones auger).
- XRF (X-ray Fluorescence): analiza las energías de los rayos X emitidos por la muestra.

Cuando una muestra es irradiada con una fuente de rayos-X intensa pueden generarse diferentes fenómenos como:

1. La radiación incidente es de elevada energía de manera que un electrón interno es ionizado, es decir, extraído del orbital del cual formaba parte. A partir de la energía cinética del electrón arrancado y de la energía de la radiación incidente se puede medir la energía de enlace que depende del átomo que se estudia.
2. Un electrón de un nivel superior es relajado para ocupar el nivel vacío. Como tiene demasiada energía para ocupar dicha posición emite el exceso en forma de energía de rayos-X.
3. Como consecuencia de los fotones procedentes de la relajación anterior pueden ionizarse otros electrones secundarios conocidos como Auger. La energía cinética de los electrones Auger no depende de la energía de radiación incidente a diferencia de los electrones primarios. Así pues, los electrones de capas superiores pueden relajarse ocupando los huecos vacíos dejados por los electrones Auger.

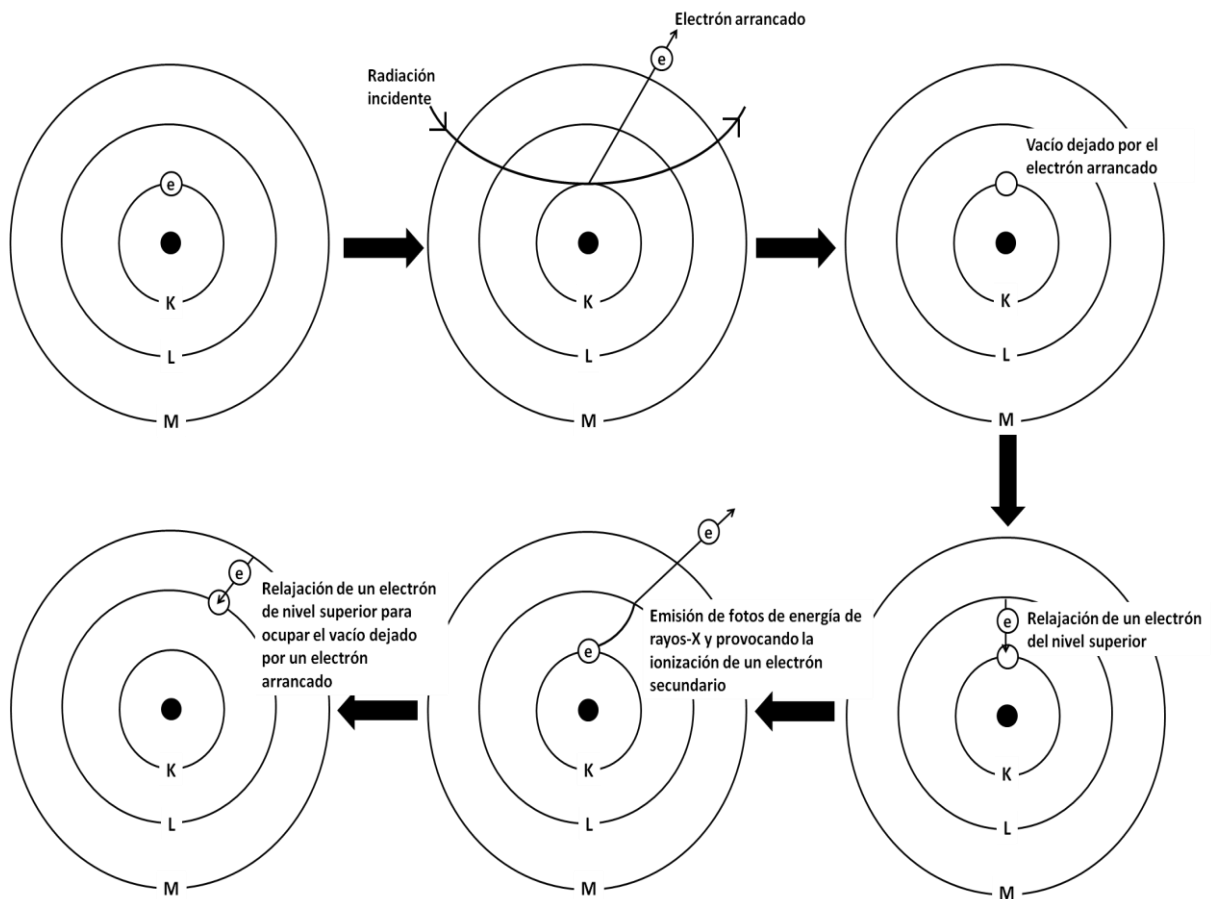


Figura 2.25. Fenómenos generados a partir de una radiación con rayos-X.



La técnica de XPS, también conocida como ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis), es una técnica de ionización en la que la muestra es irradiada con radiación electromagnética de suficiente frecuencia como para arrancar un electrón del átomo o molécula. La energía sobrante es convertida en energía cinética del electrón:

$$h\nu = EE + E_c$$

Se utiliza un haz monocromático de suficiente energía como para ionizar los electrones de interés y el espectrómetro mide la energía cinética de los electrones ionizados. A partir de  $\nu$  y de  $E_c$  se mide la energía  $EE$  que corresponde a la energía del orbital del cual se ha arrancado el electrón. En el caso del XPS es importante de arrancar los electrones internos teniendo que ser la energía de los fotones lo suficientemente elevada (entre 50 y 1200 eV) correspondiendo a los rayos-X.

Las capas internas de los átomos están poco afectadas por la formación de enlaces químicos por lo que sus señales apenas se modifican cuando éste se enlaza a otros átomos, habiendo tan solo variaciones de unos pocos eV debida a la carga del átomo. Por ello nos permite saber los átomos presentes a excepción del hidrógeno y del helio ya que no tienen niveles internos no siendo por lo tanto detectables.

Las aplicaciones más importantes se basan en el hecho de que la interacción de los electrones con la materia es muy fuerte y las energías de los electrones emitidos son relativamente bajas ( $\leq 1,5$  KeV) por lo que son detectados fácilmente.

Debido a que tan sólo son detectados los electrones emitidos o que han interactuado con la superficie es una técnica superficial que informa sobre tres o cuatro átomos de capas en la superficie. Así pues, una de las aplicaciones fundamentales es el estudio de las superficies permitiendo detectar los elementos presentes en la superficie, cuantificarlos y en casos particulares con estudios adecuados se puede obtener los estados de oxidación y entornos de coordinación de los elementos presentes en la superficie.

#### **2.6.3.7.- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA**

La colorimetría con BCA está basada en el ácido bicinónico (BCA) siendo un ensayo muy útil para la detección colorimétrica y la cuantificación total de proteínas. Inicialmente el BCA forma parte de un complejo con  $\text{Cu}^{2+}$  cuya coloración es verdosa de manera que al entrar en contacto con la proteína dicho ion es reducido a  $\text{Cu}^{1+}$  en un medio alcalino. Como consecuencia tiene lugar un cambio de coloración de la solución adquiriendo una tonalidad violeta. El producto resultante violeta está formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) proporcionando la máxima absorbancia a 562 nm. La cantidad de iones de cobre reducidos es proporcional a la cantidad de proteínas presentes ya que los causantes de la reducción de los iones cuprosos son los aminoácidos cisteína, cistina, triptófano y tirosina, los enlaces peptídicos y la estructura macromolecular de las proteínas. [32]

El ensayo de BCA es más sensible y aplicable que los ensayos de Biuret y de Lowry. Además posee una menor variabilidad que el ensayo de Bradford.



Como ventajas pueden comentarse:

- El color del complejo es estable.
- Hay menos susceptibilidad a los detergentes.
- Es aplicable en un rango ancho de concentraciones de proteínas.

La concentración de las proteínas de una solución se realiza utilizando como referencia una serie de diluciones estándares de una proteína común tal como el suero de bovino de albumina (BSA). Por ello son realizadas diferentes diluciones de concentración conocida de BSA obteniendo como resultados una curva estándar. Dicha curva será posteriormente utilizada para determinar la concentración de las diluciones de estudio. Dependiendo del tipo de proteína a analizar los patrones a utilizar pueden variar por ello es importante de mirar la literatura antes de llevar a cabo el ensayo. [32]

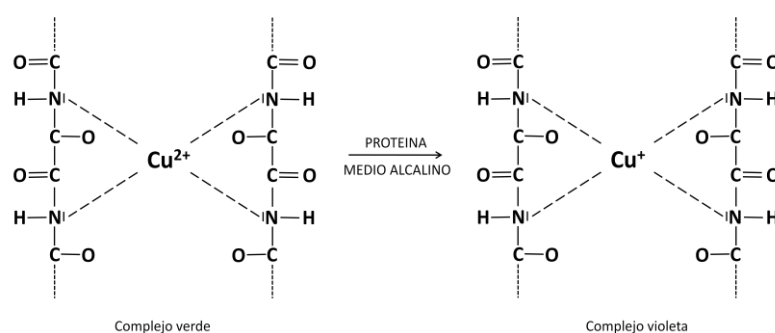


Figura 2.26. Complejo BCA-ion cuproso antes y después de reducirse en presencia de proteínas y de un medio alcalino.

## 2.7.- FUNDAMENTOS SOBRE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muchas veces antes de poder analizar los resultados obtenidos es necesario tratarlos adecuadamente. Por ello a continuación son comentados de una manera breve algunas de las acciones llevadas a cabo con éstos.

### 2.7.1.- CÁLCULO DE LOS RATIOS

En la técnica de ToF-SIMS los resultados obtenidos vienen dados en forma de tablas (picos de intensidad vs. Masa). Para poder realizar una comparación entre diferentes muestras es más conveniente comparar los ratios de éstas. Para el cálculo del ratio existe la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = \frac{\text{intensidad de el pico de estudio}}{\text{intensidad de el pico de referencia}} \quad 2.13$$

El pico de estudio hace referencia al pico de importancia. El pico de referencia corresponde al pico presente en todas las muestras independientemente del tratamiento previo al que hayan sido sometidas.



## 2.7.2.- ANOVA DE UNA SOLA DIRECCIÓN

El análisis de varianza, o también conocido como Anova, es una técnica fundamental que realiza un contraste de hipótesis estadísticas. En el estudio estadístico realizado se ha utilizado la anova cuyo modelo corresponde a un factor de efectos fijos o como suele conocerse anova de una sola dirección. Un tratamiento o factor es una propiedad o característica que permite distinguir las diferentes poblaciones de manera que las hipótesis a contrastar consideran K situaciones experimentales analizadas sobre una variable respuesta Y.

- $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ .
- $H_1$  : al menos dos difieren.

donde  $\mu_i$ ,  $i = 1, 2, \dots, k$  representan valores medios de las variable respuesta, en las k situaciones experimentales, respectivamente.

Para rechazar la hipótesis nula la técnica recurre a dos estimadores independientes de la varianza como son los cuadrados medios de los tratamientos y cuadrados medios del error que son comparados probabilísticamente con la ayuda de la distribución de F de Fisher. La distribución F tiene las siguientes propiedades importantes:

- La distribución F no es simétrica, está desplazada hacia la derecha.
- Los valores de F pueden ser nulos o positivos, no negativos.
- Hay una distribución F diferente para cada par de grados de libertad para el numerador y el denominador.

Como requerimiento para poder aplicar la anova es necesario que:

- Las poblaciones son distribuciones que son aproximadamente normales.
- Las poblaciones tienen la misma varianza  $\sigma^2$  (o desviación estándar  $\sigma$ ).
- Las muestras son muestras aleatorias simples, es decir, las muestras del mismo tamaño tienen la misma probabilidad de ser seleccionadas.
- Las muestras son independientes unas de las otras.
- Las muestras son de poblaciones que están categorizadas en una sola dirección.

A la hora de rechazar o no la hipótesis nula debe de fijarse en el valor p (valor de probabilidad) ya que dependiendo de éste será o no rechazada:

- Si el valor  $p \leq \alpha$ , se rechaza la hipótesis nula de medias iguales.
- Si el valor  $p > \alpha$ , no se rechaza la hipótesis nula de medias iguales.

Todos los estudios estadísticos realizados a lo largo del proyecto se ha considerado un intervalo de confianza del 95%, siendo por lo tanto el valor de la  $\alpha$  de 0,05.



# CAPÍTULO 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo son descritos los materiales y métodos utilizados durante el proyecto detallando los parámetros establecidos en los diferentes equipos.

Las casas comerciales de los equipos utilizados son detalladas a medida que aparecen a lo largo del proyecto. En cambio, al utilizar los reactivos en varios ensayos por comodidad se ha realizado una tabla a donde son nombrados junto con sus casas comerciales.

Reactivo	Casa comercial
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich
Peróxido de Hidrógeno	Panreac
GPTES	Sigma-Aldrich
CPTES	Sigma-Aldrich
DIEA	Sigma-Aldrich
Pentano	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Acetona	Panreac
5(6)-Carboxyfluorescein-GGGK	Sintetizado por Pablo Sevilla, doctorando del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Politécnica de Cataluña
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
PBS	Gibco
2,2,2-trifluoroetilamina	Sigma-Aldrich
PDMS y Crosslinker	Aportado por la Plataforma de Nanotecnología del Parc Científic de Barcelona
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Péptido KGRGDS	New England Peptide
Péptido KGGGRGDS	New England Peptide
Péptido KGRDGS	New England Peptide
MG63	American Type collection
FBS	Invitrogen
Glicina	Fluka

Tabla 3.1.- Casas comerciales de los reactivos utilizados A.



Reactivo	Casa comercial
BSA	Sigma-Aldrich
DMEM	Sigma-Aldrich
Piruvato de sodio	Sigma-Aldrich
L-glutamina	Invitrogen
Penicilina	Invitrogen
Fibronectina	Invitrogen
Tripsina	Sigma-Aldrich
Paraformaldehído	Panreac
Sacarosa	Sigma-Aldrich
Azida de sodio	Sigma-Aldrich
Tritón	Sigma-Aldrich
Anti-FN antibody produced in rabbit (F3648)	Invitrogen
Hoetscht	Invitrogen
Rhodamine phalloidin R415	Invitrogen
Alexa Fluor 488	Invitrogen
Mowiol	Invitrogen

Tabla 3.2.- Casas comerciales de los reactivos utilizados B.

En todos los ensayos antes de tratar las muestras de estudio se ha realizado su limpieza con esmero siguiendo en todos los casos el siguiente procedimiento:

- Sumergir el titanio en ciclohexano y poner en el ultrasonidos durante cinco minutos.
- Sumergir el titanio en isopropanol y poner en el ultrasonidos durante cinco minutos.
- Limpiar tres veces con agua destilada, acetona y secar con N<sub>2</sub>.

### 3.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ENSAYO

#### 3.1.1.-INTRODUCCIÓN

El titanio c.p de grado 2 se recepciónó como una barra de metro y medio de longitud y 10 mm de diámetro. Después de diferentes procesos se ha llegado a discos de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor pulidos a espejo en una de sus caras.

#### 3.1.2.-CORTE DEL CILINDRO A SEGMENTOS

El equipo utilizado para cortar el cilindro de titanio c.p. de grado dos a segmentos más pequeños es una cortadora de disco refrigerada de marca Leco y modelo CM-12. El disco corresponde a un disco abrasivo de carburo de silicio de 23 cm de diámetro y gira a unas 314,15 rad/s. La fuerza de corte es manual.

Una vez cortado se ha eliminado la rebaba mediante una esmeriladora de marca Formis, modelo 1 CV de pie.



Posee una velocidad de giro de 293,21 rad/s y el disco es de 18 cm de diámetro.

### 3.1.3.- CORTE DE LOS SEGMENTOS A DISCOS DE 2 mm DE ESPESOR

La cortadora que se ha encargado de pasar los segmentos a discos de 2 mm de espesor es de la marca Struers modelo Accutom-50. Las variables fijadas en el programa creado han sido para la velocidad de avance del disco de 0,110 m/s, velocidad de giro del disco de 471,23 rad/s y refrigeración con agua. El disco utilizado para realizar el corte corresponde a un disco de polvo de diamante con diámetro de 125 mm y espesor de 0,4 mm.

### 3.1.4.- PULIDO MANUAL Y AUTOMÁTICO

Dos pulidoras han sido utilizadas, una manual y otra automática.

	Pulidora manual	Pulidora automática
<b>Marca</b>	Struers	Buehler
<b>Modelo</b>	LaboPol-5	- Parte superior: Automet 2 - Parte inferior: Ecomet 4
<b>Velocidad de giro</b>	Variable, comprendida la de trabajo en el intervalo de 20 a 30 rad/s.	Variable, comprendida la de trabajo en el intervalo de 4 a 15 rad/s.
<b>Fuerza</b>	Manual	Variable, comprendida la de trabajo en el intervalo de 31 a 360 N
<b>Diámetro de discos</b>	200 mm	305 mm

Tabla 3.3.- Especificaciones técnicas de la pulidora automática y manual.

Inicialmente los paños utilizados son de carburo de silicio de la marca Buehler. Dependiendo del nivel de pulido se ha ido variando éstos según el tamaño de las partículas de carburo de silicio siendo los utilizados el del número P240 (58,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula), P400 (35  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula), P600 (25,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula), P1200 (15,3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) y P4000 (5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula).

Finalmente se ha optado por un paño de terciopelo para obtener el efecto de espejo en una de sus caras. Junto con él como abrasivo se ha utilizado sílica coloidal mastermet de la marca Buehler. Ésta consiste en partículas de sílice en una solución acuosa a un pH 10. Para obtener dicho pH contiene un 10% de una solución de NaOH con un tamaño de partícula de sílica de 0,06  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.5.- PROCESO EXPERIMENTAL DE LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Inicialmente se parte de un cilindro de un metro y medio de longitud y unos 10 mm de diámetro. Por ello ha sido necesario trabajar sobre él disminuyendo sus dimensiones. Las etapas que se han seguido son:

1. Corte del cilindro de metro y medio de longitud a segmentos de 7 cm aproximadamente mediante la cortadora de disco Leco CM-12. La rebaba que ha quedado en la pieza una vez ha sido cortada se ha eliminado con la esmeriladora Formis.



2. Corte de los segmentos de 7 cm de longitud a discos de 2 mm de espesor a partir de la cortadora de precisión Struers Accutom-50. En este caso se ha creado un programa para ajustar el corte a la obtención de discos de 2 mm de espesor. A pesar de que anteriormente se ha realizado un corte abrasivo del titanio es muy poco probable de que haya habido un cambio de fase en su estructura por su elevada pureza. De todas maneras la primera probeta procedente del primer corte del segmento de titanio se ha reciclado no utilizándolo como probeta de estudio.
3. Pulido de una de las caras de los discos hasta obtener un efecto espejo en ella. Los paños de pulido utilizados han sido de carburo de silicio de número P240, P400, P600, P1200 y P4000. Inicialmente ha sido utilizado el paño con menor número y a medida que todas las probetas presentaban un único plano se ha cambiando. Se ha intentado actuar con rapidez y para ello el pulido de las piezas ha sido en grupo. En el caso del pulido automático se ha llegado a pulir unas 80 piezas a la vez. Para ello se han enganchado con adhesivo de cianoacrilato en una superficie metálica adecuada para ser utilizada con la pulidora automática. En el caso del pulido manual se han pulido a la vez un máximo de probetas las cuales han sido unidas a baquelita mediante adhesivo de cianoacrilato.
4. Una vez acabado con el paño P4000 para poder conseguir el efecto espejo sobre la cara se ha utilizado un paño de terciopelo y como abrasivo la sílica. Es importante controlar el proceso ya que la sílica tiende a precipitar pudiendo arañar las probetas. Por ello debe estar humedeciendo el paño en intervalos cortos o verter sílica.
5. Una vez se ha finalizado el pulido de las muestras se ha realizado su limpieza. Para ello, tanto en el pulido manual como en el automático primero se ha llevado a cabo una limpieza mecánica. Con un paño de terciopelo totalmente limpio se hacen varias pasadas durante unos minutos utilizando únicamente agua.
6. Pasado el tiempo son despegadas del soporte. En el caso de las muestras automáticas, al ser el soporte metálico se baña en acetona unos 15 minutos y posteriormente con ayuda de un martillo y de una espátula se extraen los discos de titanio. Para las muestras pulidas manualmente al estar enganchadas en baquelita dejándolas en acetona y en el ultrasonidos es suficiente para despegarlas completamente.
7. Una vez las muestras han sido despegadas se limpian los restos del adhesivo de cianoacrilato de forma manual y seguidamente se dejan durante 15 minutos en una solución de NaOH de concentración 0.5mg/ml y acetona 75-25%. Pasado el tiempo se limpian las muestras con agua tres veces y se dejan durante 15 minutos más en acetona al ultrasonidos. Seguidamente se limpian durante 15 minutos en agua y al ultrasonidos.



Figura 3.1.- Muestra de titanio pulida hasta efecto espejo.





## 3.2.- INTERFEROMETRÍA DE LAS MUESTRAS PULIDAS MANUALMENTE Y AUTOMÁTICAMENTE

El microscopio utilizado ha sido un WYKO NT1100 (Veeco) y el software corresponde al Vision 32 V2.303 De Veeco Instruments, Inc (2001).

El interferómetro presenta dos técnicas de medición, PSI (Phase Shifting Interferometry) utilizado para muestras muy lisas y VSI (Vertical Scanning Interferometry) para muestras más rugosas que es el caso de estudio.

Han sido medidas un total de 4 muestras de titanio comercialmente puro de grado 2, dos de ellas pulidas manualmente (B y C) y otras dos pulidas automáticamente (A y D). De esta manera será posible saber el efecto existente en la rugosidad superficial por lo que hace referencia al método de pulido.

Como cualquier técnica de medición siempre aparece ruido de fondo que debe de ser eliminado. Además en este caso debe de considerarse otros aspectos como es la inclinación de la muestra o señales de interferencia que quedan en la imagen obtenida. Por ello, con ayuda del software 32 V2.303 se llega a filtrar la imagen obtenida para eliminar así la ondulación y el error de forma.

En la Tabla 3.4 quedan detalladas las variables y los filtros de la medición.

	<b>Muestras pulidas manualmente.</b>	<b>Muestras pulidas automáticamente.</b>
<b>Área de estudio</b>	124.4x94.6 $\mu\text{m}$	124.4x94.6 $\mu\text{m}$
<b>Número de probetas de estudio</b>	2	2
<b>Número de ensayos por probeta</b>	3	3
<b>Backscan</b>	5 $\mu\text{m}$	5 $\mu\text{m}$
<b>Longitud de escaneado</b>	12 $\mu\text{m}$	12 $\mu\text{m}$
<b>Aumentos</b>	X50	X50
<b>Compensación de forma</b>	Curvatura e inclinación	Curvatura e inclinación
<b>Filtros Fourier tipo notch</b>	Low cut off = 5 High cut off = 50	Low cut off = 15 High cut off = 60
<b>Data restore (considera los píxeles no leídos).</b>	Activado	Activado

Tabla 3.4. Condiciones de ensayo de la Interferometría



## 3.3.- SILANIZACIÓN

### 3.3.1.- INTRODUCCIÓN

Para aumentar el carácter bioactivo del titanio con el tejido circundante varios autores han considerado la variación de su composición superficial mediante diferentes procesos entre los que se encuentran la fijación de moléculas sobre su superficie, aportando así un aumento en la capacidad de interaccionar mediante enlaces covalentes con las células del sistema fisiológico.

### 3.3.2.- PLASMA CLEANING

El plasma cleaning utilizado corresponde a un plasma cleaning-sterilizer de la marca Harrick Cientific Corporation modelo PDC-002.

La operación del plasma cleaning es sencilla. La muestra es situada en la cámara donde tiene lugar el proceso. El gas de procesado a pequeñas velocidades de flujo del gas (normalmente de 5 a 0,264 Nm<sup>3</sup>/h)[19] y a baja presión (de 0,000263 a 0,000789 atm)[19] es expuesto a pequeñas radiofrecuencias electromagnéticas de radiación que oscilan entre 8 y 12 MHz de manera que el plasma es creado a una temperatura cercana en la cámara.

Así pues el proceso a seguir es el siguiente:

- Colocar las muestras sobre un porta-objetos e introducirlas en el equipo.
- Cerrar la puerta y asegurarse que la llave de ésta está cerrada.
- Hacer el vacío durante 5 minutos.
- Abrir el paso de oxígeno dejando que éste entre en la cámara al mismo tiempo que sale el aire por la llave que hay en la puerta de la cámara. Dejar esta situación durante 2 minutos.
- Cerrar la salida del aire al exterior y la llave de oxígeno. Hacer el plasma.
- Dejar actuar el plasma sobre las muestras durante cinco minutos.

Una vez se ha realizado el plasma sobre la pieza es importante aislar las probetas de titanio c.p totalmente del medio. Para ello se introducen las muestras en un erlenmeyer. Una vez tapado con ayuda de una aguja se introduce nitrógeno mientras que con otra aguja se expulsa el aire.



Figura 3.2.- Muestra de titanio sometida al proceso de plasma cleaning.



### 3.3.3.- REACCIÓN DE PIRAÑA

El ácido sulfúrico utilizado presentaba una pureza del 30% al igual que el peróxido de hidrógeno.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- Mezclado 10 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de peróxido de hidrógeno. A simple vista no sucede nada, la solución continua siendo incolora.
- Seguidamente se introduce la probeta de titanio y a los pocos segundos ya es apreciable la adquisición por parte de la solución de una coloración anaranjada la cual es debida a la disolución del óxido de titanio superficial. Además pueden observarse un burbujeo causado por el oxígeno procedente de la descomposición del peróxido y posiblemente del dióxido de carbono generado por la eliminación de las impurezas inorgánicas existentes. Si se toca el vaso de precipitados puede notarse un aumento de la temperatura del medio debido a la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno la cual es altamente exotérmica.
- Tapar con un vidrio de reloj o con un cristizador pequeño el vaso de precipitados que contiene el proceso de piraña junto con el disco de titanio y dejar actuar durante una hora.
- Pasado este tiempo se extrae la probeta con cuidado y se limpia tres veces con agua destilada, tres veces con acetona y finalmente se seca con nitrógeno.



Figura 3.3.- Muestra de titanio sometida a la reacción de piraña.

### 3.3.4.- PROCESO DE SILANIZACIÓN

Para realizar la silanización debe de emplearse un silano, una base y un disolvente.

La elección del silano es estudiado en el apartado 0. Junto a éste se utiliza como disolvente el pentano y como base la DIEA (N,N-Diisopropylethylamina) la cual presenta la siguiente estructura.

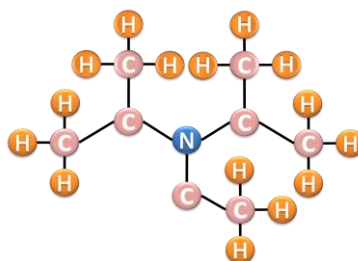


Figura 3.4.- DIEA.



La elección de un disolvente apolar es debido a que la ausencia de agua sobre la superficie es un factor muy importante a tener en cuenta. Además los recipientes a utilizar deben de estar completamente secos y si es posible, su exposición sobre el ambiente debe de ser también mínima.

Una vez ha sido preparada la solución con las cantidades correspondientes y se ha puesto en contacto con el titanio a tratar el silano será anclado mediante los grupos -OH que habían sido introducidos en el titanio anteriormente mediante el proceso del plasma o de piraña.

Tanto si la procedencia de las piezas es el plasma cleaning como la reacción de piraña deben ponerse éstas en un erlenmeyer tapado e introducir nitrógeno para evitar así la contaminación de la reacción y la eliminación de los grupos hidroxilos sobre la superficie del titanio debido al contacto con el aire. Así pues, con ayuda de dos agujas se introduce por una de ellas nitrógeno y por la otra saldrá el aire a eliminar.

Seguidamente se miden las cantidades apropiadas de silano, pentano y DIEA y se añaden al erlenmeyer. Posteriormente se pondrá en el baño a ultrasonidos de manera que durante toda una hora que es el tiempo requerido para la reacción, cada diez minutos se pondrá en marcha el equipo durante un minuto.

Una vez transcurrido todo ese tiempo se extraen las piezas y se limpian tres veces con etanol, tres veces con isopropanol, tres veces con agua destilada y finalmente tres veces con acetona. Para acabar se secan con nitrógeno.

#### .- ELECCIÓN DEL SILANO

En el mercado actual pueden encontrarse un amplio abanico de silanos diferentes los cuales pueden dividirse de una manera sencilla según el grupo orgánico que poseen.

GRUPO ORGÁNICO	NOMBRE QUÍMICO	FÓRMULA QUÍMICA
<b>Vinylsilane</b>	Vinyltrichlorosilane	$\text{CH}_2=\text{CHSiCl}_3$
	Vinyltriethoxysilane	$\text{CH}_2=\text{CHSi}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
<b>Acryloxy</b>	3-metacryloxypropyltrimethoxysilane	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}-\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6\text{Si}(\text{OCH}_3)_3 \\    \\ \text{O} \end{array}$
<b>Epoxy silane</b>	$\gamma$ -glycidloxypropylmethyldiethoxysilane	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
<b>Aminosilane</b>	3-aminopropyltriethoxysilane	$\text{NH}_2\text{C}_3\text{H}_6\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
<b>Otros</b>	$\gamma$ -chloropropyltrimethoxysilane	$\text{ClC}_3\text{H}_6\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$

Tabla 3.5. Clasificación de los diferentes silanos junto algunos ejemplos.



Teniendo presente que el silano a utilizar debe de unirse a un péptido dándose la unión por la amina terminal varios de ellos fueron descartados rápidamente. Otros por lo contrario tuvieron que ser estudiados con más detalles.

- APTES (3-aminopropyltriethoxysilane): la unión al péptido tendría lugar por una amina siendo por lo tanto necesario un intermedio que fuera capaz de unir dos aminas. Es un proceso que requiere tiempo y es caro.
- Silano con un carboxílico terminal: Inicialmente es interesante dicho silano ya que al enlazarse con el péptido se formaría un enlace péptido el cual es muy estable. Como impedimentos existentes está el disolvente. Muchos de ellos utilizan DMF siendo el péptido diseñado insoluble. Por otro lado son necesarios otros activadores como es el caso del HBTU por lo que el proceso se complica.
- GPTES ((3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane): al poseer un epoxy como grupo funcional la reactividad de éste con la amina terminal del péptido es elevada. Es necesario un pH de 7.
- CPTES ((3-Chloropropyl)triethoxysilane): la presencia del grupo terminal cloro facilita la interacción del silano con el péptido a un pH de 11. Además es fácilmente detectable y diferenciable mediante las técnicas de Tof-SIMS y XPS gracias a su grupo terminal cloro.

Finalmente se decantó por la utilización de dos silanos diferentes, cuya química podría pensar que el enlace estable y/o covalente con el péptido podría tener lugar. Estos dos silanos corresponden al CPTES y al GPTES cuya pureza es igual o superior al 99% de la casa comercial Sigma-Aldrich.

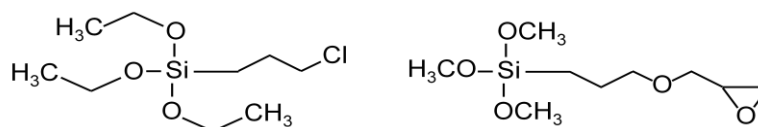


Figura 3.5.- CPTES y GPTES.

### 3.3.5.- FLUORESCENCIA

El péptido a utilizar en este caso presenta la particularidad de poseer en uno de sus extremos un fluoróforo el cual le aporta la capacidad de poder ser observado bajo fluorescencia.

El péptido exactamente corresponde al 5(6)-Carboxyfluorescein-GGGK.

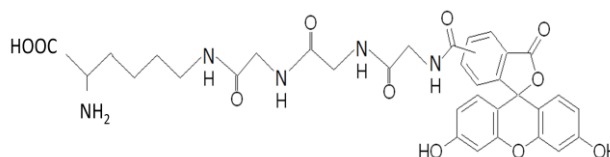


Figura 3.6.- 5(6)-Carboxyfluorescein-GGGK.



El procedimiento a seguir ha sido:

- Titanio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido en la solución de péptido durante toda una noche y a temperatura ambiente. El péptido se ha disuelto con carbonato de sodio 0,5 mg/ml. (muestra de estudio)
- Titanio sometido a plasma cleaning y silanizado con GPTES. Posteriormente ha sido sumergido en la solución de péptido durante toda una noche y a temperatura ambiente. El péptido ha sido diluido con PBS 1X. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sumergido durante 14 horas en la solución del péptido-carbonato de sodio y a temperatura ambiente. (muestra de control)
- Titanio limpio sumergido durante 14 horas en la solución del péptido-PBS y a temperatura ambiente. (muestra de control)

Se han realizado dos réplicas por cada uno de los tratamientos requeridos.

La solución de péptido fluorescente ha sido preparada de la siguiente manera:

- Han sido pesados 12,4 mg de péptido C<sub>F</sub>GGGK y se han disuelto en 1 ml de agua.
- Se han realizado alícuotas dando una solución final de concentración de 500 µg/ml.
- En el caso del CPTES se ha disuelto el péptido con carbonato de sodio ya que el pH del medio debe de ser de 11 aproximadamente para que se pueda dar la unión silano-péptido. En el caso del GPTES el pH del medio requerido es de 7 por lo que el disolvente utilizado ha sido PBS.

Para preparar la solución de PBS se ha disuelto una pastilla de PBS de en 500 ml de agua Mili-Q.

Finalmente se mirarán las probetas con el microscopio de fluorescencia Nikon E600 el cual tiene acoplada la cámara Olympus DP72.

### 3.3.6.- ToF-SIMS

La 2,2,2-trifluoroetilamina es un reactivo el cual se enlaza con el silano de la misma manera que lo hace un péptido (por el grupo amina). Además posee la particularidad de presentar flúor en su estructura siendo fácilmente detectable por la técnica de ToF-SIMS. Aprovechando ambas circunstancias a partir de dicho estudio puede obtenerse una idea de con qué silano el péptido puede llegarse a enlazar de mejor manera.

El equipo utilizado corresponde al modelo ToF-SIMS IV, Ion Tof. El procedimiento ha sido realizado por el equipo de la Plataforma de Nanotecnología del Parc Científic de Barcelona.



Las muestras a estudiar han sido tratadas de la siguiente manera:

- Titanio sometido al plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante 14 horas a temperatura ambiente a una solución de 2,2,2-trifluoroetilamina de concentración 500 µg/ml. El disolvente utilizado para preparar la disolución ha sido carbonato de sodio 0,5mg/ml. (muestra de estudio)
- Titanio sometido al plasma cleaning y silanizado con GPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante 14 horas a temperatura ambiente a una solución de 2,2,2-trifluoroetilamina de concentración 500 µg/ml. El disolvente utilizado para preparar la disolución ha sido PBS 1X. (muestra de estudio)
- Titanio limpio. (muestra de control)
- Titanio sumergido durante 14 horas a temperatura ambiente a una solución de 2,2,2-trifluoroetilamina de concentración 500 µg/ml. El disolvente utilizado para preparar la disolución ha sido carbonato de sodio 0,5mg/ml. (muestra de control)
- Titanio sumergido durante 14 horas a temperatura ambiente a una solución de 2,2,2-trifluoroetilamina de concentración 500 µg/ml. El disolvente utilizado para preparar la disolución ha sido PBS 1X. (muestra de control)

Pasadas las 14 horas se han limpiado las muestras tres veces con carbonato de sodio 0,5 mg/ml y secado con N<sub>2</sub> con mucha precaución para no dañar la superficie.

## 3.4.- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN

En este apartado se han estudiado diferentes métodos de silanización para poder establecer aquél de ellos que más se ajuste al proyecto. Para ello todos ellos han sido estudiados a partir de diferentes métodos de caracterización.

### 3.4.1.- ÁNGULO DE CONTACTO

El equipo a utilizar para medir el ángulo de contacto es el OCA 15 plus Video-Based Optical Contact Angle Meter y el software el SCA 20 fabricado por Dataphysics Instruments GMBH.

Han sido realizados diferentes tipos de tratamientos a las muestras para poder determinar así las diferencias existentes ayudando por lo tanto a poder eliminar uno de los pasos del proceso. Las muestras a tratar han sido las siguientes:

- Titanio limpio.
- Titanio sometido al plasma cleaning.
- Titanio sometido a la reacción de piraña.
- Titanio sometido al plasma cleaning. A continuación se le ha realizado la reacción de piraña.



- Titanio sometido a la reacción de piraña. Finalmente se le ha aplicado el plasma cleaning.
- Titanio sometido al plasma cleaning. A continuación se le ha realizado la reacción de piraña y finalmente ha llevado a cabo su silanización.
- Titanio sometido a la reacción de piraña, después al plasma cleaning y finalmente se le ha realizado la silanización.
- Titanio sometido a la reacción de piraña y finalmente se le ha realizado la silanización.
- Titanio sometido al plasma cleaning y finalmente se le ha realizado la silanización.

En cada uno de los casos anteriores se ha aislado la muestra de la atmosfera introduciéndola en un erlenmeyer e introduciendo nitrógeno para evitar su contaminación.

Se han realizado 5 réplicas de cada una de los puntos anteriores obteniendo un total de 3 ángulos de contacto por disco de titanio.

La tensión superficial ha sido calculada automáticamente mediante el software SCA 20 fabricado por Dataphysics Instruments GMBH.

Para poder determinar si los valores obtenidos en cada una de las muestras estudiadas presentan diferencias significativas entre ellas se ha realizado un estudio estadístico con el software Minitab. Exactamente se ha realizado un estudio de Anova de una dirección.

### **3.4.2.- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA**

Para poder determinar la rugosidad de la superficie del titanio una vez ha sido sometida a la reacción de piraña ha sido utilizado el interferómetro WYKO NT1100 (Veeco) y el software Vision 32 V2.303 De Veeco Instruments, Inc (2001). La técnica de medición utilizada ha correspondido al VSI (Vertical Scanning Interferometry).

Han sido estudiadas tres muestras de titanio comercialmente puro de grado dos, sometido a la reacción de piraña.

Para eliminar el ruido de fondo al igual que corregir la inclinación de la muestra ha sido utilizado el mismo software del equipo (Vision 32 V2.303 De Veeco Instruments) obteniendo por lo tanto una imagen más limpia.





En la tabla 3.6 quedan detalladas las variables y los filtros de la medición.

Área de estudio	124.4x94.6 $\mu\text{m}$
Número de probetas de estudio	3
Número de ensayos por probeta	3
Backscan	5 $\mu\text{m}$
Longitud de escaneado	12 $\mu\text{m}$
Aumentos	X50
Compensación de forma	Curvatura e inclinación
Filtros Fourier tipo notch	Low cut off = 5 High cut off = 50
Data restore (considera los píxeles no leídos)	Activado

Tabla 3.6.- Condiciones de ensayo de la Interferometría

### 3.4.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO

Para saber cómo influye la rugosidad sobre el comportamiento del ángulo de contacto se ha realizado un pequeño estudio el cual verifique lo dicho por diferentes autores. Por ello se ha dispuesto de una muestra de titanio sin atacar y otra atacada con piraña. De cada una de ellas se han realizado dos réplicas, una con PDMS y otra con oro. Para preparar las réplicas de PDMS se ha realizado el siguiente proceso:

- Se ha pesado un gramo de PDMS y 0,1 gramo de Crosslinker en un mismo vaso de precipitados (la relación debe de ser 1/10). El PDMS al ser muy viscoso debe de manejarse con cuidado, usando una espátula y verterlo en el vaso de plástico.
- Se han mezclado bien los dos compuestos y una vez mezclados ha podido ser observado burbujas en la mezcla. Por ello, para eliminarlas se ha dejado 10 minutos en el desecador cuyo desecante no corresponde a un silano ya que de no ser así la probabilidad de impurificarlo sería elevada.
- Una vez pasados los 30 minutos deberían de haber desaparecido todas las burbujas. Como no ha sido el caso, se ha vuelto a dejar en el desecador y jugando con el vacío se han intentado eliminar. Otra opción es intentar eliminarlas con ayuda de un cuenta gotas de manera que se aporta aire sobre la zona de las burbujas de vez en cuando hasta hacerlas desaparecer.
- Seguidamente en una cápsula de petri se han puesto las dos muestras con la superficie de interés mirando hacia arriba (lo que vendría a ser lo lógico).
- Se vierte sobre ellas la mezcla de polímeros de manera que las recubra y que ocupe toda la superficie de la cápsula. Se deja curar durante 24 horas a temperatura ambiente y sobre una superficie plana.
- Pasado ese tiempo se deja 30 minutos en el horno a 368 K.
- Después de los 30 minutos se desmolda. Para ello debe de seguirse el siguiente proceso:
  - Con el bisturí se recorre todo el perímetro de la cápsula de manera que la unión polímero-cápsula es eliminada.



- Se le da la vuelta a la cápsula y en su parte inferior se realiza presión en diferentes zonas viendo como el PDMS va bajando.
- Una vez está totalmente despegado de la cápsula se cortan cuadrados para poder manipularlo más fácilmente.
- Con la ayuda de la espátula se extraen de la cápsula y sobre la mesa con papel o sobre una superficie limpia se ponen. Es importante extraer la parte de película de PDMS existente en la parte inferior de la muestra por si se quisieran realizar futuras réplicas.
- Se procede a cortar el perfil de la muestra eliminando el PDMS no útil.
- Una vez ha sido eliminado el exceso de PDMS, la muestra es despegada poco a poco de éste ayudándose con la espátula. Para ello es aconsejable empezar por los extremos y finalmente ir al centro.

El recubrimiento de oro ha sido realizado por la Plataforma de Nanotecnología del PCB mediante la técnica de evaporación térmica por calentamiento mediante haz de electrones correspondiendo el equipo al modelo Univex 450 de la marca Leybold. Los discos a estudiar en este caso han correspondido a un disco de titanio pulido, otro sometido a la reacción de piraña, un disco granallado con alúmina y finalmente un disco granallado mediante partículas de sílica. Los discos granallados han sido proporcionados por el departamento de Biomateriales de la UPC.

#### **3.4.4.- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN**

El equipo utilizado corresponde al modelo ToF-SIMS IV, Ion Tof. El procedimiento ha sido realizado por el equipo de la Plataforma de nanotecnología del Parc Científic de Barcelona. Las muestras a estudiar han sido tratadas de la siguiente manera:

- Titanio limpio sometido al plasma cleaning y silanizado.
- Titanio limpio sometido a la reacción de piraña y silanizado.

#### **3.4.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SILANIZACIÓN POR XPS**

Es importante estudiar la estabilidad del CPTES sobre el titanio ya que sobre él se seguirá trabajando. Por ello se ha decidido utilizar una técnica muy sensible como es el XPS.

Para el estudio ha sido necesario tratar las probetas de diferente manera:

- Titanio limpio. (muestra de control)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado. (muestra de control)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado. Posteriormente se ha dejado durante 12 horas sumergido en carbonato de sodio de concentración de 0,5 mg/ml. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado. Posteriormente se ha dejado durante 24 horas



sumergido en carbonato de sodio de concentración de 0,5 mg/ml. (muestra de estudio)

Una vez las muestras han sido preparadas han sido enviadas al Instituto de Nanociencia de Aragón, en concreto al laboratorio de caracterización de nanoestructuras para poder ser estudiados por XPS.

### **3.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING**

Como ha sido ya comentado en el capítulo 2 el plasma cleaning no sólo limpia la superficie del titanio sino que también es el encargado de su activación. El proceso de activación adquiere mayor importancia que el de limpieza ya que por un lado se ha seguido un protocolo de limpieza muy exhaustivo previamente, y por el otro, es la única manera de poder bioactivar el titanio. Por ello se ha realizado un pequeño estudio de la estabilidad de los grupos -OH insertados en la superficie del titanio mediante esta técnica.

Para ello se han preparado tres muestras de titanio limpias y han sido sometidas a plasma cleaning. A continuación a diferentes tiempos se les ha medido el ángulo de contacto realizando su secado con nitrógeno entre medidas.

### **3.6.- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA**

Considerando la estructura química de los péptidos que van a ser utilizados, puede suponerse su solubilidad con agua. Esto es así gracias a la presencia de cargas a lo largo de su estructura facilitando su dilución en medios polares como es el caso de la solución carbonato de sodio 0,5mg/ml. Sin embargo, al estar trabajando con cantidades ínfimas (microgramos) de péptido puede llegarse a la errónea idea de que el péptido esté disuelto en agua, estando realmente disperso. Para salir de toda duda se optó por realizar el ensayo de colorimetría con BCA el cual deja de manifiesto visualmente o mediante una lectura de absorbancia si el péptido ha sido disuelto o disperso en la solución.

Los reactivos necesarios se encuentran en el "BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit", es decir, un kit cuyos componentes son los siguientes:

- Reactivo A: 1000 ml o 500 ml (dependiendo del número de serie del kit) de una mezcla de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato en 0.1M de hidróxido de sodio.
- Reactivo B: 25 ml de sulfato de cobre al 4%.
- Patrones de albúmina de 2mg/ml: contiene 10 ampollas de 1 ml cada una de Duero bovino de albúmina (BSA) a 2mg/ml en un 0.9% de salino y un 0.05% de azida de sodio.



El procedimiento seguido ha sido el siguiente:

- Han sido pesados 1800  $\mu\text{g}$  de KGRDGS y se han disuelto en 1 ml de una solución de carbonato de sodio de concentración 0,5 mg/ml.
- De dicha solución se han extraído diferentes alícuotas para obtener concentraciones de péptido menores. Teniendo presente que se querían realizar tres réplicas por cada concentración a estudiar y que en cada pocillo había que añadir 25  $\mu\text{l}$  de péptido, los volúmenes extraídos junto con las concentraciones de estudio son las siguientes:

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volumen de KGRDGS ( $\mu\text{l}$ )	Volumen de carbonato de sodio ( $\mu\text{l}$ )
1800	75	0
900	37,5	37,5
600	25	50
456	19	56
300	12,5	62,5
144	6	69
72	3	72
24	1	74
0	0	75

Tabla 3.7. Concentraciones de estudio ( $\mu\text{g/ml}$ ) y volúmenes extraídos ( $\mu\text{l}$ ).

- Para preparar el BCA se ha tenido que preparar una solución la cual satisfaga la relación 50:1 de la mezcla A y B. Según el protocolo por cada pocillo debe de añadirse 200  $\mu\text{l}$  de la nueva solución por lo que manteniendo la relación 50:1 el volumen de mezcla A a añadir corresponde a 200  $\mu\text{l}$  y el de la mezcla B es de 4  $\mu\text{l}$ . Como la cantidad de pocillos a rellenar es de 27, el volumen de mezcla A es de 5400  $\mu\text{l}$  y el de la mezcla B es de 108  $\mu\text{l}$ .
- Se ha añadido a cada pocillo 25  $\mu\text{l}$  de la concentración de péptido correspondiente.
- Se ha añadido 200  $\mu\text{l}$  en cada pocillo de la mezcla de BCA.
- Se ha introducido en el horno a 333 K durante dos horas para que la reacción tenga lugar y así intensificar la tonalidad de color obtenida.
- Pasado las dos horas se ha llevado la caja de pocillos al espectrofotómetro para poder mirar la absorbancia de éstos.



## 3.7.- ESTUDIO DE LA UNIÓN PÉPTIDO-SILANO

### 3.7.1.- FLUORESCENCIA

Se ha realizado un estudio sobre el tiempo que debe de estar sumergida la muestra de titanio silanizada en la solución de péptido para que la unión péptido silano sea tan cuantiosa como sea posible.

Para el estudio a realizar han sido preparadas las siguientes muestras:

- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante una hora en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante tres horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante siete horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante trece horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante quince horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de estudio)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning. Posteriormente ha sido sumergido durante una hora en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de control)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning. Posteriormente ha sido sumergido durante tres horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de control)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning. Posteriormente ha sido sumergido durante siete horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de control)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning. Posteriormente ha sido sumergido durante trece horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de control)
- Titanio limpio sometido a plasma cleaning. Posteriormente ha sido sumergido durante quince horas en una solución péptido-carbonato de sodio. (muestra de control)

Se han realizado dos réplicas por cada una de las muestras anteriores.

La solución de péptido fluorescente ha sido preparada de la siguiente manera:

- Han sido pesados 12,4 mg de péptido C<sub>F</sub>GGGK y se han disuelto en 1 ml de agua.
- Se han realizado alícuotas dando una solución final de concentración de 1000 µg/ml utilizando como disolvente carbonato de sodio.

Acabada la preparación de las muestras se ha observado por microscopía la fluorescencia con un microscopio



Nikon E600 el cual tiene acoplada la cámara Olympus DP72.

### 3.7.2.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO-CPTES POR XPS

Para poder estudiar el enlace CPTES-péptido es necesario utilizar una de las técnicas más usadas hoy en día. Para ello se han analizado mediante el XPS las siguientes muestras:

- Sumergir titanio c.p de grado dos cinco minutos con ciclohexano y cinco minutos con isopropanol en el ultrasonidos. Limpiar tres veces con agua destilada, acetona y secar con N<sub>2</sub>. (muestra de control)
- Sumergir titanio c.p de grado dos cinco minutos con ciclohexano y cinco minutos con isopropanol en el ultrasonidos. Limpiar tres veces con agua destilada, acetona y secar con N<sub>2</sub>. Someter al plasma cleaning y a la silanización. (muestra de control)
- Sumergir titanio c.p de grado dos cinco minutos con ciclohexano y cinco minutos con isopropanol en el ultrasonidos. Limpiar tres veces con agua destilada, acetona y secar con N<sub>2</sub>. Someter a plasma cleaning y a la silanización. Sumergir durante toda una noche en una solución de carbonato de sodio (0,5 mg/ml) y péptido de concentración 450 µg/ml. (muestra de estudio)
- Sumergir titanio c.p de grado dos cinco minutos con ciclohexano y cinco minutos con isopropanol en el ultrasonidos. Limpiar tres veces con agua destilada, acetona y secar con N<sub>2</sub>. Sumergir durante toda una noche en una solución de carbonato de sodio (0,5 mg/ml) y péptido de concentración 450 µg/ml. (muestra de estudio)

Finalmente las muestras han sido enviadas al Instituto de Nanociencia de Aragón, exactamente al laboratorio de caracterización de nanoestructuras para poder ser estudiadas por XPS.

El péptido utilizado corresponde a KGRGDS cuya concentración inicial ha sido de 602,06 µg/ml. A partir de éste se han realizado las alícuotas necesarias hasta llegar a una concentración de 450 µg/ml.

### 3.7.3.- ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO SILANO POR ULTRASONIDO

El péptido puede mantener dos tipos de uniones con el material silanizado. Por un lado puede darse el fenómeno de fisiorción, es decir, puede ser adsorbido por el material mediante enlaces débiles como son los enlaces electrostáticos o de Van der Waals. Por otro lado se da el enlace covalente con el silano siendo éste el buscado en todo el estudio realizado.

Para poder determinar qué tipo de unión se ha dado es necesario exponer las muestras a condiciones capaces de eliminar las moléculas adsorbidas y dejar tan solo las enlazadas covalentemente.

Cada dos pares han sido tratados de manera diferente:

- Titanio limpio sumergido durante toda la noche en una solución de péptido y carbonato de sodio. De esta manera el péptido está fisiorbido sobre la superficie de titanio.



- Titanio limpio sometido a plasma cleaning y silanizado con CPTES. Posteriormente ha sido sumergido durante toda la noche en una solución de péptido y carbonato de sodio.

El péptido utilizado ha correspondido al C<sub>6</sub>GGGK siendo la concentración de la solución de péptido fluorescente y carbonato de sodio (0,5 mg/ml) de 1000 µg/ml.

Una vez las muestras han sido preparadas se han observado en el microscopio de fluorescencia Nikon E600 el cual tiene acoplada la cámara Olympus DP72 y se han hecho fotografías de las imágenes observadas.

Seguidamente se han sumergido las muestras en PBS para mantener el pH del medio a 7 y se han dejado durante 20 minutos en el ultrasonido. Pasados los 20 minutos se han limpiado tres veces con agua destilada y se ha vuelto a observar en el microscopio y a realizar fotos de las imágenes obtenidas.

### 3.8.- ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Puede considerarse el ensayo de adhesión celular el ensayo con mayor importancia en este proyecto no por su complejidad de realización, que también la tiene, sino por la importancia de los resultados obtenidos.

Antes de llevar a cabo el proceso de adhesión celular los discos de titanio comercialmente puro de grado 2 han sido tratados de diferente manera para poder comparar las diferentes situaciones posibles. Los tratamientos realizados junto al número de discos utilizados son comentados a continuación.

- 3 probetas de titanio limpio
- 2 probetas de titanio limpio sumergidas durante toda la noche en carbonato de sodio a temperatura ambiente. Al día siguiente han sido lavadas dos veces con PBS
- 2 probetas de titanio limpio sometidas a plasma cleaning y posteriormente al proceso de silanización.
- 2 probetas de titanio limpio sometidas a plasma cleaning y posteriormente al proceso de silanización han sido sumergidas durante toda la noche en una solución de carbonato de sodio y a temperatura ambiente. Al día siguiente han sido lavadas dos veces con PBS.
- 2 probetas de titanio limpio se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGRGDS-carbonato de sodio y a temperatura ambiente. Al día siguiente han sido lavadas dos veces con PBS.
- 2 probetas de titanio limpio se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGGGRGDS-carbonato de sodio y a temperatura ambiente. Al día siguiente han sido lavadas dos veces con PBS.
- 2 probetas de titanio limpio se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGRGDS-agua y a temperatura ambiente. Al día siguiente no han sido lavadas, tan solo se les ha extraído la solución de KGRGDS-agua.
- 2 probetas de titanio limpio se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de



KGGGRGDS-agua y a temperatura ambiente. Al día siguiente no han sido lavadas, tan solo se les ha extraído la solución de KGGGRGDS-agua.

- 1 probeta de titanio limpio se ha dejado sumergida durante toda la noche en una solución de KGRDGS-agua y a temperatura ambiente. Al día siguiente no ha sido lavada, tan solo se le ha extraído la solución de KGRDGS-agua.
- 2 probetas de titanio limpio sometidas a plasma cleaning se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGRGDS-agua y a temperatura ambiente. Al día siguiente no han sido lavadas, tan solo se les ha extraído la solución de KGRGDS-agua.
- 2 probetas de titanio limpio sometidas a plasma cleaning se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGGGRGDS-agua y a temperatura ambiente. Al día siguiente no han sido lavadas, tan solo se les ha extraído la solución de KGGGRGDS-agua.
- 1 probeta de titanio limpio sometida a plasma cleaning se ha dejado sumergida durante toda la noche en una solución de KGRDGS-agua y a temperatura ambiente. Al día siguiente no ha sido lavada, tan solo se le ha extraído la solución de KGRDGS-agua.
- 3 probetas de titanio limpio sometidas a plasma cleaning se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGRGDS-carbonato de sodio y a temperatura ambiente. Al día siguiente han sido lavadas dos veces con PBS.
- 3 probetas de titanio limpio sometidas a plasma cleaning se han dejado sumergidas durante toda la noche en una solución de KGGGRGDS-carbonato de sodio y a temperatura ambiente. Al día siguiente han sido lavadas dos veces con PBS.
- 1 probeta de titanio limpio sometida a plasma cleaning se ha dejado sumergida durante toda la noche en una solución de KGRDGS-carbonato de sodio y a temperatura ambiente. Al día siguiente ha sido lavada dos veces con PBS.

El ensayo de adhesión celular puede dividirse en tres partes diferenciadas: preparación de las células a utilizar, adhesión de las células sobre la superficie de titanio y tinción de las células adheridas.

#### 1.- Preparación de las células:

Inicialmente las células se encuentran congeladas en un criotubo sin medio habiendo un millón de células en cada uno. El protocolo a seguir para su preparación es el siguiente:

- Encender el baño a 310 K.
- Preparar medio de un 10-15% de FBS (suero fetal bovino). Introducir 9 ml del FBS preparado en un tubo de centrifuga y mantenerlo frío.
- La descongelación de las células debe de realizarse en el menor tiempo posible. Para ello traspasar el criotubo desde los congeladores a la sala de cultivos en N<sub>2</sub> líquido o nieve carbónica evitando así la descongelación de las células.





- Introducir el criotubo en el baño a 310 K y agitar suavemente.
- Traspasar la suspensión celular al tubo de centrifuga con medio 10% FBS preparado anteriormente.
- Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos utilizando el contrapeso en la centrifuga.
- Decantar y resuspender el pellet en medio 10% FBS alcanzando un volumen total de 10ml.
- Distribuir en un frasco de cultivos de manera que quede todo el lateral cubierto. Si no fuese el caso debería de añadirse mayor cantidad de 10% FBS. Rotular los frascos con nombre del tipo de célula, número de pase, fecha y nombre del responsable.
- Incubar a 310 K, con un 5% CO<sub>2</sub> durante un mínimo de 16 horas para evitar maltratar las células.
- Cada dos días debe de extraerse el medio y cambiarlo por uno de nuevo.

## 2.- Adhesión de las células sobre la superficie de titanio:

En el siguiente proceso son requeridas varias soluciones las cuales han sido preparadas en un principio.

- Solución de PBS 1X: una pastilla de PBS es diluida en 500 ml de agua mili-Q.
- Solución de BSA (albúmina sérica bovina) al 6%: 1,2 gramos de BSA son diluidos en 2 ml de PBS 1X. Es necesario de poner el conjunto en un baño de agua a 310 Kelvin para su total dilución.
- Medio sin suero: se mezclan con una relación de 1% respecto del medio de piruvato de sodio (500 µl), L-glutamina (500 µl), penicilina-estreptomicina (500 µl) en DMEM (48,5 ml).
- Solución de fibronectina: Se parte de una solución de fibronectina de 1µg/µl, de manera que se le añade 5 µl de PBS 1X.
- Solución paraformaldehído/PBS: Se coge una alícuota preparada de PFA de 760 µl al 16% y se pone en un baño de agua a 333 K durante unos minutos para su solubilización.
- Solución de PBS/Gly: disolver 0,15 gramos de glicina en 100 ml de PBS. Una vez preparado conservar a 277 K. Se usa en los lavados ya que la glicina amortigua la fluorescencia de las células.
- Solución de PBS-Gly-azida sódica: Añadir 4µl de azida en 2ml de PBS-gly. Se usa para preservar las muestras.

En este punto las células se encuentran adheridas a la superficie del frasco de cultivo de manera que es necesario despegarlas. Dicho proceso es conocido como tripsinización.

- Extraer el medio del frasco con cuidado de no tocar las células.
- Añadir en el frasco 5 ml de PBS (sodium phosphate buffer) para limpiar las células y balancear éste asegurando así su mejor limpieza.
- Extraer el PBS introducido. Repetir dicha operación dos veces.
- Añadir 3 ml de tripsina y dejar el conjunto durante 5 minutos en la incubadora.
- Extraer el conjunto célula-tripsina y ponerlo en el tubo de centrifuga.
- Añadir medio en el tubo de centrifuga hasta alcanzar los 10 ml.
- Centrifugar 5 min a 1000 rpm con contrapeso de 10 ml de volumen.



- Derramar el líquido de golpe dejando las células en el fondo del tubo.
- Añadir 10 ml de medio en el tubo y reflujar varias veces.

Una vez las células han sido extraídas del frasco de cultivo se procede de la siguiente manera:

- Contar las células mediante la cámara de Neubauer y el microscopio Nikon Eclipse TS100. Para ello se añaden 1,8 µl de la solución de células en la cámara. Con ayuda del microscopio se cuentan cuántas células hay en el interior de los cuatro cuadrados dibujados en la caja y se hace un promedio. En el caso concreto del ensayo se ha obtenido:

$$(32+29+36+26)/4 = 30,75 \times 10000 = 307500 \text{ células/ml}$$

- Para poder seguir con el procedimiento debe de haber un total aproximado de 20000 células por pocillo. Si por cada uno de ellos habrá un mililitro de solución para recubrir la probeta completamente, debe de añadirse 65 µl de solución de células y 935 µl de medio en cada uno.
- Se introduce el conjunto de células-probetas de titanio en la incubadora a 310 K durante tres horas. Debido a que el tiempo a transcurrir es poco no es necesario de cambiar el medio a las células.
  - Pasado el tiempo se extrae el medio de los pocillos y se limpian con PBS/Gly dos veces. Debe de tenerse mucho cuidado de no despegar las células.
  - Para fijar las células en la muestra de titanio se añade una solución de PFA/PBS. Se deja durante 15 minutos a 277 K.
  - Pasado los 15 minutos se extrae la solución anterior y se limpian las muestras dos veces con una solución de PBS/Gly.
  - En este momento se ha parado el proceso y para ello se ha añadido a cada pocillo un mililitro de una solución de PBS/Gly/azida sódica y se ha dejado el conjunto en la nevera.

### 3.- Tinción de las células adheridas.

Las soluciones a preparar para llevar a cabo dicha parte de la adhesión celular son las siguientes:

- Solución de tritón del 0,25%: se añaden 25 µl de tritón en 9975 µl de PBS/Gly.
- PBS/Gly/BSA 6%: Se pesan 6 gramos de BSA y se disuelven en 100 ml de PBS/Gly.

Debido a que se han querido teñir diferentes partes de la célula se han utilizado diferentes fluoróforos:

- Hoetsch: tiñe los núcleos de la célula.
- Rhodamine phalloidin R415: tiñe los filamentos de actina de la célula.
- Para poder teñir las integrinas es necesario el uso de un anticuerpo primario (Antivinculina F3648) y de un anticuerpo secundario (Alexa fluor 488). Esto es debido a que el anticuerpo secundario es el encargado de aportar la fluorescencia pero no tiene la capacidad de adherirse a las integrinas de la célula. Por ello el uso del anticuerpo primario pudiéndose considerar como la unión entre la integrina



y el fluoróforo A488.

Con los diferentes fluoróforos se preparan dos soluciones:

- Solución del anticuerpo primario: disolver el anticuerpo primario con PBS en una relación 1:400. Exactamente se han disuelto 5  $\mu$ l de antivinculina en 2 ml de PBS/Gly/BSA al 3%.
- Solución de los otros fluoróforos: disolverse la faloidina, Hoetscht y A488 en un 1% con PBS. Exactamente se han medido volúmenes de 5  $\mu$ l de cada uno de los fluoróforos y se han disuelto en 2485  $\mu$ l de PBS/Gly.

Una vez han sido preparadas todas las soluciones se ha continuado con el proceso:

- Las muestras han sido extraídas de la nevera y se han lavado dos veces con PBS/Gly.
- Para impermeabilizar las células y así poder teñir su interior son sumergidas en una solución de tritón del 0,25% en PBS/Gly durante 10 minutos.
- Limpiar las muestras tres veces con una solución de PBS/Gly.
- Añadir PBS/Gly/BSA 6% e incubarlas durante 45 minutos. Con esta acción se están bloqueando las uniones inespecíficas.
- Limpiar tres veces con PBS/Gly.
- Añadir la solución del anticuerpo en PBS/Gly/BSA al 3% y dejar actuar durante una hora a 37°C. Para usar la mínima cantidad de anticuerpo posible se ha utilizado el método de la muestra volteada, es decir, se pone una gota de la solución sobre parafilm y se coloca la muestra volteada sobre ella.
- Pasada la hora limpiar con una solución de PBS/Gly tres veces.
- Incubar las células con la solución preparada anteriormente de todos los fluoróforos durante una hora. Es importante trabajar a partir de este punto en las condiciones más oscuras posibles para evitar posibles pérdidas de fluorescencia. Se ha vuelto a utilizar el método de la muestra volteada.
- Limpiar tres veces con PBS/Gly.
- Una vez las muestras están totalmente secas se montan con moviol. Para ello se añade una gota de moviol en la superficie de la muestra y a continuación se incorpora un cubre muestras. Debe de esperarse posteriormente 30 minutos a temperatura ambiente a que el moviol se seque. El moviol sirve para aislar las muestras del medio ya que los fluoróforos en contacto con el oxígeno del aire se oxidan perdiendo su efecto. Además de evitar el contacto con el aire y su deterioro.
- Finalmente se guarda el conjunto tapado y evitando el contacto con la luz en la nevera.

Las concentraciones de los tres péptidos utilizados han sido de 500  $\mu$ g/ml partiendo en los tres casos de concentraciones iniciales de 2mg/ml. Así pues se han extraído alícuotas de 75  $\mu$ l por cada uno de los pocillos y se han añadido 225  $\mu$ l de carbonato de sodio 0,5mg/ml.



A la hora de seleccionar las células a utilizar se ha optado por una línea celular osteoblástica de comportamiento conocido como son las MG63.

Han sido utilizados tres tipos de péptidos:

- **KGRGDS**: péptido de cadena corta con la secuencia RGD en su cadena.
- **KGGGRGDS**: péptido de cadena más larga que el **KGRGDS** de manera que posee una mayor facilidad de adhesión celular debido a que tiene menor impedimento estérico.
- **KGRDGS**: péptido utilizado como control ya que no posee la secuencia RGD en su cadena.



# CAPÍTULO 4

## RESULTADOS

### 4.1.- INTERFEROMETRÍA DE MUESTRAS PULIDAS MANUAL Y AUTOMÁTICAMENTE

La Figura 4.1 y la Figura 4.2 muestran las imágenes obtenidas por interferometría para algunas de las superficies estudiadas.

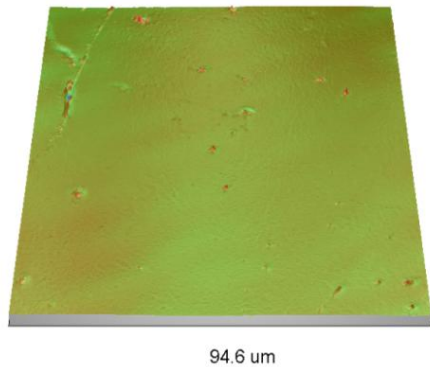


Figura 4.1.- Imagen obtenida por Interferometría de una muestra pulida automáticamente (x50).  $S_a = 19.97\text{nm}$ .

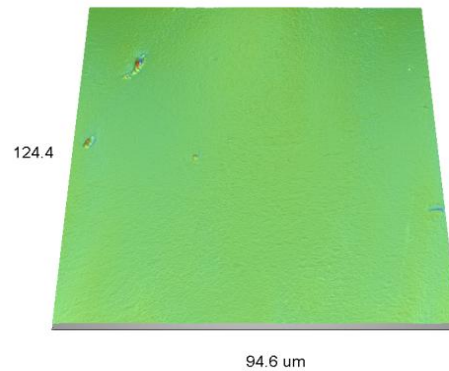


Figura 4.2.- Imagen obtenida por Interferometría de una muestra pulida manualmente (x50).  $S_a = 17.19\text{nm}$ .

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos.

	$S_a$ (nm)	$S_q$ (nm)	$S_m$ (mm <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup> )	$S_{ku}$	$S_{sk}$	$S_{Area}$ Index
<b>Todas las muestras</b>	$17,42 \pm 2,29$	$23,86 \pm 3,34$	$145,41 \pm 103,21$	$44,89 \pm 78,66$	$-1,46 \pm 3,53$	$1,0015 \pm 0,0014$
<b>Muestras pulidas automáticamente</b>	$17,54 \pm 1,85$	$24,12 \pm 3,74$	$164,59 \pm 118,19$	$36,65 \pm 35,02$	$-1,77 \pm 3,81$	$1,0010 \pm 0,00050$
<b>Muestras pulidas manualmente</b>	$17,23 \pm 3,11$	$23,32 \pm 2,76$	$118,58 \pm 82,44$	$54,51 \pm 114,77$	$-1,04 \pm 3,41$	$1,0020 \pm 0,0018$

Tabla 4.1. Resultados obtenidos de la interferometría.



Al realizar el análisis de varianzas de los datos resultantes con un intervalo de confianza del 95% se han obtenido los siguientes valores de p. El valor de  $\alpha$  corresponde a 0,05 comparándose las poblaciones de muestras pulidas automáticamente y muestras pulidas manualmente.

	$S_a$ (nm)	$S_q$ (nm)	$S_m$ ( $m^3/mm^2$ )	$S_{ku}$	$S_{sk}$	$S_{Area}$ Index
Valores de p	0,823	0,100	0,713	0,718	0,473	0,149

Tabla 4.2.- Valores p procedentes del análisis de varianza.

Puede observarse que en todos los casos el valor p es mayor a la alfa (0,05) de manera que no es posible rechazar la hipótesis inicial, es decir, no existen diferencias significativas entre los dos métodos de pulido.

## 4.2.- ELECCIÓN DEL SILANO

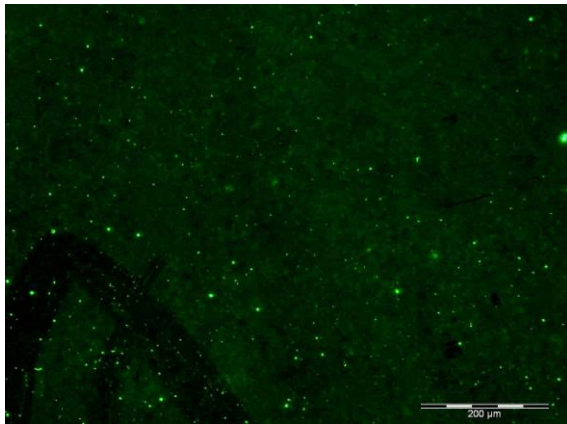
### 4.2.1.- FLUORESCENCIA

Las imágenes obtenidas pueden observarse a continuación:



Ti limpio

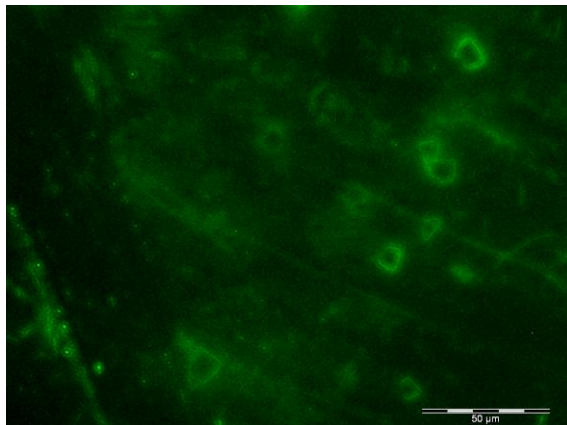




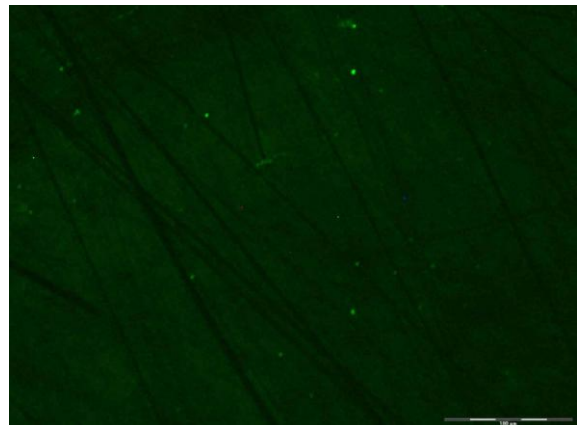
Ti limpio silanizado con CPTES y sumergido durante toda la noche en la solución de péptido-carbonato de sodio a 40 aumentos.



Ti limpio sumergido durante toda la noche en la solución de péptido-carbonato de sodio a 40 aumentos.



Ti limpio silanizado con GPTES y sumergido durante toda la noche en la solución de péptido-PBS a 40 aumentos.



Ti limpio sumergido durante toda la noche en la solución de péptido-PBS a 40 aumentos.

Figura 4.3.- Imágenes obtenidas mediante el microscopio de fluorescencia.

Los parámetros fijados en el microscopio han sido los siguientes:

- Tiempo de adquisición de la imagen: 4500 ms.
- Histograma: 0%-100%.
- ISO 800

Una vez las imágenes han sido obtenidas se ha realizado un estudio de la intensidad media observada en cada una de éstas siendo los resultados:



	Intensidad media (A)
Ti limpio	5,05
Ti-CPTES-Péptido( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	12,93
Ti-Péptido( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	4,92
Ti-GPTES-Péptido(PBS)	15,80
Ti-Péptido(PBS)	8,46

Tabla 4.3.- Intensidad media (A) de cada una de las imágenes obtenidas.

Pueden considerarse que el PBS interfiere en la fluorescencia.

#### 4.2.2.- ToF-SIMS

Los resultados de ToF-SIMS son obtenidos en forma de tablas (intensidad-masa) y sus respectivos gráficos. No obstante es más fácil trabajar en ratios. Para ello se ha dividido la intensidad del pico de estudio (pico de flúor cuya masa es de 19) y la intensidad de un pico de referencia (pico de OH ya que está presente en todas las muestras. Su masa es de 17).

Los resultados obtenidos han sido representados gráficamente.

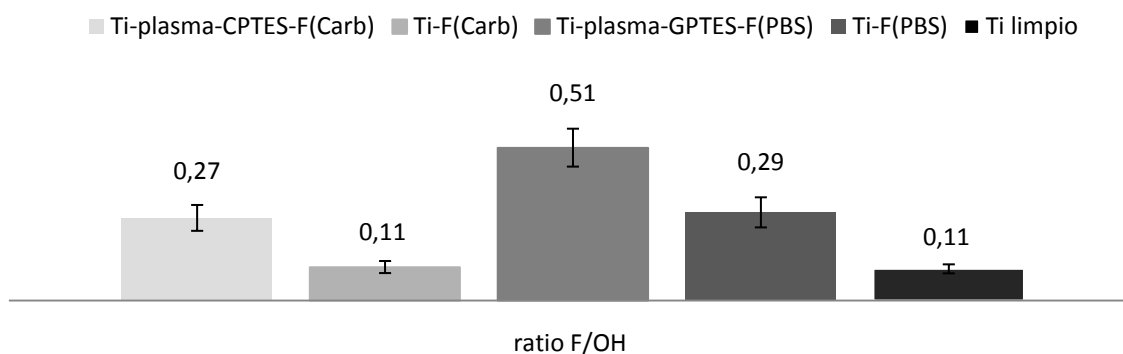


Gráfico 4.1.- Representación de los ratios obtenidos.

La muestra Ti-plasma-GPTES-F(PBS) presenta un mayor ratio de F/OH entendiéndose que es la muestra que posee mayor cantidad de flúor en su superficie.

### 4.3.- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN

En este apartado se ha realizado diferentes estudios para poder establecer un protocolo eficaz a la hora de silanizar. Para ello se han estudiado probetas de titanio comercialmente puro de grado dos tratadas de diferente manera pudiendo observar las diferencias entre los resultados obtenidos.





### 4.3.1.- ÁNGULO DE CONTACTO

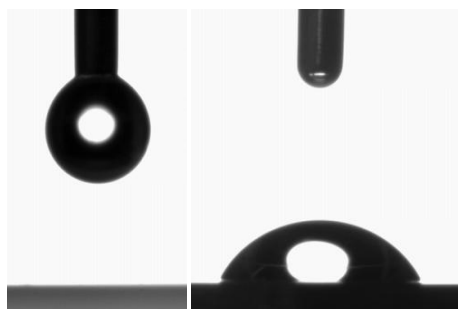


Figura 4.4.- Imágenes de la medida del ángulo de contacto. La primera imagen corresponde a la gota al salir de la aguja no siendo aún depositada sobre la superficie de titanio. La segunda imagen corresponde a la gota una vez ha sido depositada sobre la superficie de titanio limpio. En este caso el valor del ángulo de contacto correspondió a  $65,9^\circ$ .

En la tabla 4.4 quedan reflejados los valores promedios junto a la desviación típica de los ángulos de contacto obtenidos en cada una de las muestras estudiadas.

	Ángulo de contacto ( $^\circ$ )	Tensión superficial (N/m)
<b>Ti limpio</b>	$64,25 \pm 2,61$	$45,21 \pm 1,60$
<b>Ti-plasma</b>	< que el medible por el equipo	No ha sido posible su cálculo debido a la no posible medida del ángulo de contacto
<b>Ti-piraña</b>	$13,86 \pm 1,99$	$70,69 \pm 0,53$
<b>Ti-plasma-piraña</b>	$12,98 \pm 1,23$	$70,95 \pm 0,32$
<b>Ti-piraña-plasma</b>	< que el medible por el equipo	No ha sido posible su cálculo debido a la no posible medida del ángulo de contacto
<b>Ti-plasma-piraña-silanizado</b>	$92,32 \pm 1,63$	$27,75 \pm 1,01$
<b>Ti-piraña-plasma-silanizado</b>	$90,54 \pm 2,22$	$28,86 \pm 1,38$
<b>Ti-plasma-silanizado</b>	$87,18 \pm 2,72$	$30,95 \pm 1,70$
<b>Ti-piraña-silanizado</b>	$89,74 \pm 1,34$	$29,35 \pm 0,83$

Tabla 4.4. Valores de los ángulos de contacto y las respectivas tensiones superficiales.

Mediante el análisis de varianza se ha estudiado la posible presencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos. El intervalo de confianza utilizado ha sido del 95%.



	Valor de p
Ti-piraña vs Ti-plasma-piraña	0,301
Ti-plasma-silanizado vs Ti-piraña-silanizado	0,020
Ti-plasma-piraña-silanizado vs Ti-piraña-plasma-silanizado	0,056
Ti-piraña-silanizado vs Ti-piraña-plasma-silanizado	0,0364

Tabla 4.5.- Valores de p obtenidos al analizar las varianzas.

- Al realizar el plasma cleaning o la reacción de piraña sobre la muestra de titanio aumenta la hidrofiliidad del disco. No obstante el plasma cleaning provoca más hidrofilia en las muestras que la reacción de piraña.
- Al realizar la silanización se genera un aumento del comportamiento hidrófobo del material tanto sea después de la reacción de piraña como del proceso de plasma cleaning.
- Los ángulos de contacto de las muestras tratadas con piraña y tratadas con plasma-piraña presentan los mismos ángulos de contacto.

#### 4.3.2.- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA

Se ha realizado un estudio de la rugosidad ejercida por la reacción de piraña sobre el disco de titanio. A continuación pueden observarse dos imágenes de dos muestras sometidas al proceso de piraña.

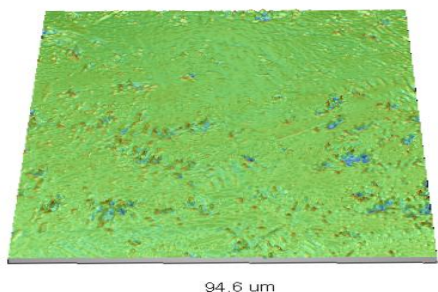


Figura 4.5.- Imagen obtenida por Interferometría de la muestra B4 (x50). Sa = 79,26 nm.

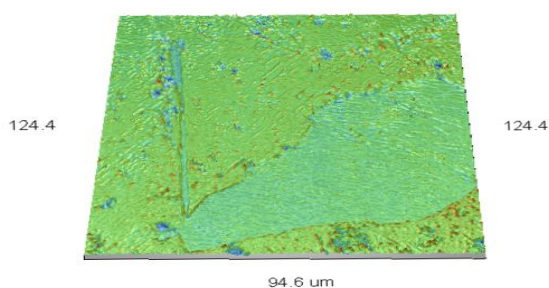


Figura 4.6.- Imagen obtenida por Interferometría de la muestra C4 (x50). Sa = 125,21 nm.

La rugosidad producida por la reacción de piraña queda patente en la superficie de la muestra hasta tal punto que son descubiertos los límites de grano tal y como queda reflejado en la figura 4.6.



Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.6.

	$S_a$ (nm)	$S_q$ (nm)	$S_m$ (mm <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup> )	$S_{ku}$	$S_{sk}$	$S_{Area}$ Index
Muestras sometidas a piraña	113,62 ± 28,61	159,08 ± 31,15	523,83 ± 105,63	8,58 ± 2,90	-0,49 ± 1,09	1,17 ± 0,21
Muestras no sometidas a la reacción de piraña	17,42 ± 2,29	23,86 ± 3,34	145,41 ± 103,21	44,89 ± 78,66	-1,46 ± 3,53	1,0015 ± 0,0014

Tabla 4.6.- Valores de rugosidad referentes titanio sometido y no sometido a la reacción de.

La reacción de piraña aumenta considerablemente la rugosidad del titanio.

### 4.3.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO

La apariencia de las muestras estudiadas es expuesta a continuación.

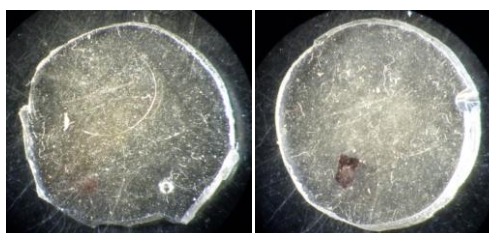


Figura 4.7.- Muestra de PDMS lisa y rugosa respectivamente.

A simple vista es imposible diferenciar ambas muestras a pesar de que los ángulos de contactos demuestra la diferencia de rugosidad entre ellas.

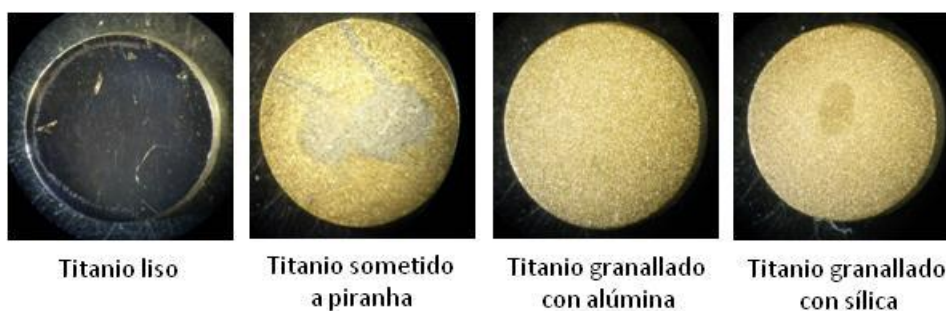


Figura 4.8.- Muestras de titanio recubiertas de oro tratadas de diferente manera.

Los resultados obtenidos al realizar el ángulo de contacto sobre las réplicas quedan expuestos en la tabla 4.7..



	Muestras lisas (°)	Muestras sometidas a piraña (°)	Muestras sometidas a granallado con alúmina (°)	Muestras sometidas a granallado con sílica (°)
Réplicas de PDMS	119,81 ± 1,42	114,29 ± 3,16		
Recubrimientos de oro	92,42 ± 4,32	100,12 ± 4,65	108,09 ± 11,74	133,63 ± 8,12

Tabla 4.7.- Valores de los ángulos de contacto obtenidos en grados.

La anova realizado en los valores ha dado el siguiente resultado:

	Valor de p
Réplicas de PDMS lisa vs rugosa	0,000
Recubrimiento de oro de la muestra lisa vs piraña	0,000
Recubrimiento de oro de la muestra lisa vs granallada con alúmina	0,000
Recubrimiento de oro de la muestra lisa vs granallada con sílica	0,000

Tabla 4.8.- Valores de p obtenidos al analizar las varianzas.

Existen diferencias significativas entre la muestra lisa y las muestras rugosas de cualquiera de los métodos utilizado. La rugosidad influye en el ángulo de contacto.

#### 4.3.4.- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN

Tal y como puede observarse en el espectro de ToF-SIMS situado en el Anexo C.3.4 los espectros de ToF-SIMS consisten en una representación cuyo eje de coordenadas hace referencia a masa vs. Intensidad representándose sobre ellos una serie de picos. Cada uno de estos picos corresponde a una secuencia de la molécula de estudio que ha sido fragmentada. Dependiendo de los componentes del fragmento su masa variará. En los espectros obtenidos ha sido posible reconocer los siguientes picos:

Fracción de molécula	Masa (mass/u)
-C*H	13
-C <sub>2</sub> H <sup>-</sup>	25
-C* <sub>2</sub> H <sup>-</sup> / <sup>-</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	26
-Cl/Cl*	35/36
-C <sub>2</sub> Cl	59
-C <sub>2</sub> HCl	60,01
-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl	61,01
-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl	62,03
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl	63,03
-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Cl	76,04
-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> Cl	77,05
-C <sub>3</sub> <sup>*</sup> H <sub>3</sub> Cl	77,02
-C <sub>3</sub> <sup>*</sup> H <sub>5</sub> Cl	79,04
-C <sub>3</sub> <sup>*</sup> H <sub>6</sub> Cl	80,05

Tabla 4.9.- Valores másicos obtenidos por la técnica ToF-SIMS junto con los fragmentos correspondientes.



Existen picos debidos a contaminantes en el espectro correspondiente a la muestra tratada únicamente con plasma cleaning. Las muestras con mayor rugosidad poseen mayor ángulo de contacto que las muestras lisas.

A la hora de trabajar con los resultados de ToF-SIMS es más fácil tratar con ratios. Para ello se ha dividido el pico de mayor intensidad a estudiar con un pico de referencia. Como pico de referencia se ha escogido el pico de OH ya que está presente de manera constante en todas las muestras. Como pico de estudio se ha elegido el pico de cloro cuya masa es de 35.

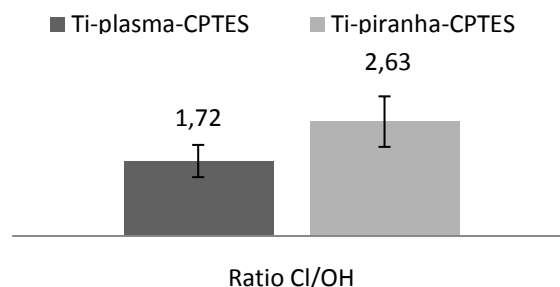


Gráfico 4.2.- Representación de los ratios obtenidos.

Existen diferencias claras entre ambos procesos siendo mayor la presencia de cloro en la reacción sometida a piraña que la tratada con el plasma cleaning.

### 4.3.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SILANIZACIÓN POR XPS

La técnica XPS aporta de manera cuantitativa y en porcentajes la presencia de los elementos presentes en la superficie de las muestras estudiadas. En el caso que procede interesan elementos tales como el titanio y el cloro. A continuación quedan reflejados dichos porcentajes.

	Ti %	Cl %
Ti limpio	20,06	0
Ti-plasma-CPTES 0h	14,53	2,28
Ti-plasma-CPTES 12h	14,10	3,42
Ti-plasma-CPTES 24h	13,75	2,20

Tabla 4.10.- Porcentajes de Ti y Cl presentes en las muestras estudiadas.

A pesar de los porcentajes obtenidos es interesante calcular los ratios siendo el porcentaje de referencia el de titanio y el de estudio el del cloro. Puede considerarse el CPTES estable con el tiempo.

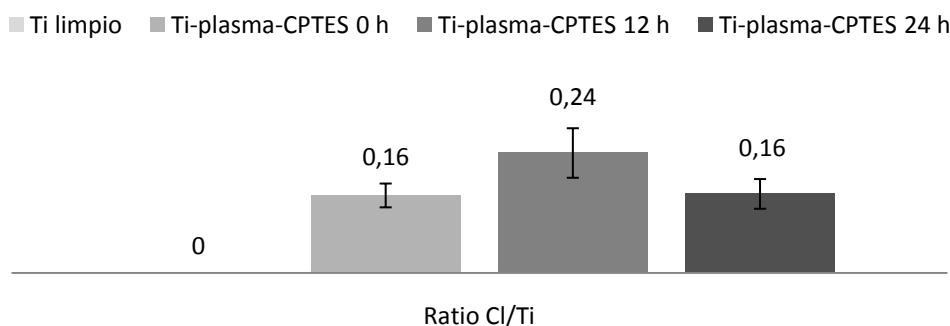


Gráfico 4.3.- Representación de los ratios obtenidos.

### 4.4.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING

Una vez ha sido eliminada la reacción de piraña del protocolo de silanización se ha realizado un estudio de la estabilidad de los grupos -OH introducidos sobre el disco de titanio con el tiempo.[32] A continuación queda representado el comportamiento obtenido por tres muestras sometidas a plasma cleaning.

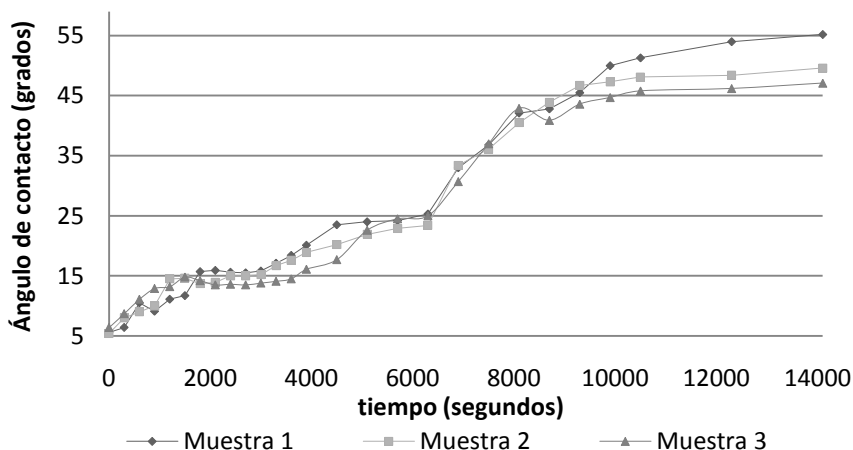


Gráfico 4.4.- Estudio de la estabilidad de los grupos -OH implantados sobre la superficie de titanio mediante la técnica de plasma cleaning.

A medida que pasa el tiempo el ángulo de contacto aumenta. Inicialmente dicho aumento es mayor y a medida que pasa el tiempo puede considerarse que éste se va estabilizando llegando a alcanzar el valor del ángulo de contacto del titanio sin tratar.

### 4.5.- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA

Los resultados obtenidos de la absorbancia son los siguientes:

Concentración de KGRDGS (µg/ml)	Absorbancia
1800	2,96 ± 0,14
900	1,64 ± 0,067
600	1,27 ± 0,080
456	1,08 ± 0,022
300	0,99 ± 0,035
144	0,69 ± 0,042
72	0,50 ± 0,018
24	0,34 ± 0,010
0	0,21 ± 0,006



Tabla 4.11.- Absorbancia de diferentes concentraciones de péptido sometidas a colorimetría de BCA.

Visualmente se ha apreciado un cambio de coloración variando de un verde en el caso de no haber péptido a un violeta a medida que la concentración de péptido ha ido aumentando. Se puede asegurar que el péptido se disuelve completamente en agua a las concentraciones estudiadas.

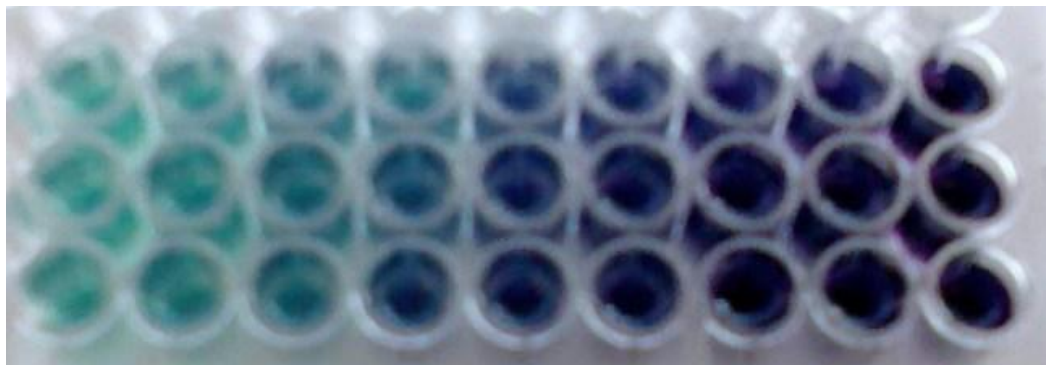
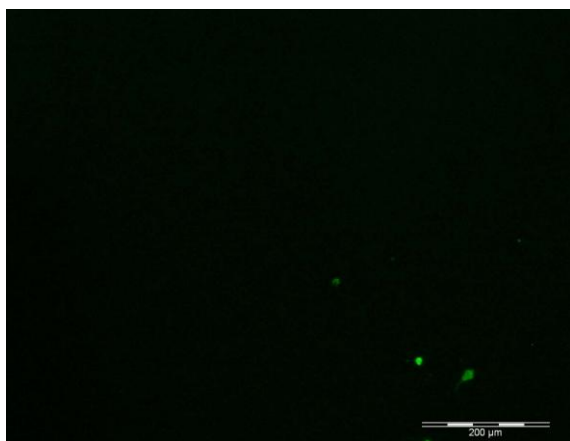


Figura 4.9.- Variación de color a medida que la concentración de péptido aumenta.

## 4.6.- ESTUDIO DE LA UNIÓN PÉPTIDO-SILANO

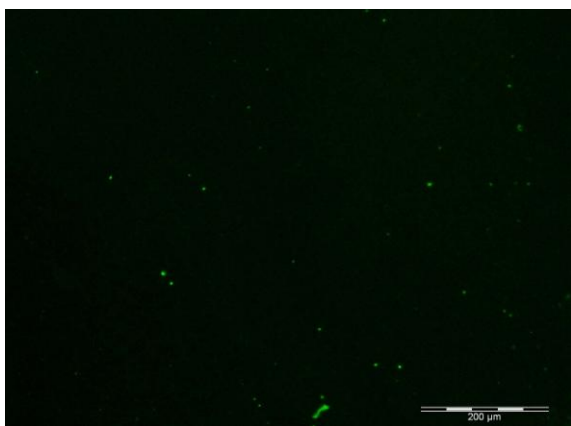
### 4.6.1.- FLUORESCENCIA

Las siguientes figuras muestran lo observado a través del microscopio y al mismo tiempo pueden apreciarse las diferencias entre las diferentes muestras.



Titanio limpio a 10 aumentos.

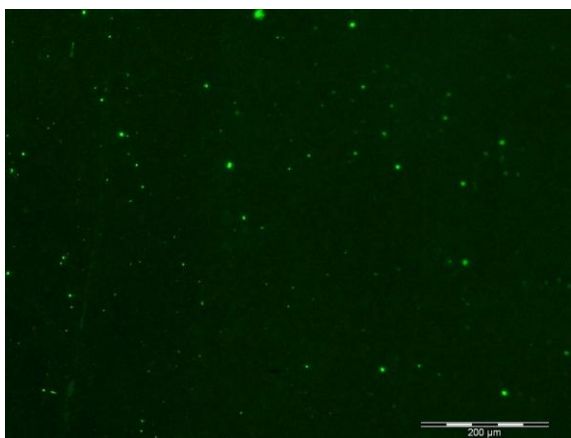




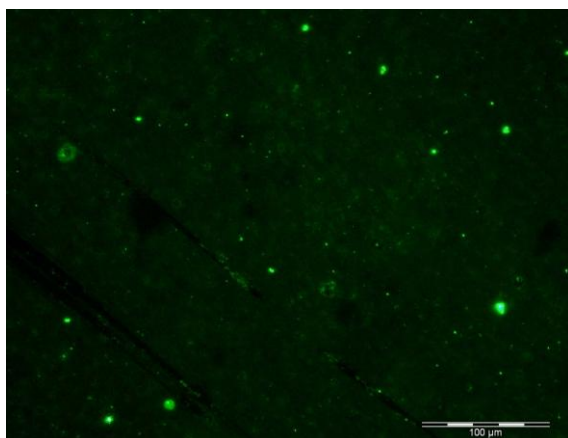
Titanio limpio sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.



Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.



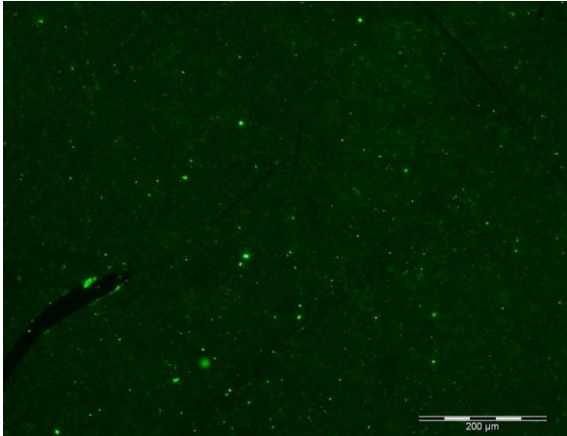
Titanio limpio sumergido durante 3 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



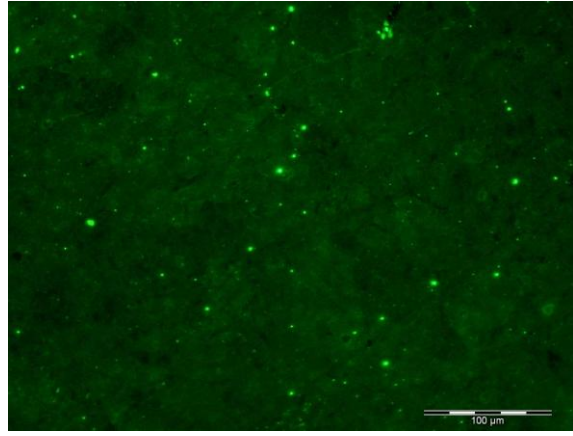
Titanio limpio sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.







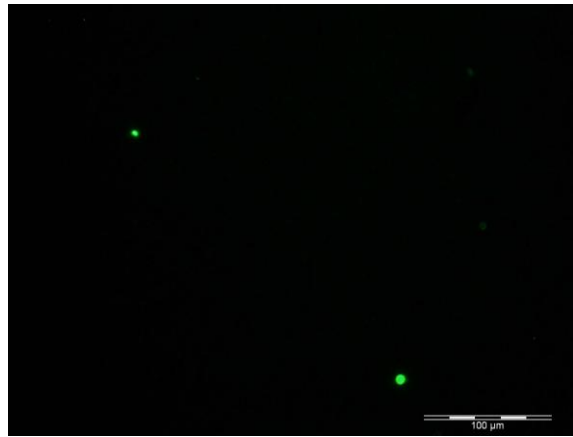
Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 3 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



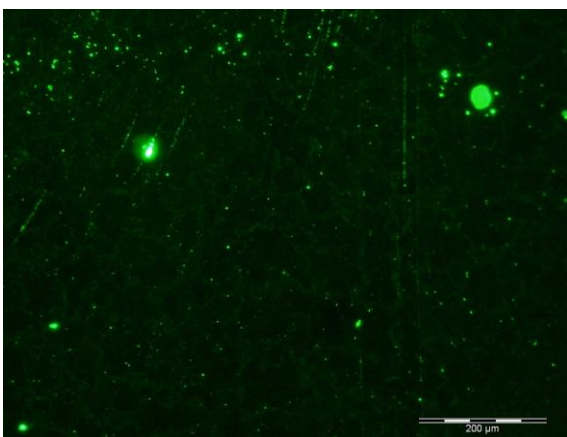
Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 3 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.



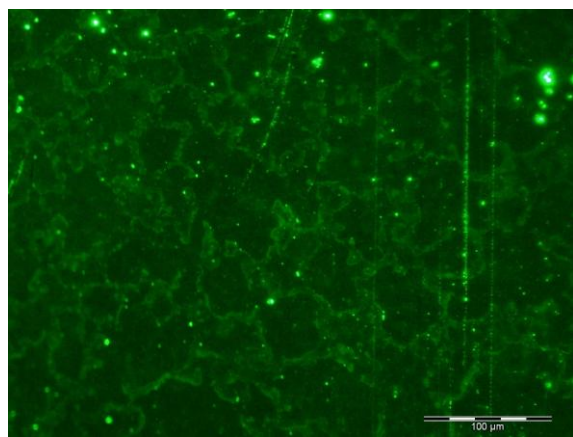
Titanio limpio sumergido durante 5 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio sumergido durante 5 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.

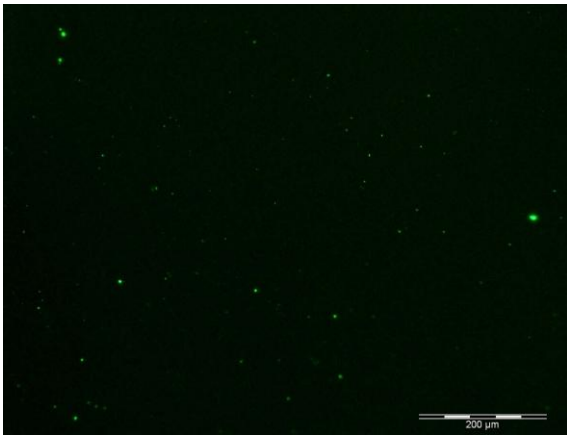


Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 5 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.

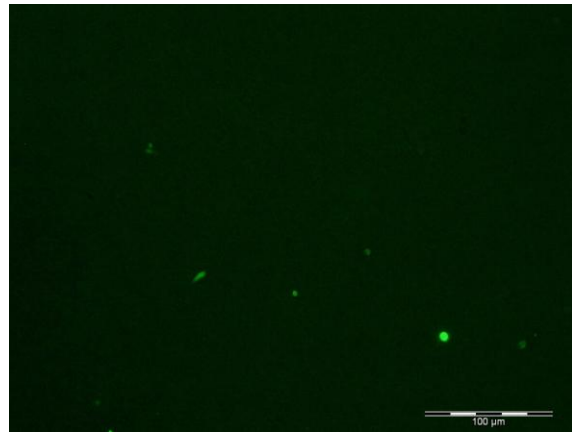


Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 5 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.

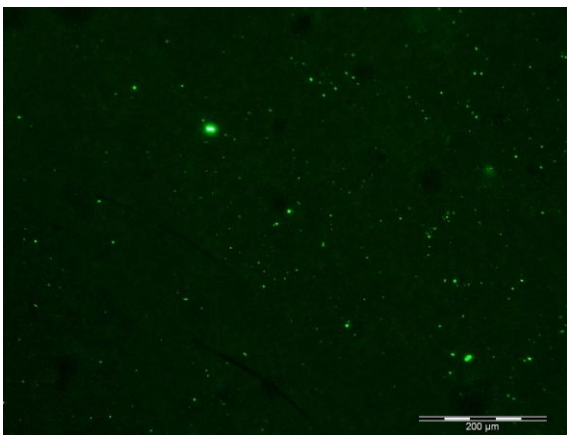




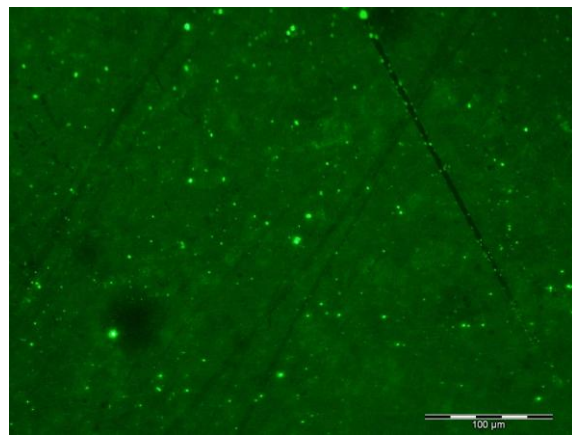
Titanio limpio sumergido durante 7 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



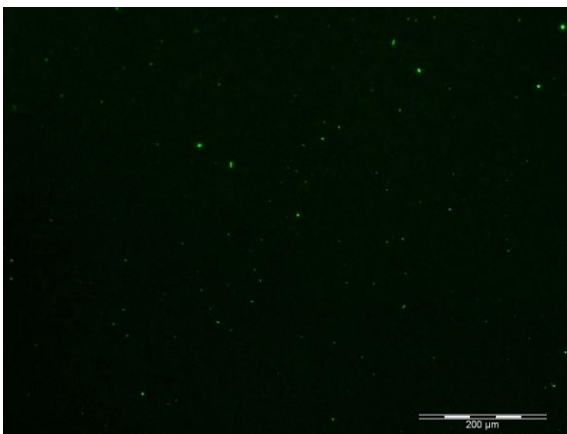
Titanio limpio sumergido durante 7 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 7 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 7 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.

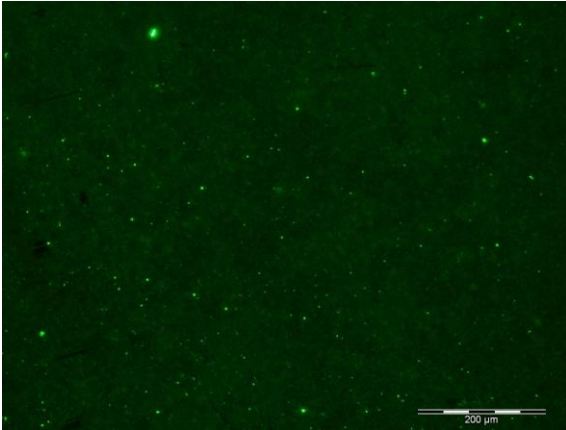


Titanio limpio sumergido durante 13 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.

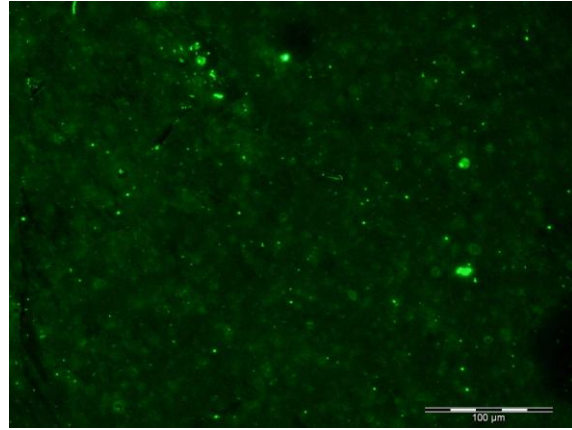


Titanio limpio sumergido durante 13 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.

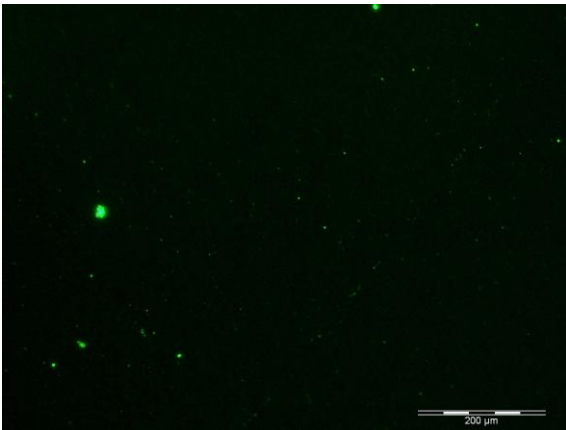




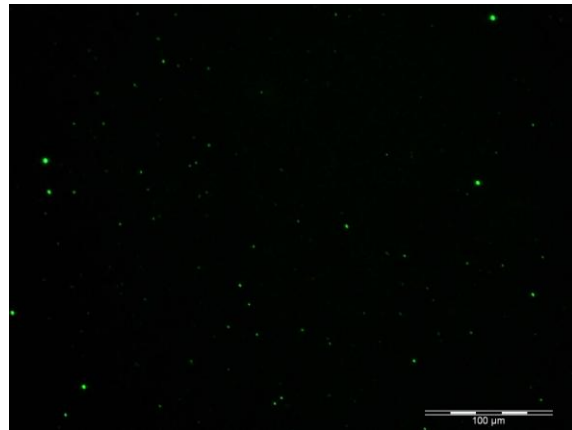
Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 13 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



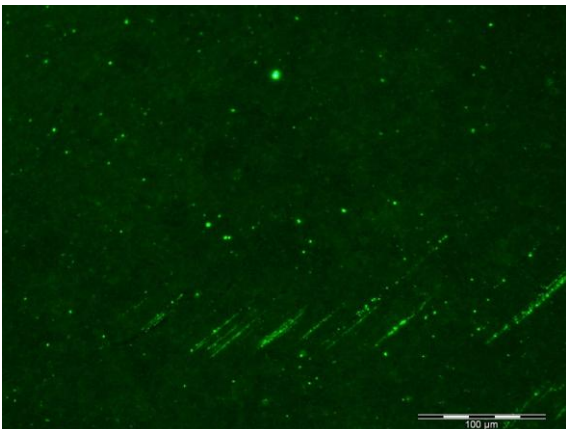
Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 13 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.



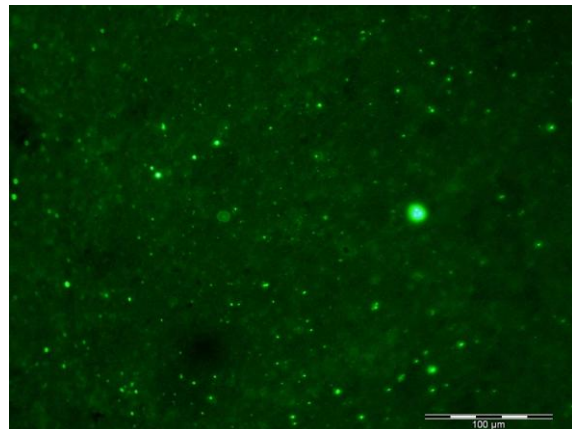
Titanio limpio sumergido durante 15 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio sumergido durante 15 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.



Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 15 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.



Titanio limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 15 h en la solución de péptido-carbonato de sodio a 20 aumentos.



Figura 4.10.- Imágenes obtenidas a partir del microscopio de fluorescencia.

Los parámetros fijados en el microscopio han sido los siguientes:

- Tiempo de adquisición de la imagen: 6000 ms.
- Histograma: 0%-100%.
- ISO 800

Se ha realizado un análisis de la intensidad aportada por la fluorescencia en cada una de las fotografías tomadas.

	Intensidad (A) a 10 aumentos	Intensidad (A) a 20 aumentos
<b>Titano limpio sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	5,30	1,81
<b>Titano limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 1 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	11,03	9,84
<b>Titano limpio sumergido durante 3 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	4,83	4,96
<b>Titano limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 3 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	13,35	17,50
<b>Titano limpio sumergido durante 5 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	5,13	7,89
<b>Titano limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 5 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	10,51	22,31
<b>Titano limpio sumergido durante 7 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	5,47	10,39
<b>Titano limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 7 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	10,45	25,11
<b>Titano limpio sumergido durante 13 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	5,46	2,14
<b>Titano limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 13 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	14,18	14,07
<b>Titano limpio sumergido durante 15 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	5,37	1,82
<b>Titano limpio silanizado con CPTES Y sumergido durante 15 h en la solución de péptido-carbonato de sodio.</b>	14,96	17,63

Tabla 4.12.- Intensidad media de las fotografías realizadas mediante el microscopio de fluorescencia.



Puede considerarse que sumergiendo el titanio 7 horas sobre la solución de péptido ya se obtiene una adhesión suficiente con el CPTES.

#### 4.6.2.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO-CPTES POR XPS

Los resultados aportados por el equipo de XPS vienen en forma de porcentaje, siendo los elementos interesantes en este caso el titanio y el nitrógeno ya que éste último forma parte del péptido. Por ello dependiendo de cuál sea su cantidad puede considerarse la unión péptido-CPTES satisfactoria o no.

	Ti %	N %
<b>Ti limpio</b>	19,71	0,85
<b>Ti-plasma-CPTES</b>	14,53	0,45
<b>Ti-plasma-CPTES-RGD</b>	14,66	0,86
	13,70	0,83
<b>Ti-RGD</b>	22,03	1,03
	20,85	0,83

Tabla 4.13.- Porcentaje de titanio y de nitrógeno sobre la superficie de las muestras tratadas.

Los ratios calculados y estudiados son mostrados a continuación:

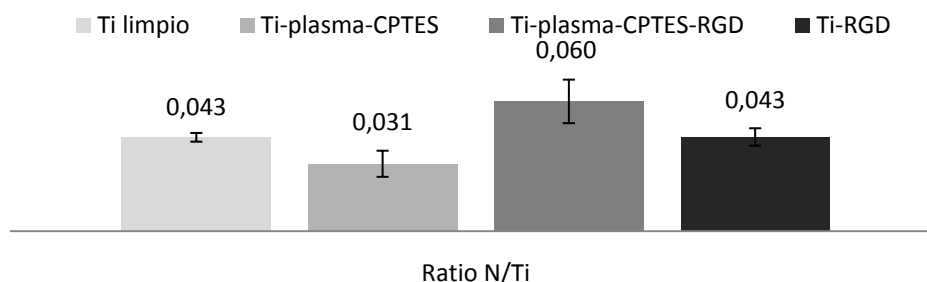


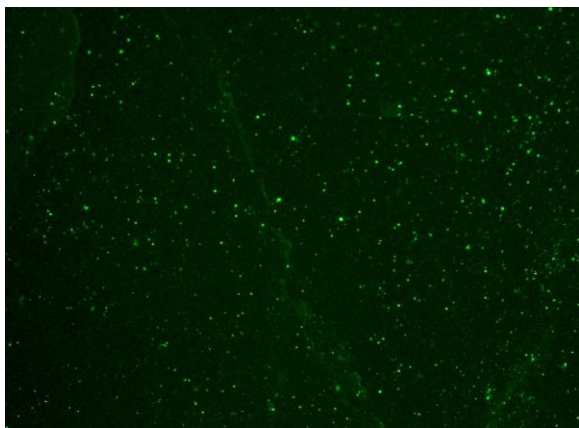
Gráfico 4.5.- Representación de los ratios obtenidos.

Puede observarse la presencia de péptido en la muestra con CPTES.

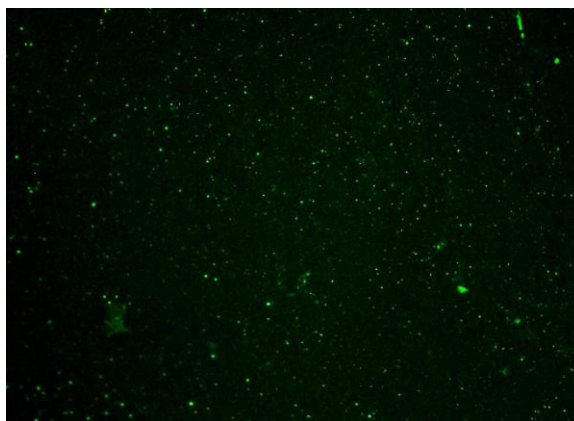
#### 4.6.3.- ESTABILIDAD DE LA UNIÓN DEL PÉPTIDO SILANO POR ULTRASONIDOS

Para determinar la estabilidad del péptido sobre el silano se han obtenido imágenes de la fluorescencia de las muestras antes y después del ultrasonido. Además se ha calculado la intensidad media de éstas para poder comparar de una manera más exacta los resultados obtenidos.





Titanio sometido a plasma cleaning y silanizado. Sumergido durante toda la noche en una solución de péptido-carbonato de sodio.



Titanio sometido a plasma cleaning y silanizado. Sumergido durante toda la noche en una solución de péptido-carbonato de sodio. Finalmente ha sido sumergido en PBS y sonicado durante 20 minutos.

Figura 4.11.- Imágenes obtenidas a partir del microscopio de fluorescencia.

Las intensidades medias calculadas mediante el software Image J de las imágenes capturadas han sido:

	Intensidad media (A)
Titanio sometido a plasma cleaning y silanizado.	10,21
Sumergido durante toda la noche en una solución de péptido-carbonato de sodio.	9,80
Titanio sometido a plasma cleaning y silanizado.	5,70
Sumergido durante toda la noche en una solución de péptido-carbonato de sodio. Finalmente ha sido sumergido en PBS y sonicado durante 20 minutos.	4,90

Tabla 4.14.- Intensidad media de las fotografías realizadas mediante el microscopio de fluorescencia.

Tiene lugar una pérdida de fluorescencia al someter las muestras al ultrasonidos.

## 4.7.- ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Una vez las células han sido teñidas se ha ido al microscopio a realizar una serie de fotografías a diferentes aumentos. Las imágenes obtenidas a 4 aumentos son necesarias para poder realizar el conteo de éstas en cada una de las situaciones existentes. En cambio, a 20 aumentos se ha medido el área de éstas pudiendo saber de esta manera cuál es su extensión.

A continuación pueden observarse varias células bajo tres espectros diferentes de fluorescencia pudiendo así observar las diferentes tinciones realizadas.



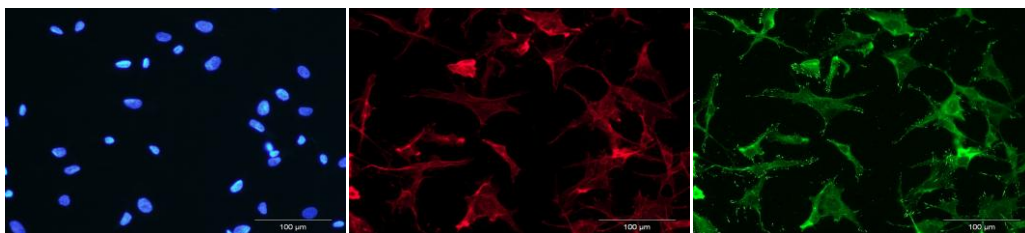


Figura 4.12.- Células expandidas sobre la superficie de titanio previamente sumergido en fibronectina. En estas imágenes pueden diferenciarse los núcleos de las células, los filamentos de actina y finalmente los puntos focales (integrinas).

Las imágenes situadas sobre estas líneas hacen referencia a la situación ideal a donde las células se encuentran en gran número y muy extendidas sobre la superficie de titanio.

Los parámetros fijados en el microscopio han sido los siguientes:

- Tiempo de adquisición de la imagen:
  - Filtro azul: 333,3 ms.
  - Filtro rojo: 666,7 ms.
  - Filtro verde: 5250 ms.
- Histograma: 0%-100%.
- ISO 200

Es importante decir que hay muestras que no son comentadas ya que sus resultados no son relevantes.

Para llevar a cabo el recuento de células ha sido necesario la obtención de una media de 4 imágenes por muestra con el microscopio de fluorescencia a cuatro aumentos. Seguidamente con ayuda del software Image J (Sun Microsystems, Inc) se ha procedido a su recuento. Con el mismo software ha sido posible calcular las dimensiones de la imagen por lo que los datos aportados hacen referencia al número de células por  $\text{cm}^2$ .

	Número de células/ $\text{cm}^2$
<b>Ti limpio</b>	657,29 ± 18,85
<b>Ti-plasma-CPTES</b>	45,02 ± 1,23
<b>Ti-KGRGDS</b>	589,76 ± 8,47
<b>Ti-KGGGRGDS</b>	625,77 ± 8,72
<b>Ti-KGRDGS</b>	270,12 ± 1,73
<b>Ti-plasma-CPTES-KGRGDS</b>	1960,60 ± 59,03
<b>Ti-plasma-CPTES-KGGGRGDS</b>	847,75 ± 14,47
<b>Ti-plasma-CPTES-KGRDGS</b>	225,10 ± 5,13

Tabla 4.15.- Número de células por  $\text{cm}^2$  de las muestras de estudio.



En los casos a donde la muestra ha sido silanizada y después sumergida en los péptidos con el grupo **RGD** se aprecia una mayor cantidad de células que en los otros casos.

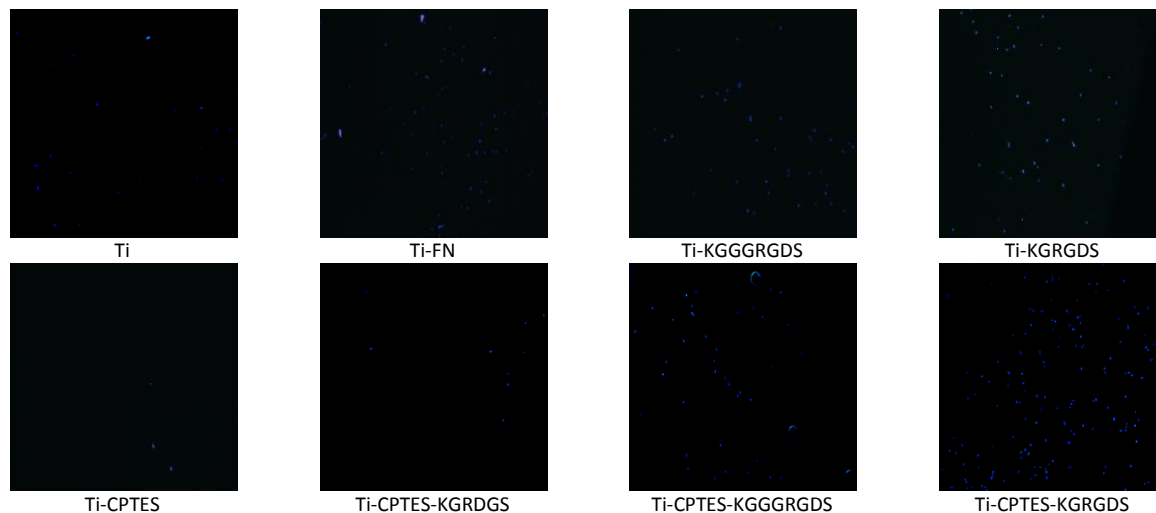


Figura 4.13.- Número de células según el tratamiento realizado sobre la superficie de titanio.

La anova a un nivel de confianza del 95% da los siguientes resultados:

	Valor de p
Ti-CPTES vs. Ti-CPTES-KGGGRGDS	0,000
Ti-CPTES vs. Ti-CPTES-KGRGDS	0,001
Ti-CPTES-KGGGRGDS vs Ti-CPTES-KGRGDS	0,198
Ti-CPTES-KGGGRGDS vs Ti-CPTES-KGRDGS	0,002
Ti-CPTES-KGRGDS vs Ti-CPTES-KGRDGS	0,034
Ti-CPTES-KGGGRGDS vs. Ti-KGGGRGDS	0,114
Ti-CPTES-KGRGDS vs. Ti-KGRGDS	0,041

Tabla 4.16.- Valores de p respecto al número de las células estudiadas.

Para medir el área de las células y así poder comparar cómo éstas están extendidas se ha utilizado el software Image J. Para ello han sido necesarias diversas fotografías a veinte aumentos.

	Área de las células (cm <sup>2</sup> )
Ti	661,02 ± 170,59
Ti-CPTES	426,82 ± 209,70
Ti-CPTES-KGRGDS	770,39 ± 248,05
Ti-CPTES-KGGGRGDS	927,57 ± 333,33
Ti-CPTES-KGRDGS	475,29 ± 121,10
Ti-KGRGDS	550,16 ± 161,95
Ti-KGGGRGDS	598,39 ± 180,83

Tabla 4.17.- Área de las células de las muestras de estudio.





Existe una mayor extensión de las células en las muestras silanizadas y sumergidas con los péptidos a donde está presente el grupo RGD.

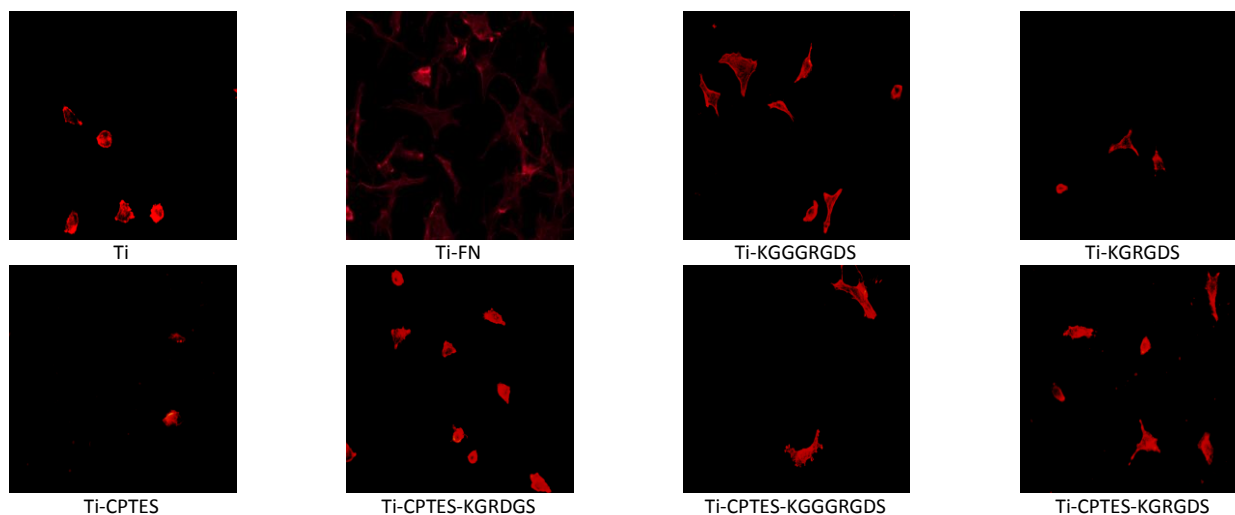


Figura 4.14.- Área de células según el tratamiento realizado sobre la superficie de titanio.

Al realizar el análisis de varianzas se ha podido determinar en qué situaciones existen diferencias significativas y en cuáles no.

	Valor de p
Ti-CPTES vs. Ti-CPTES-KGGGRGDS	0,021
Ti-CPTES vs. Ti-CPTES-KGRGDS	0,028
Ti-CPTES vs. Ti-CPTES-KGRDGS	0,557
Ti-CPTES-KGGGRGDS vs Ti-CPTES-KGRGDS	0.068
Ti-CPTES-KGGGRGDS vs Ti-CPTES-KGRDGS	0,00
Ti-CPTES-KGRGDS vs Ti-CPTES-KGRDGS	0,00
Ti-CPTES-KGGGRGDS vs. Ti- KGGGRGDS	0,00
Ti-CPTES-KGRGDS vs. Ti -KGRGDS	0,00

Tabla 4.18.- Valores de p respecto al área de las células estudiadas.





# CAPÍTULO 5

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1.- INTERFEROMETRÍA DE MUESTRAS PULIDAS MANUAL Y AUTOMÁTICAMENTE

Al pulir manualmente se obtiene una menor rugosidad sobre la muestra que al pulir automáticamente. En cambio, la desviación de picos es mayor siendo la principal causa la falta de control en el pulido manual, es decir, existen errores por parte del pulidor.

En cualquiera de las dos técnicas de pulido aparece un predominio de valles sobre picos pudiendo interferir en los procesos posteriores. Por ello, en este caso es más aconsejable la utilización del pulido automático.

Uno de los valores importantes de estudio es el dado por Kurtosis ya que nos da una idea de la distribución de picos y valles sobre la superficie. Los valores obtenidos, independientemente de la técnica de pulido realizada, son mucho mayores que tres dejando patente una no uniformidad de picos sobre la muestra de titanio. Dicho resultado era de esperar ya que no se ha procedido a realizar ninguna textura en el material.

Por lo que al índice de área hace referencia, en los dos casos los valores son realmente similares no declinándose cuál de los dos procesos es mejor. Además aparecen picos altos de color rojo en ambas técnicas siendo debidos a la presencia de agua dentro de los valles. Así, al reflejarse el haz de luz éstos aparecen.

No se observan diferencias estadísticamente hablando por el hecho de utilizar el pulido manual o automático a excepción del parámetro de Kurtosis. Este hecho no es importante ya que sobre el material no se intenta realizar ningún tipo de textura y ambos valores superan con creces el valor 3. Por lo que al tiempo de pulido hace referencia es más eficiente el pulido automático.

### 5.2.- ELECCIÓN DEL SILANO

#### 5.2.1.- FLUORESCENCIA

Ha sido posible observar fluorescencia en las muestras silanizadas verificando de esta manera que ambos silanos son capaces de enlazarse con el péptido.

En el caso de utilizar CPTES (muestra de titanio-CPTES-péptido(carbonato)) la fluorescencia obtenida presenta una intensidad de 12,93 A sugiriendo de esta manera la formación de un enlace covalente entre el péptido y el



CPTES. Al compararlo con su control (muestra de titanio-péptido(carbonato)) la intensidad obtenida corresponde a 4,92 A siendo similar a la obtenida con el titanio limpio, 5,05 A. Dicho resultado puede llevar a pensar la no presencia del péptido de una manera covalente sobre la superficie de titanio al no silanizarse éste previamente.

Tanto en la muestra de titanio-péptido(PBS) como en la de titanio-GPTES-péptido(PBS) se ha observado fluorescencia. En el primer caso como consecuencia de estar trabajando a un pH 7 se ha formado un enlace iónico, es decir, la amina se ha cargado positivamente y la superficie del titanio negativamente haciendo posible dicho enlace. En la muestra con GPTES la fluorescencia es debida tanto al enlace covalente entre el GPTES y el péptido como al enlace iónico entre la amina del péptido y la superficie de titanio.

Al comparar la fluorescencia de ambos silanos se observa una mayor intensidad al utilizarse el GPTES correspondiendo a 15,80 A para el GPTES y 12,93 A para el CPTES. No obstante en la utilización del GPTES está la duda de la existencia de los dos tipos de enlaces, el iónico y el covalente.

### 5.2.2.- ToF-SIMS

Tanto el titanio limpio como la muestra de titanio sumergida durante 14 horas en la solución de 2,2,2-trifluoroetilamia contienen la misma cantidad de 2,2,2-trifluoroetilamia lo cual sugiere pensar que la cantidad de 2,2,2-trifluoroetilamia obtenida en la muestra de titanio-plasma-CPTES-péptido(carbonato) es debido únicamente al enlace covalente formado entre la 2,2,2-trifluoroetilamina y el CPTES.

La muestra de titanio-plasma-GPTES-F(PBS) posee el mayor ratio de F/OH. No obstante la muestra de titanio-F(PBS) presenta un ratio de F/OH elevado lo cual puede ser debido a la presencia de un enlace iónico como sucedió en el ensayo anterior de fluorescencia. Este hecho deja la duda si la cantidad de F procedente de la muestra de titanio tratado con GPTES es debido únicamente al enlace covalente entre la 2,2,2-trifluoroetilamina y el CPTES o también ha interferido el enlace iónico entre 2,2,2-trifluoroetilamina y el titanio.

Una vez han sido analizados los resultados del ensayo de fluorescencia y de ToF-SIMS se ha decidido seguir avanzando en el proyecto usando como silano el CPTES. Esto es así debido a la no presencia de dudas en el origen del enlace formado entre el titanio y el silano.

## 5.3.- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN

### 5.3.1.- ÁNGULO DE CONTACTO

Tanto en el titanio sometido a piraña como al plasma cleaning aparece un aumento en el comportamiento hidrofílico del titanio por lo que ambos procesos añaden a la superficie de la muestra grupos -OH como era de esperar. No obstante no puede ser afirmado que el proceso de plasma aporte una mayor hidrofiliidad a la



muestra ya que en ambos casos la rugosidad es diferente pudiendo influir en el comportamiento. Dicho aspecto es estudiado en el apartado 5.3.3.

Al realizarse la silanización sobre la muestra de titanio-plasma-pirafña y sobre la muestra de titanio-pirafña-plasma no se han obtenido diferencias significativas entre los ángulos de contacto obtenidos. Lo comentado concuerda con lo esperado ya que el proceso de pirafña es muy agresivo y ataca completamente la superficie de la muestra eliminando los posibles grupos -OH que pudieran haber sido introducidos anteriormente mediante el plasma cleaning. En cualquiera de las muestras silanizadas el valor del ángulo de contacto es mayor que en el titanio limpio apareciendo diferencias significativas estadísticamente hablando. Por ello se puede suponer la presencia de silano sobre la superficie.

Las muestras de titanio-plasma y titanio-pirafña presentan grandes diferencias entre los valores del ángulo de contacto obtenidos siendo estadísticamente diferentes. Ello es debido al aumento de la rugosidad de la superficie producida por la reacción de pirafña.

Los resultados obtenidos junto con su discusión afirman que tanto el plasma cleaning como el proceso de pirafña aumentan la hidrofiliidad del titanio mediante la inserción de grupos -OH sobre su superficie. No obstante no puede afirmarse cuál de los dos es mejor proceso hasta que no sea estudiada la influencia de la rugosidad sobre el comportamiento de la muestra. Por otro lado es asegurada una correcta silanización del titanio debido al aumento de su ángulo de contacto tanto en el tratamiento por plasma como por pirafña.

### **5.3.2.- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAFÑA**

La rugosidad aportada por la reacción de pirafña es muy elevada hasta tal punto que los límites de grano son descubiertos en la superficie. Supera con creces la rugosidad final obtenida con el pulido manual y automático.

### **5.3.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO**

En ambos casos se sugiere que un aumento de la rugosidad sobre la superficie aumenta el carácter hidrofóbico o hidrofílico que posee el material. Por ello, al ser ambos compuestos considerados hidrofóbicos aunque el oro lo es menos que el PDMS, el ángulo de contacto es mayor a mayor rugosidad posee la muestra.

### **5.3.4.- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN**

Debido a la presencia del pico de masa molecular de 35/37 que corresponde al átomo de Cl puede confirmarse la presencia de silano en todas las muestras. Muchos de los otros picos obtenidos también forman parte del silano ya que hacen referencia a los carbonos no reactivos enlazado a los respectivos hidrógenos. Finalmente una pequeña parte de picos corresponden a contaminantes procedentes del agua, del aire etc. siendo mayor la presencia de éstos en el plasma cleaning que en la muestra sometida a la reacción de pirafña. Esto es debido a que la reacción de pirafña es muy agresiva atacando incluso a la superficie de la muestra por lo que los posibles



contaminantes que puedan existir son eliminados.

La muestra tratada con piraña presenta un ratio de Cl/OH mayor que la tratada con plasma cleaning ya que al aumentar la rugosidad de la pieza aumenta su superficie teniendo más posibilidad el silano de reaccionar con el titanio y de ahí mayor ratio de Cl/OH..

Como consecuencia que un aumento de la rugosidad aumenta el carácter presentado por el material se ha optado a eliminar la reacción de piraña del protocolo y reducir así las variables del sistema.

### **5.3.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SILANIZACIÓN POR XPS**

La presencia de cloro en las muestras silanizadas deja de manifiesto de que el protocolo de silanización utilizado es el adecuado. Sea cual sea el tiempo durante el cual se ha dejado sumergida la muestra en carbonato de sodio no influye en la presencia de cloro en la muestra. No obstante existe una diferencia entre la muestra sumergida durante 12 horas y las sumergidas a tiempos de 0 y 24 horas. Esto es debido a que en un mismo proceso de silanización dependiendo de la muestra de estudio pueden existir rendimientos diferentes. Dicho fenómeno aparece como consecuencia de diferentes rugosidades superficiales entre los discos lo cual hace variar la cantidad de silanos presentes en la superficie tal y como ya ha sido discutido en los apartados anteriores.

### **5.4.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING**

La representación anterior deja plasmado un aumento potencial del ángulo de contacto a medida que pasa el tiempo. En otras palabras, los grupos hidroxilos de la superficie del titanio son reactivos con el paso del tiempo la cual cosa ha llevado a tomar precauciones a la hora de silanizar. Así pues, una vez las probetas son sometidas al plasma cleaning se introducen en un erlenmyer para poder guardarlas en atmósfera inerte (en este caso de argón) y así evitar las pérdidas de hidróxido no deseadas.

### **5.5.- ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA**

A medida que aumenta la concentración de péptido absorbido aumenta el valor de absorbancia. Esto demuestra que el péptido está disuelto en agua. Además la variación de coloración observada en los pocillos demuestra también que el péptido está disuelto ya que a medida que la concentración aumenta el color obtenido es más oscuro alejándose del color verdoso característico del BCA.

Puede llevarse a cabo la solubilización del péptido con medios polares. No obstante es necesario un medio básico para que la amina esté protonada y así interaccione con el silano de manera eficaz.



## 5.6.- ESTUDIO DE LA UNIÓN PÉPTIDO-SILANO

### 5.6.1.- FLUORESCENCIA

En todos los casos en que las muestras no han sido silanizadas existe una menor fluorescencia que en las muestras silanizadas de manera que en estos casos se supone que el enlace covalente no se ha producido existiendo una simple adsorción del péptido sobre el titanio.

A la hora de captar las imágenes se han utilizado dos aumentos diferentes, 10 y 20. A 10 aumentos los resultados calculados para la intensidad de fluorescencia son más homogéneos que a 20 aumentos. La causa de dicho comportamiento es la representatividad de la superficie, es decir, a 10 aumentos es captada una mayor superficie pudiendo obtener tanto las zonas con menor como con mayor fluorescencia. En cambio, a 20 aumentos son fotografiadas las zonas con menor fluorescencia o con mayor fluorescencia. Por ello el análisis de resultados se ha llevado a cabo con los datos obtenidos de las imágenes a 10 aumentos.

Al observar los resultados puede observarse que a medida que pasa el tiempo aumenta la fluorescencia pudiéndose deber además del enlace covalente a la adsorción del péptido. No obstante el aumento es mínimo a partir de las 5 horas por lo que para asegurar una buena unión silano-péptido se dejará la muestra sumergida en la solución de péptido durante 14 horas aproximadamente.

### 5.6.2.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA UNIÓN PÉPTIDO-CPTES POR XPS

El mayor ratio de N/Ti aparece en el titanio silanizado y sumergido durante 14 horas en la solución de péptido. Además el titanio limpio y el titanio sumergido durante 14 horas en la solución de péptido presentan los mismos valores de ratio N/Ti lo cual hace pensar que el péptido adsorbido ha sido eliminado de la superficie del titanio y que la cantidad de nitrógeno obtenido en la muestra silanizada y sumergida en el péptido puede ser debida a la presencia del enlace covalente entre el péptido y el silano.

El titanio silanizado es el que presenta menor valor de nitrógeno lo cual es lógico ya que no se ha puesto en contacto con el péptido en ningún momento. El valor que aporta puede ser debido a contaminación.

### 5.6.3.- ESTABILIDAD DE LA UNIÓN DEL PÉPTIDO SILANO POR ULTRASONIDOS

Existe una elevada diferencia entre la intensidad de la muestra antes y después de ser sonicadas durante 20 minutos en el ultrasonidos. Ello puede ser debido a que el péptido que pudiera haber estado adsorbido ha sido eliminado disminuyendo como consecuencia la intensidad de la fluorescencia de la muestra. No es de esperar que la pérdida de fluorescencia sea debida a la rotura del enlace titanio-CPTES ya que su estabilidad ha sido estudiada en el apartado 3 dando como resultado una buena estabilidad. Además es difícil que la pérdida de fluorescencia sea debida a la degradación del enlace péptido-CPTES ya que los resultados de XPS demuestran



su presencia y por una simple sonicación un enlace covalente no se deteriora.

## 5.7.- ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Este ensayo aporta dos clases de resultados a analizar de manera separada:

### 1.- Número de células:

Las probetas silanizadas y sumergidas durante toda la noche en las soluciones de **KGRGDS** y **KGGGRGDS** son las muestras que presentan mayor número de células fijadas. Existe la curiosidad de la fijación de un mayor número de células al utilizar el péptido **KGRGDS** lo cual es lo contrario de lo esperado ya que a mayor longitud de la cadena peptídica, la secuencia RGD se encuentra más alejada de la superficie de titanio y por lo tanto menor impedimento estérico existe. Por ello las células poseen una mejor accesibilidad sobre dicha secuencia teniendo que darse la adhesión con mayor facilidad. No obstante no ha sido así pudiendo ser las causas:

- Se ha introducido un mayor número de células en el pocillo de la célula tratada con **KGRGDS** a la hora de producirse la adhesión celular.
- Ha habido algún error durante el proceso de fijación de las células.
- Al ser el péptido más pequeño posee mayor capacidad de enlazarse con más grupos silanos evitando el contacto CPTES-célula.

Por lo contrario, al realizarse el estudio estadístico de los resultados no se han encontrado diferencias significativas.

Por otro lado, el titanio limpio tiene mayor capacidad de adhesión que el titanio silanizado. Esto deja de manifiesto que el silano no es compatible con la adhesión celular y sugiriendo una buena efectividad del péptido cuando la pieza ha sido silanizada previamente.

La unión covalente entre el péptido y el CPTES mejoran la adhesión del titanio ya que el número de células adheridas en este caso es superior al tratarse de titanio con péptido únicamente adsorbido. Otro factor a tener en cuenta es la secuencia RGD ya que al utilizar la secuencia RDG la adhesión celular es menor. Esto afirma la base de partida la cual considera que la célula se une al péptido mediante las integrinas las cuales son capaces de leer únicamente la secuencia RGD.

### 2.- Área de las células:

Se sigue el mismo comportamiento que el observado en el recuento de células a diferencia que en este caso el área de las células es mayor en el titanio silanizado y sumergido en el péptido **KGGGRGDS** que utilizando como péptido el **KGRGDS**. El utilizar como nexo de unión del titanio y la célula el conjunto CPTES-RGD se obtiene una mejora tanto en el número de células adheridas al implante como en su extensión sobre éste.





# CAPÍTULO 6

## CONCLUSIONES

---

Una vez analizados y discutidos los resultados se concluye que:

- Se ha desarrollado un nuevo proceso de biofuncionalización utilizando un nuevo silano, el CPTES, el cual no se había utilizado anteriormente en la inmovilización de biomoléculas.

Otras conclusiones alcanzadas:

- La reacción de piraña aumenta considerablemente la rugosidad de la muestra influyendo ésta en las medidas del ángulo de contacto. A mayor rugosidad se intensifica el comportamiento hidrofóbico o hidrofílico del material de estudio.
- La violencia de la reacción de piraña es tal que cualquier proceso anterior a ésta es eliminado pudiendo incluso revelando los límites de grano en la superficie de la muestra.
- Los ensayos realizados con las técnicas de XPS, ToF-SIMS y fluorescencia permiten inferir la presencia del enlace covalente entre el titanio y el CPTES y entre el CPTES y el péptido.
- En el ensayo celular se ha podido demostrar una mayor adhesión celular, tanto en número como en expansión de las células, en las muestras silanizadas y sumergidas durante toda la noche en soluciones de KGRGDS y KGGGRGDS. Entre ambos péptidos, por lo que en número de células hace referencia no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. En cambio, la expansión de las células sobre la superficie del titanio es mayor en el caso de usar la solución de KGGGRGDS. Este comportamiento puede ser debido a que la cadena de tres glicinas previa al motivo RGD de adhesión celular en el péptido KGGGRGDS provoca una mayor accesibilidad de estos péptidos para interactuar con las integrinas de las células osteoblásticas.





# AGRADECIMIENTOS

---

A mi tutor, Dr. Daniel Rodríguez por la confianza depositada y por darme vía libre en todas las decisiones tomadas. Por esa libertad de trabajo tan necesaria para mí en la realización del proyecto.

Especialmente a Pablo Sevilla, mi guía en todo este camino realizado. Por esos momentos vividos, de suma desesperación como de total euforia. Esos conocimientos enseñados y por esa confianza y paciencia absoluta.

A Emiliano Salvagni por compartir su experiencia en la biofuncionalización y responder en todo momento a las preguntas realizadas. Por ese mes de junio que no perdió la sonrisa en ningún momento en la que fue requerida su ayuda.

A los compañeros del laboratorio de Biomateriales de la Universidad Politécnica de Cataluña (Luís, Natalia, Virginia, Marta P, Marta G, Hortensia...) por los momentos de diversión y la ayuda prestada cuando ha sido necesaria.

A los compañeros del grupo de investigación IBEC (Xavi, Laura, Tiziano, Miguel...) por hacer más a meno las horas de silanización y la utilización de los equipos sin poner en duda mi profesionalidad.

A los compañeros de la Plataforma de Nanotecnología del Parc Científic de Barcelona (Marina, Sam, Sergi) por aceptarme como uno más haciendo más llevaderas las interminables horas pasadas en el ángulo de contacto.

A mis padres por convertir esos momentos críticos en momentos divertidos y hacerme ver en todo momento el lado bueno de las cosas. A ese apoyo incondicional mostrado.

A mis amigos (Noemí, Mari, Heura, Pilar, Raul y Pablo) por reírse conmigo enfrente de las dificultades y celebrar las alegrías.

Gracias a todos.





# BIBLIOGRAFÍA

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C, APARICIO. *Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales*. Universidad Politécnica de Cataluña, Departamento de Biomateriales, 2004, Cap. 2.
- [2] F.E. GARCÍA COSTALES, J.M. CUESTOS MEJIDO. *Recubrimientos de proyección por plasma*. Universidad de Oviedo, Departamento de Construcción e Ingeniería de Fabricación, 2001.
- [3] PABLO SEVILLA. *Superficies de titanio biofuncionalizadas para la reparación y regeneración ósea*. Propuesta de tesis, ETSEIB, 2004.
- [4] J.E., LEMONS. *Biomaterials for dental surgical implants*. *Materials Technology*. Vol 8(1.2), 1993, p. 22-25.
- [5] S, MARTÍNEZ-VILLALOBOS CASTILLO. *Osteosíntesis maxilofacial con titanio*. *Revista Española Cirugía Oral y Maxilofacial*. Vol. 26(6), 2004, p. 351-368.
- [6] JONATHAN BLACK, GARTH HASTING. *Handbook of Biomaterial Properties*. Ediciones Chapman and Hall, 1998, p.135.
- [7] F.J. GIL, M.P. GINEBRA, J.A. PLANELL. *Metales y aleaciones para la sustitución de tejidos duros*. *Biomecánica*. Vol VII (13), 1999, p. 73-78.
- [8] LUIS M. DELGADO GAROÑA. *Estudio de biomateriales para la aplicación en regeneración de tejido nervioso*. Universidad Politécnica de Cataluña, Departamento de Biomateriales.
- [9] H. BREME. *Metals as Biomaterials*. *Biomaterials Science and Engineering Series*. Ediciones Wiley and Sons, 1998.
- [10] D.F.WILLIAMS. *Biocompatibility of implant materials*. London, Sector Publishing Limited, 1976.
- [11] J.B. PARK. *Biomaterials Science and Engineering*. Ediciones Plenum Press, 1984, p. 171-192.
- [12] MARÍA ARROYO HERNÁNDEZ. *Biofuncionalización de superficies de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso*. Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Física Aplicada, 2006.
- [13] DOW CORNING. *A guide to silane solutions*. *Anti-Corrosion Methods and Materials*. Vol 52(6), 2005.
- [14] ALEX VALADEZ GONZALEZ. *Efecto del tratamiento superficial de fibras de henequén sobre la resistencia interfacial fibra-matriz y en las propiedades efectivas de materiales compuestos termoplásticos*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa División de Ciencias Básicas e Ingeniería, México, 1999, Cap. 1.
- [15] MATHEWS VAN HODE AHERN. *Bioquímica*. Ediciones Wesley, 2002, Cap. 5, p.141-165.
- [16] MARC MAILLET. *Histología e histofisiología humanas, 3 tejidos de Sostén*. Madrid, Editorial AC, 1980.



- [17] J. POIRIER. *Cuadernos de histología*. Editorial Marban, 1985.
- [18] MARY C. BECKERLE. *Cell Adhesion*. Oxford University Press, 2001, Cap 4, p. 100-125.
- [19] General Plasma Information. Harrick Plasma Company. [<http://www.harrickplasma.com/>, 12 de diciembre del 2008]
- [20] M. BUTLER. *Animal Cell Culture and technology*. Ediciones The Basics, 2004, Cap. 2 y 5, p.11-26 y p.47-66.
- [21] Telómeros, Telomerasa, Cáncer y Envejecimiento. [[www.colegiomicrobiologoscr.org/Revista/2001-0%20Tel%F3meros.doc](http://www.colegiomicrobiologoscr.org/Revista/2001-0%20Tel%F3meros.doc), 25 de Junio del 2009]
- [22] STOUT. *Application of 3-D topography to bio-engineering. International journal of Mach. Tools manufacturing*. Vol. 35(2), 1995, p.219-229.
- [23] DOUGLAS A.SKOOG, DONALD M.WEST, F. JAMES HOLLER. *Fundamentos de Química Analítica: Espectroscopia de fluorescencia molecular*. p. 603-612
- [24] WYANT JC. *White Light Interferometry*. Optical Sciences Center, University of Arizona, Tucson, AZ 85721
- [25] MARCO MORRA, CLARA CASSINELLI. *Bacterial adhesion to polymer surfaces: A critical review of surfaces thermodynamic approaches. Journal of Biomaterial Science*. Vol 9(1), 1998, p.55-74.
- [26] Contact angle measurement a theoretical approach. [[http://www.kruss.info/index.php?content=http://www.kruss.info/techniques/surface\\_tension\\_e.html](http://www.kruss.info/index.php?content=http://www.kruss.info/techniques/surface_tension_e.html), 12 de Marzo del 2009]
- [27] ToF-SIMS Introducción, Universidad de Vigo. [<http://webs.uvigo.es/cactiweb/ToF-SIMS.pdf>, 17 de Marzo del 2009]
- [28] ToF-SIMS, Parc Científic de Barcelona. [[http://www.pcb.ub.es/homepcb/docs/pdf/TOFSIMS\\_PCB.pdf](http://www.pcb.ub.es/homepcb/docs/pdf/TOFSIMS_PCB.pdf), 17 de Marzo del 2009]
- [29] Tema 5. Estructura y aplicaciones de los polímeros. Ciencia de Materiales, 4º curso, 2004/2005. [[http://webdeptos.uma.es/qicm/Doc\\_docencia/Tema5\\_CM.pdf](http://webdeptos.uma.es/qicm/Doc_docencia/Tema5_CM.pdf), 5 de Marzo del 2009]
- [30] Evaporación térmica por calentamiento mediante haz de electrones [[http://www.icmm.csic.es/fis/espa/evaporacion\\_electrones.html#esquema](http://www.icmm.csic.es/fis/espa/evaporacion_electrones.html#esquema), 20 de Marzo del 2009]
- [31] Instructions BCA™ Protein Assay Kit.
- [32] SATOSHI TAKEDAS, MAKOTO FUKAWA. *Role of surface OH groups in surface chemical properties of metal oxide films*. Material Science and Engineerin B. Vol 119 (3), 2005, p.265-267.

## BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- C, APARICIO. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. Universidad Politécnica de Cataluña, Departamento de Biomateriales, 2004.
- DOW CORNING. *A guide to silane solutions. Anti-Corrosion Methods and Materials*. Vol 52(6), 2005.



- MATHEWS VAN HODE AHERN. *Bioquímica*. Ediciones Wesley, 2002.
- M.BUTLER. *Animal Cell Culture and technology*. Ediciones The Basics, 2004.







# ANEXO A

## IMPACTO ECONÓMICO

En el actual capítulo se agrupan los costes del proyecto principalmente por estudio realizado pudiendo englobar varios ensayos. En éstos son considerados los reactivos específicos, los equipos utilizados y el personal necesario para llevarlo a cabo.

Se ha elaborado una tabla la cual engloba el material básico tanto del laboratorio como de oficina además de otras actividades como es la formación del problema entre muchas otras.

Las tablas correspondientes a la materia prima, el pulido y la limpieza de las muestras contabilizado el utilizado durante todo el proyecto por lo que no se vuelve a contabilizar en ningún otro apartado.

Los costes del personal se han calculado según el precio por hora, considerando que el coste de un ingeniero junior es de 20 €/h (es considerado el sueldo junto con la cuota patronal)

EL valor de los reactivos utilizados viene dado en €/volumen o €/masa según sea el estado del producto líquido o sólido una vez ha sido comprado.

A continuación se presentan las tablas con los costes del proyecto detallados.

### Materia Prima

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
Barra de titanio de metro y medio de longitud y 10 mm de ancho	0,5 ud.	368,45 €/barra	184,23
<b>Coste total asociado a la materia prima</b>			<b>184,23</b>

Tabla A.1.- Costes asociados a la materia prima sin I.V.A.



## Preparación de Muestras

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
Disco abrasivo de carburo de silicio de 23 cm de diámetro	1 ud.	25,70 €/ud.	25,70
Disco de polvo de diamante de 125 mm de diámetro y 0,4 m de espesor.	1 ud.	248,67 €/ud.	248,67
Paños de carburo de silicio de 200 mm de diámetro:			
P240	1 ud.	4,04 €/ud.	4,04
P400	1 ud.	4,04 €/ud.	4,04
P600	1 ud.	4,04 €/ud.	4,04
P1200	1 ud.	9,37 €/ud.	9,37
Paños de carburo de silicio de 305 mm de diámetro:			
P240	4 uds.	14,75 €/ud.	59,00
P400	4 uds.	14,75 €/ud.	59,00
P600	4 uds.	14,75 €/ud.	59,00
P1200	4 uds.	17,9 €/ud.	71,60
P4000	4 uds.	17,9 €/ud.	71,60
Paño de terciopelo de 200 mm	1 ud.	16,1 €/ud.	16,10
Paños de terciopelo de 305 mm	4 uds.	37,82 €/ud.	151,28
Sílica coloidal	½ L	161 €/L	80,50
Solución 50% HNO <sub>3</sub> + 50 % NH <sub>4</sub> HF <sub>2</sub>	0,2 L	60 €/L	12,00
Superglue	3 uds.	3'65 €/ud.	10,95
<b>Equipo</b>			
Cortadora refrigerada Leco CM-12	20 min	15 €/h	5,00
Esmeriladora Formis 1CV	5 min	5 €/h	0,41
Cortadora Struers Accutom-50	30 h	20 €/h	600,00
Pulidora automática Buehler	60 h	30 €/h	1800,00
Pulidora manual Struers	24 h	20 €/h	480,00
<b>Personal</b>			
Corte del cilindro a segmentos	20 min	20 €/h	6,67
Corte a discos de 2 mm de grosor	30 h	20 €/h	600,00
Pulido manual	24 h	20 €/h	480,00
Pulido automático	60 h	20 €/h	1200,00
<b>Coste total asociado a la preparación de las muestras</b>			<b>6058,97</b>

Tabla A.2.- Costes asociados a la preparación de las muestras sin I.V.A.



**Limpieza de las muestras**

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
Hidróxido de sodio	10 g	16,30 €/Kg.	0,163
Acetona	1 L	16,65 €/L	16,65
Etanol	0,5 L	25,5 €/L	12,75
Ciclohexano	0,5 L	37,21 €/L	18,61
Isopropanol	0,5 L	23,29 €/L	11,65
<b>Personal</b>			
Limpieza de muestras	25 h	20 €/h	500,00
<b>Coste total asociado a la limpieza de las muestras</b>			559,82

Tabla A.3.- Costes asociados a la limpieza de las muestras sin I.V.A.

**Interferometría de las muestras pulidas manual y automáticamente**

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Equipo</b>			
Interferómetro	2 h	21,08 €/h	42,16
<b>Personal</b>			
Interferometría	2 h	20 €/h	40,00
Análisis de los resultados de interferometría	3 h	20 €/h	60,00
<b>Coste total asociado a la interferometría de las muestras pulidas manual y automáticamente</b>			142,16

Tabla A.4.- Costes asociados a la interferometría de las muestras pulidas manual y automáticamente sin I.V.A.



## Elección del silano

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
CPTES	1,95 ml	28,30 €/100ml	0,55
GPTES	1,95 ml	40,90 €/100ml	0,80
DIEA	0,975 ml	42,64 €/100ml	0,42
Pentano	10,2 ml	90,77 €/L	0,93
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,2 g	125,24 €/Kg.	0,15
PBS	1 tableta	136 €/100 tabletas	1,36
Etanol	200 ml	25,5 €/L	5,10
Isopropanol	200 ml	23,29 €/L	4,66
Acetona	200 ml	16,65 €/L	3,33
Péptido fluorescente	0,135 mg	41 €/mg	5,55
2,2,2-trifluoroetilamina	0,05 g	99,10 €/10g	0,50
<b>Equipo</b>			
Plasma cleaning Harrick	15 min	5,74 €/h	1,44
Microscopio de fluorescencia Nikon E600	3 h	60 €/h	180,00
<b>Personal</b>			
Preparación de las muestras	5 h	20 €/h	100,00
Microscopio de fluorescencia	3 h	20 €/h	60,00
Técnico de ToF-SIMS	Está incluido en el precio del ensayo		
Análisis de resultados	4 h	20 €/h	80,00
<b>Coste total asociado a la elección del silano</b>			<b>444,79</b>

Tabla A.5.- Costes asociados a la elección del silano sin I.V.A.



## Evaluación de las técnicas de silanización

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
CPTES	3,75 ml	28,30 €/100ml	1,06
DIEA	1,88 ml	42,64 €/100ml	0,80
Pentano	21,25 ml	90,77 €/L	1,93
Etanol	420 ml	25,5 €/L	10,71
Isopropanol	420 ml	23,29 €/L	9,78
Acetona	420 ml	16,65 €/L	6,99
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 ml	57,86 €/L	2,31
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 ml	142,52€/L	5,70
PDMS	1 g	2€/10g	0,20
Crosslinker	Está incluido en el precio del PDMS		
<b>Equipo</b>			
Plasma cleaning Harrick	45 min	5,74 €/h	4,31
ToF-SIMS	2 muestras	49 €/muestra	98,00
Interferómetro WYKO NT 1100	2 h	21,08 €/h	42,16
Horno	30 min	20 €/h	10,00
Univex 450 de la marca Leybold	3 h	25,38 €/h	76,14
Granallado	2 muestras	2 €/muestra	4,00
XPS	4 muestras	100 €/muestra	400,00
<b>Personal</b>			
Preparación de las muestras	10 h	20 €/h	200,00
Ángulo de contacto	3 h 30 min	20 €/h	70,00
Interferometría	1 h	20 €/h	20,00
Preparación de réplicas de PDMS	1h 30 min	20 €/h	30,00
Preparación de réplicas de oro	1 h	20 €/h	20,00
TOF SIMS	Está incluido en el precio del equipo		
XPS	Está incluido en el precio del equipo		
Técnico de la máquina Univex 450	Está incluido en el precio del equipo		
Técnico de laboratorio	15 min	20 €/h	15,00
Análisis de resultados	5 h	20 €/h	100,00
<b>Coste total asociado a la evaluación de las técnicas de silanización</b>			<b>1129,09</b>

Tabla A.6.- Costes asociados a la evaluación de las técnicas de silanización sin I.V.A.



**Estudio de la estabilidad de los grupos -OH insertados por plasma cleaning**

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Equipo</b>			
Plasma cleaning Harrick	15 min	5,74 €/h	1,44
<b>Personal</b>			
Plasma cleaning	15 min	20 €/h	5,00
Ángulo de contacto	5 h	20 €/h	100,00
Análisis de resultados	1 h	20 €/h	20,00
<b>Coste total asociado al estudio de la estabilidad de los grupos –OH insertados por plasma cleaning</b>			<b>126,44</b>

Tabla A.7.- Costes asociados al estudio de la estabilidad de los grupos –OH insertados por plasma cleaning sin I.V.A.

**Ensayo de colorimetría con BCA**

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
KGRGD	1,80 mg	40 €/mg	72,00
Kit colorimétrico BCA	1 kit	134,23 €/kit	134,23
<b>Equipo</b>			
Espectrofotómetro	10 min	7,64 €/h	1,27
<b>Personal</b>			
Ensayo de colorimetría con BCA	3 h	20 €/h	60,00
Absorbancia	15 min	20 €/h	0,50
Análisis de resultados	1 h	20 €/h	20,00
<b>Costes totales asociados al ensayo de colorimetría con BCA</b>			<b>288,00</b>

Tabla A.8.- Costes asociados al ensayo de colorimetría con BCA sin I.V.A.



## Estudio de la unión péptido-silano

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
CPTES	2,1 ml	28,30 €/100 ml	0,60
DIEA	1,05 ml	42,64 €/100 ml	0,43
Pentano	11,9 ml	90,77 €/L	1,08
Etanol	520 ml	25,5 €/L	13,26
Isopropanol	520 ml	23,29 €/L	12,11
Acetona	520 ml	16,65 €/L	8,66
Péptido fluorescente	2,55 mg	41 €/mg	104,55
Péptido KGRGDS	0,506 mg	40 €/mg	20,23
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 g	125,24 €/Kg	0,13
<b>Equipo</b>			
Microscopio de fluorescencia Nikon E600	3 h	60 €/h	180,00
XPS	4 muestras	100 €/muestra	400,00
<b>Personal</b>			
Preparación de las muestras	8 h 30 min	20 €/h	170,00
Microscopía de fluorescencia	4 h	20 €/h	80,00
XPS	Está incluido en el precio del equipo		
Análisis de los resultados	2 h 30 min	20 €/h	50,00
<b>Costes totales asociados al estudio de la unión péptido-silano</b>			<b>1041,05</b>

Tabla A.9.- Costes asociados al estudio de la unión péptido-silano sin I.V.A.



## Adhesión celular

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
CPTES	2,55 ml	28,30 €/100 ml	0,72
DIEA	1,275 ml	42,64 €/100 ml	0,54
Pentano	14,45 ml	90,77 €/L	1,31
Etanol	120 ml	25,5 €/L	3,06
Isopropanol	120 ml	23,29 €/L	2,80
Acetona	120 ml	16,65 €/L	2,00
Péptido KGRGDS	2 mg	40 €/mg	80,00
Péptido KGGGRGDS	2 mg	40 €/mg	80,00
Péptido KGRDGS	2 mg	40 €/mg	80,00
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 g	125,24 €/Kg.	0,13
MG63	1 partida	203 €/partida	203,00
FBS	10 ml	331 €/500 ml	6,63
PBS	1 tableta	136 €/100 tabletas	1,36
Glicina	0,15 g	38,19 €/ 50 g	0,11
BSA	1,2 mg	108,68 €/50 g	2,60
DMEM	48,5 ml	23,50 €/L	1,14
Piruvato de sodio	0,5 ml	10,30 €/100 ml	0,05
L-glutamina	0,5 ml	51,37 €/100 ml	0,26
Penicilina	0,5 ml	13,5 €/ml	6,75
Fibronectina	0,3 ml	127 €/ml	38,10
Tripsina	3 ml	35,50 €/5 ml	21,30
Paraformaldehído	1,52 ml	97,44 €/ 10 ml	14,81
Azida de sodio	25 ml	27,40 €/250 ml	2,74
Tritón	0,025 ml	97 €/ 10 ml	0,24
Anti-FN antibody produced in rabbit (F3648)	0,005 ml	101 €/2 ml	0,25
Hoetscht	0,005 ml	19,40 €/ 10 µl	9,70
Rhodamine phalloidin R415	1 dosis	495 €/300 dosis	1,65
Alexa Fluor 488	0,005 ml	274,82 €/ 100 µl	13,75
Mowiol	1 g	40,90 €/100 g	0,41
FBS	20 ml	85 €/500 ml	3,40
<b>Equipo</b>			
Plasma cleaning	15 min	20 €/h	5,00
Microscopio de fluorescencia Nikon E600	5 h	60 €/h	300,00
Sala de cultivos	1 h	30,39 €/h	30,39
<b>Personal</b>			
Preparación de las muestras	7 h 45 min	20 €/h	155,00
Plasma cleaning	15 min	20 €/h	5,00
Microscopio de fluorescencia	5 h	20 €/h	100,00
Análisis de resultados	3 h	20 €/h	60,00
<b>Costes totales asociados a la adhesión celular</b>			<b>1234,2</b>

Tabla A.10.- Costes asociados a equipos y personal de la adhesión celular sin I.V.A.





## Varios

Conceptos	Cantidad	Precio	Coste (€)
<b>Material</b>			
Material oficina			300,00
Varios de laboratorio*			600,00
Uso de material de laboratorio varios**			1000,00
<b>Personal</b>			
Formación sobre el problema	20 h	20 €/h	400,00
Búsqueda bibliográfica	30 h	20 €/h	600,00
Dedicación de tutores	20 h	90 €/h	1800,00
Dedicación de técnicos y compañeros	70 h	60 €/h	4200,00
Elaboración de la memoria	150 h	20 €/h	3000,00
<b>Coste total asociado a varios</b>			<b>11900,00</b>

\* Guantes, botes de plástico, bolsas de plástico, cajas para guardar muestras, etc.

\*\* Microscopios ópticos, cortadoras, etc.

Tabla A.11.- Costes asociados a varios sin I.V.A.

A continuación se contabiliza el coste sin I.V.A de todo el proceso experimental

Conceptos	Total (€)
Coste total asociado a la materia prima	184,23
Coste total asociado a la preparación de las muestras	6058,97
Coste total asociado a la limpieza de las muestras	559,82
Coste total asociado a la interferometría de las muestras pulidas manual y automáticamente	142,16
Coste total asociado a la elección del silano	444,79
Coste total asociado a la evaluación de las técnicas de silanización	1129,09
Coste total asociado al estudio de la estabilidad de los grupos –OH insertados por plasma cleaning	126,44
Costes totales asociados al ensayo de colorimetría con BCA	288,00
Costes totales asociados al estudio de la unión péptido-silano	1041,05
Costes totales asociados a la adhesión celular	1234,2
Coste total asociado a varios	11900,00
<b>Coste total experimental sin I.V.A</b>	<b>23108,75</b>

Tabla A.12.- Coste total experimental sin I.V.A.



Finalmente se ha calculado el coste total del proyecto con I.V.A.

<b>Conceptos</b>	<b>Total (€)</b>
Coste total experimental	23108,75
Gastos generales (10 % del Coste total experimental)	2310,88
Seguridad e higiene laboral (3 % del Coste total experimental)	693,26
Mermas (10% del Coste total experimental)	2310,88
<b>Subtotal</b>	<b>28423,77</b>
<b>16 % I.V.A</b>	<b>4547,80</b>
<b>TOTAL I.V.A incluido</b>	<b>32971,57</b>

Tabla A.13.- Coste total del proyecto con I.V.A.

El coste total del proyecto asciende a 32972 euros de los cuales 23109 euros corresponden al coste experimental, 2311 euros a gastos generales, 693 euros a seguridad e higiene laboral y 2311 a material desperdiciado (mermas).



# ANEXO B

## IMPACTO MEDIAMBIENTAL

El impacto ambiental del proyecto se ha tenido en cuenta en todo momento intentando de minimizarlo en gran medida. Por ello, muchos de los reactivos utilizados a pesar de ser usados en pequeñas cantidades han sido tratados y utilizados de una manera amigable con el medioambiente.

La legislación actual no permite verter al alcantarillado municipal materias o productos de uso doméstico, industrial, sanitario, tóxico, peligroso o radioactivo. Deben de realizarse una gestión de residuos eficaz que evite su vertido incontrolado.

### B.1.- GESTIÓN DE RESIDUOS

Tanto en el laboratorio de Biomateriales de la Escuela técnica Superior de Ingeniería Industrial como en el laboratorio del grupo IBEC del edificio Hélix del Parc Científic de Barcelona existe un protocolo de gestión de residuos a seguir.

#### B.1.1.- LABORATORIO DE BIOMATERIALES

En el laboratorio de Biomateriales se llevado a cabo tan solo la preparación de las muestras. En dicho centro se trabaja únicamente con residuos químicos los cuales son embasados según su composición existiendo diversos recipientes para su almacenaje. Su localización en el laboratorio es estratégica, encontrándose en puntos cercanos a donde los residuos son utilizados. Dependiendo del residuo a desechar los embases tendrán una capacidad u otra y estarán bien identificados según:

- Residuos ácidos: embase de PP con capacidad de ½ litro de residuos.
- Residuos básicos: embase de PP con capacidad de ½ litro de residuos.
- Residuos sólidos con mercurio: embase de PP con capacidad de 10 litros y boca ancha.
- Agua con mercurio: embase de PP con capacidad de ½ litro de residuos.
- Residuos sólidos sin mercurio: embase de PP con capacidad de 10 litros y boca ancha.
- Residuos sólidos metálicos: embase de PP con capacidad de ½ litro de residuos.
- Residuos sólidos: embase de PP con capacidad de 5 litros y boca ancha.
- Disolventes: embase de PP con capacidad de 10 litros de residuos.

Una vez el recipiente ha sido llenado completamente es almacenado en un armario de seguridad. ECOCAT es una empresa que se dedica a gestionar residuos peligrosos a nivel nacional al igual que su posterior tratamiento siendo ésta la encargada de recoger los residuos generados en el laboratorio cada 6 meses.



### **B.1.2.- LABORATORIO IBEC DEL EDIFICIO HÉLIX DEL PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA**

En el laboratorio del edificio Hélix se han realizado la gran mayoría de ensayos o preparación de éstos. En éste trabajan diferentes grupos de investigación por lo que la cantidad y variabilidad de residuos formados son superiores que en el laboratorio de Biomateriales. Pueden encontrarse tanto residuos químicos como biológico, domésticos como de oficina.

Así pues, según la naturaleza de los residuos su recogida es separada en:

- La basura doméstica se encuentra en papeleras convencionales localizadas a lo largo de pasillos, oficinas y despachos.
- El papel de oficina es recogido diariamente por el personal de limpieza del centro.
- El cartón debe de plegarse y depositarse en los contenedores azules habilitados en los pasillos.
- El plástico debe de depositarse en los contenedores amarillos repartidos en los pasillos.
- El vidrio sin romper se recogen en los contenedores verdes situados en los pasillos.
- Las pilas se recogen en papeleras en formas de pirámides repartidas por los pasillos.
- Los toneles y cartuchos de impresoras serán depositados en las papeleras situadas al lado de las fotocopiadoras y en los pasillos cercanos a los ascensores.
- Los residuos resultantes de la actividad de investigación son clasificados según su naturaleza y el potencial de toxicidad existentes:
  - Disolventes halogenados: productos con un porcentaje de halógenos mayor a un 2% a excepción de los bifenilpolicloratos (PCBs) el cual se recoge por separado.
  - Disolventes no halogenados: líquidos orgánicos que contienen menos de un 2% de halógenos.
  - Soluciones acuosas ácidas: aquellos líquidos solubles en agua con pH ácido. Pueden ser ácidos orgánicos o inorgánicos pero solubles en agua y de concentración baja. Si la concentración es superior al 10% deben de ser neutralizados o solubilizados para ser vertidos en este contenedor.
  - Soluciones acuosas básicas: líquidos de pH básico solubles en agua. Si las bases son concentradas deben de neutralizarse o diluirse.
  - Residuos químicos específicos: productos que por su peligrosidad no pueden incluirse en los grupos anteriores. Se encuentran en este grupo:
    - Peróxidos.
    - Compuestos pirofóricos: magnesio metálico en polvo.
    - Compuestos muy reactivos: cloruros de ácidos, metales alcalinos, compuestos peroxidables.
    - Compuestos muy tóxicos: cianuros, sulfuros.
    - Compuestos no identificados.



- Residuos sólidos de laboratorios químicos: incluye papel impregnado, guantes sucios, vidrio roto, todo el material de rechazo que se produce en el laboratorio y no puede considerarse material doméstico.
- Material punzante y cortante químico o biológico: los recipientes son de pared rígida que se cierran herméticamente. Suelen corresponder a pipetas Pasteur, agujas, portaobjetos, hojas de bisturí, vidrios rotos entre otros.
- Residuos biológicos para esterilizar: corresponden a cultivos celulares, cultivos de microorganismos o muestras de tejidos.
- Residuos biológicos citotóxicos o citostáticos: Requieren precauciones extremas para su gestión ya que se destruyen por incineración controlada. Como ejemplos se encuentran medicamentos antineoplásicos, productos químicos cancerígenos o mutágenos.

La retirada de residuos se realiza por parte del personal del Parc Científic siendo ellos los que se encargan de la gestión. De forma periódica un día fijo a la semana (miércoles) los contenedores llenos son retirados y sustituidos por uso de vacío.

## **B.2.- CONTAMINACIÓN ASOCIADA A LOS MATERIALES EMPLEADOS**

### **B.2.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

En el desbaste de las muestras es prácticamente imposible evitar la pérdida de agua y contaminar el agua residual con las partículas de titanio resultantes del pulido. No obstante se ha de pensar que la cantidad del metal abocado es ínfimo ya que el desbaste tan solo reduce el grosor de la muestra en el orden de algunas micras. Por parte del agua, siempre se ha intentado de consumir la cantidad justa y necesaria.

Para poder conseguir el efecto espejo deseado sobre la superficie de las probetas se ha utilizado sílica coloidal y en el caso del pulido manual también se ha optado por una combinación de ácidos de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ . Ambas soluciones no han podido ser rescatadas una vez han sido utilizadas acabando en el alcantarillado. Es importante decir que las cantidades de ambos productos son pequeñas y debe de comentarse que están altamente diluidas y aún se diluyen más en contacto con el agua utilizada para pulir.

Durante la limpieza de los discos de titanio se utilizan una serie de disolventes que una vez utilizados son vertidos en los recipientes respectivos. En este caso ha correspondido al recipiente de disoluciones situado en el laboratorio de biomateriales.



### **B.2.2.- PROCESO DE SILANIZACIÓN**

El proceso de silanización ha sido el proceso en el cual se han generado mayor cantidad de residuos.

La reacción de piraña genera un residuo altamente peligroso. Justo al finalizar la reacción y extraer la probeta del vaso de precipitados no puede tratarse el residuo directamente ya que la reacción aún sigue teniendo lugar. Así pues es necesario esperar dos días como mínimo a que ésta pierda fuerza. En ese momento al tratarse de una combinación de ácidos altamente concentrada se adhiere agua muy poco a poco para diluirla. Una vez diluida se introduce en el contenedor de soluciones ácidas.

De la silanización en sí se obtiene una mezcla de DIEA-silano-pentano que debido a la presencia del cloro en el silano debe de ser vertida en el recipiente de soluciones halogenadas.

Los disolventes utilizados en la limpieza de las muestras después de la reacción de piraña y una vez silanizadas son depositados en el contenedor de disolventes no halogenados.

### **B.2.3.- FLUORESCENCIA**

El péptido fluorescente está disuelto en carbonato de sodio. Debido a ello y a que el volumen generado es de microlitros es vertido en el recipiente de soluciones básicas.

### **B.2.4.- COLORIMETRÍA CON BCA**

En este caso se ha realizado el estudio en un medio alcalino por lo que la solución es almacenada en el recipiente de soluciones básicas.

## **B.3.- CONTAMINACIÓN ASOCIADA A LAS TÉCNICAS EMPLEADAS**

Principalmente los equipos utilizados han consumido electricidad. Se desconoce la procedencia de ésta por lo que cuantificar su impacto sobre el medioambiente es imposible. De todas maneras se ha intentado consumir la menor cantidad posible.

Durante el proceso de pulido ha habido un consumo de agua abundante ya que la técnica lo precisaba. De todas maneras se ha intentado de consumir lo necesario, no más.

Tanto las técnicas de ToF-SIMS como la de Evaporación térmica han sido realizadas por técnicos especializados. Cumplir las normas dictadas por la legislación a lo que a la gestión de residuos hace referencia han sido satisfechas por la plataforma respectiva.

## **B.4.- OTROS IMPACTOS**

En todo momento ha habido un uso racional de papel evitando impresiones innecesarias.



# ANEXO C

## AMPLIACIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

### C.1.- INTERFEROMETRÍA DE MUESTRAS PULIDAS MANUALMENTE Y AUTOMÁTICAMENTE

Los valores seleccionados en gris son aquellos que han sido eliminados a la hora de realizar la media y la desviación estándar ya que estadísticamente son descartables.

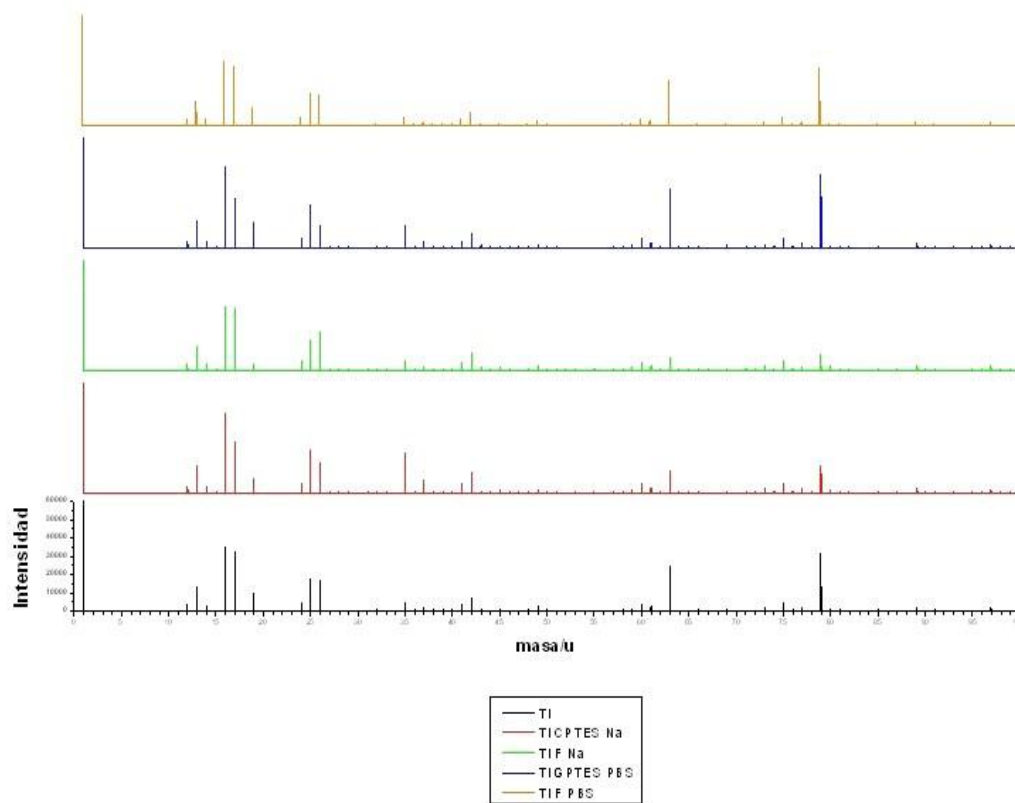
	Sa (nm)	Sq (nm)	Sm (mm <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup> )	Sku	Ssk	SArea Index
Muestra A1	19,97	30,63	1076,81	742,96	-10,89	1,0019
Muestra A2	17,24	25,34	253,54	44,58	-1,08	1,0011
Muestra A3	15,08	19,41	30,23	5,59	-0,11	1,00037
Muestra A4	19,27	25,58	66,28	10,04	0,69	1,00076
Muestra D1	17,19	23,42	227,26	64,88	-1,26	1,0012
Muestra D2	17,76	25,06	349,43	98,82	-2,23	1,0011
Muestra D3	14,93	18,82	64,18	8,07	0,36	1,00061
Muestra D4	18,93	24,76	161,19	24,56	0,37	1,00079
Muestra B1	34,46	50,65	243,12	13,05	1,40	1,00087
Muestra B2	44,63	70,06	215,62	288,66	-7,91	1,0038
Muestra B3	19,72	24,53	38,73	3,33	0,092	1,00047
Muestra B4	19,26	24,25	130,87	10,62	0,23	1,00070
Muestra C1	14,16	19,24	48,07	4,47	0,0024	1,00047
Muestra C2	13,53	52,55	1596,91	2439,61	-41,91	1,0035
Muestra C3	19,50	25,27	132,09	6,95	-0,053	1,0013
Muestra C4	42,56	94,34	2858,55	2335,40	-37,22	1,0052
Media	17,42	23,86	145,42	44,89	-1,46	1,0015
Desviación estándar	2,29	3,34	103,21	78,66	3,53	0,0014
<b>Muestras pulidas automáticamente</b>						
Media	17,54	24,13	164,59	36,65	-1,77	1,0010
Desviación estándar	1,85	3,74	118,19	35,025	3,827	0,00050
<b>Muestras pulidas manualmente</b>						
Media	17,23	23,32	118,58	54,51	-1,04	1,0020
Desviación estándar	3,11	2,76	82,45	114,77	3,41	0,0018

Tabla C.1.- Valores obtenidos por interferometría que detallan la rugosidad de las muestras estudiadas.



## C.2.- SELECCIÓN DEL SILANO

### C.2.1.- ToF-SIMS



Gráfica C.1.- Representación de los picos obtenidos por ToF-SIMS.





<b>Ti-plasma-CP TES-F(carbonato)</b>			
<b>Pico OH</b>		<b>Pico F</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad (A)
17,00041	27.136	18,99901	7.447
<b>Ti-plasma-F(carbonato)</b>			
<b>Pico OH</b>		<b>Pico F</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad (A)
17,00194	33.545	18,99558	3.728
<b>PLASMA-GPTES-F-PBS</b>			
<b>Pico OH</b>		<b>Pico F</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad (A)
17,00032	26.785	18,99893	13.605
<b>F-PBS</b>			
<b>Pico OH</b>		<b>Pico F</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad (A)
17,00166	32.410	19,00043	9.494
<b>Ti limpio</b>			
<b>Pico OH</b>		<b>Pico F</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad (A)
17,00372	50.012	18,99720	5.256

Tabla C.2.- Valores de los ratios obtenidos por ToF-SIMS.



## C.3.- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SILANIZACIÓN

### C.3.1.- ÁNGULO DE CONTACTO

	Ti-limpio	Ti-plasma	Ti-piraña	Ti-pl-pi	Ti-pi-pl	Ti-pl-pi-sil	Ti-pi-pl-sil	Ti-pl-CPTES	Ti-pi-CPTES
	62,80		14,40	11,90		93,50	89,10	86,40	89,00
	63,50		13,10	12,70		94,60	86,70	86,70	88,70
	68,10		10,40	14,00		94,30	90,60	82,70	91,00
	67,70		11,60	13,00		91,80	91,80	91,00	91,30
	62,30		15,10	12,90		89,60	93,00	91,00	89,80
	64,90		14,80	10,80		90,50	92,60	85,70	87,50
	66,20		16,10	14,60		92,70	89,10	88,70	88,90
	65,10		15,40	13,90		91,10	88,00	89,10	90,10
	60,10					92,00	91,50	84,60	91,40
	61,80					93,10	93,00	85,90	
<b>Media</b>	64,25		13,86	12,98		92,32	90,54	87,18	89,74
<b>Desviación estándar</b>	2,61		1,99	1,23		1,63	2,22	2,72	1,34

Tabla C.3.- Ángulos de contacto en grados.

	Ti-limpio	Ti-plasma	Ti-piraña	Ti-pl-pi	Ti-pi-pl	Ti-pl-pi-sil	Ti-pi-pl-sil	Ti-pl-CPTES	Ti-pi-CPTES
	46,1		70,57	71,24		27,02	29,75	31,44	29,82
	45,67		70,93	71,03		26,33	31,25	31,25	30
	42,85		71,58	70,68		26,52	28,82	33,76	28,57
	43,1		71,31	70,95		28,07	28,07	28,57	28,38
	46,4		70,36	70,98		29,44	27,33	28,57	29,32
	44,82		70,45	71,5		28,88	27,57	31,88	30,75
	44,02		70,05	70,51		27,51	29,75	30	29,88
	44,69		70,27	70,71		28,51	30,44	29,75	29,13
	47,74					27,95	28,26	32,57	28,32
	46,71					27,26	27,33	31,75	
<b>Media</b>	45,21		70,69	70,95		27,75	28,86	30,95	29,35
<b>Desviación estándar</b>	1,60		0,53	0,32		1,01	1,38	1,70	0,83

Tabla C.4.- Tensión superficial en N/m.



**C.3.2.- INTERFEROMETRÍA DE LA REACCIÓN DE PIRAÑA**

	Sa (nm)	Sq (nm)	Sm (mm <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup> )	Sku	Ssk	SArea Index
<b>Muestra A1</b>	476,70	591,75	1040,07	3,42	- 0,90	1,82
<b>Muestra A2</b>	171,68	370,26	3028,02	91,97	- 7,36	1,22
<b>Muestra A3</b>	116,33	166,22	431,45	6,70	- 0,50	1,12
<b>Muestra A4</b>	79,53	123,74	444,74	12,04	- 0,94	1,06
<b>Muestra B1</b>	94,40	144,23	466,74	9,89	- 1,01	1,08
<b>Muestra B2</b>	93,61	142,21	696,27	10,74	- 1,16	1,09
<b>Muestra B3</b>	97,87	139,63	650,34	10,68	- 1,16	1,08
<b>Muestra B4</b>	79,26	123,14	437,55	11,92	- 0,81	1,07
<b>Muestra C1</b>	113,42	165,27	459,90	7,92	- 0,83	1,11
<b>Muestra C2</b>	138,76	220,14	666,61	54,94	2,70	1,18
<b>Muestra C3</b>	139,76	196,00	529,24	6,08	- 0,50	1,15
<b>Muestra C4</b>	125,21	170,29	455,42	6,39	- 0,27	1,10
<b>Media</b>	113,62	159,09	523,83	8,58	- 0,49	1,17
<b>Desviación estándar</b>	28,61	31,15	105,63	2,90	1,09	0,21

Tabla C.5.- Valores obtenidos de la interferometría de piraña.



### C.3.3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RUGOSIDAD MEDIANTE RÉPLICAS DE PDMS Y RECUBRIMIENTO CON ORO

#### C.3.3.1.-RÉPLICAS DE PDMS

	Muestra rugosa	Muestra lisa	ES Muestra rugosa	ES Muestra lisa
	119,4	104,2	11,88	20,48
	123,3	114,3	9,91	14,63
	120,7	113,4	11,21	15,13
	118,3	116	12,46	13,69
	119,7	114,3	11,72	14,63
	118,5	114	12,35	14,79
	119,6	116,8	11,77	13,26
	119,1	114,2	12,03	14,68
	120,3	117,1	11,41	13,1
	120,2	114,6	11,46	14,46
	121,8	116,9	10,65	13,2
	118,3	116	12,46	13,69
	119,7	114,3	11,72	14,63
	118,5	114	12,35	14,79
<b>Media</b>	119,81	114,29	11,67	14,65
<b>Desviación</b>	1,42	3,16	0,72	1,81

Tabla C.6.- Valores de los ángulos de contactos en grados y de la tensión superficial en N/m.



## C.3.3.2.- RECUBRIMIENTO CON ORO

	Ti liso	Ti con piraña	Ti granallado con Alúmina	Ti granallado con sílica
	88,8	94,3	94,8	128,3
	94,5	98,2	90,5	134
	89,7	97,6	95,9	131
	90,7	99,4	98,7	148,4
	93,1	94	97,3	140,2
	89,4	102,9	122,2	148,5
	95,3	102,7	116	128,7
	80,7	111,3	122,1	127,6
	94,6	98,3	116	120,5
	100,1	90,3	122,1	145,7
	96,9	103,2	126,3	126,7
	92,1	101,6	112,3	131,5
	89,2	94,3	114,4	120,7
	89,9	102	95,3	127,5
	90,8	99,9	97,2	128,7
	97,2	105,5	118,8	132,7
	100,1	101,3	99,7	132
	91,2	105	98,7	133,3
	93,5	98,7	111,2	137,5
	91	99,4	127	140,6
	92,1	102,6	114,4	142,1
			122,7	
			100,5	
			99,7	
			97,6	
			98,9	
<b>Media</b>	92,42	100,12	108,09	133,63
<b>Desviación estándar</b>	4,32	4,65	10,99	8,12

Tabla C.7.- Valores de los ángulos de contacto en grados.



	Ti liso	Ti con piraña	Ti granallado con Alúmina	Ti granallado con sílica
	29,94	26,52	26,21	7,58
	26,4	24,12	28,88	5,28
	29,38	24,48	25,53	6,44
	28,76	23,38	23,81	1,42
	27,26	26,71	24,67	3,26
	29,57	21,26	10,45	1,41
	25,9	21,38	13,69	7,41
	35,01	16,32	10,5	7,89
	26,33	24,05	13,69	11,31
	22,95	29,01	10,5	1,92
	24,91	21,08	8,48	8,3
	27,88	22,04	15,75	6,24
	29,69	26,52	14,57	11,21
	29,25	21,8	25,9	7,94
	28,69	23,08	24,73	7,41
	24,73	19,7	12,29	5,77
	22,95	22,23	23,2	6,04
	28,45	20	23,81	5,54
	27,02	23,81	16,37	4,07
	28,57	23,38	8,16	3,14
	27,88	21,44	14,57	2,75
			10,2	
			22,71	
			23,3	
			24,48	
			23,69	
<b>Media</b>	27,69	22,97	18,47	5,55
<b>Desviación estándar</b>	2,68	2,82	6,71	2,63

Tabla C.8.- Valores de la tensión superficial en N/m.



### C.3.4.- ESTUDIO MEDIANTE ToF-SIMS DE LA SILANIZACIÓN

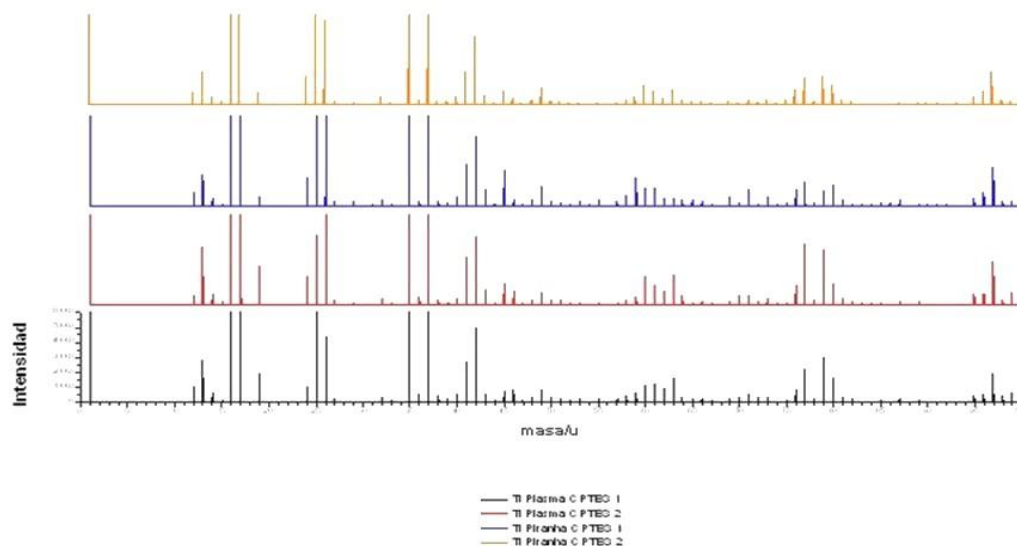


Figura C.2.- Representación de los picos obtenidos por ToF-SIMS.

<b>Ti-plasma-CPTES 1</b>			
<b>Pico I(35)</b>		<b>Pico I(37)</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad
34,97469	122118	36,96372	110409
<b>Ti-plasma-CPTES 2</b>			
<b>Pico I(35)</b>		<b>Pico I(37)</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad
34,96772	243062	36,97131	156027
<b>Ti-piraña-CPTES 1</b>			
<b>Pico I(35)</b>		<b>Pico I(37)</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad
34,97500	227386	36,97363	96388
<b>Ti-piraña-CPTES 2</b>			
<b>Pico I(35)</b>		<b>Pico I(37)</b>	
masa/u	Intensidad (A)	masa/u	Intensidad
34,97600	187559	36,97470	68677

Tabla C.9.- Valores de los ratios obtenidos por ToF-SIMS.



### C.3.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS -OH INSERTADOS POR PLASMA CLEANING

Tiempo (min)	Tiempo (segundos)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	0	5,6	5,4	6,4
5	300	6,4	8	8,7
10	600	10,5	9	11,1
15	900	9,1	10	12,9
20	1200	11,1	14,5	13,2
25	1500	11,7	14,6	14,8
30	1800	15,7	13,7	14,2
35	2100	15,9	13,9	13,5
40	2400	15,6	15	13,6
45	2700	15,5	15	13,5
50	3000	15,8	15,2	13,8
55	3300	17,1	16,7	14,1
60	3600	18,4	17,6	14,5
65	3900	20,1	18,9	16,1
75	4500	23,5	20,2	17,7
85	5100	24	21,9	22,6
95	5700	24,2	22,9	24,5
105	6300	25,3	23,4	25
115	6900	33	33,4	30,7
125	7500	36,8	36,1	37
135	8100	42,1	40,5	42,9
145	8700	42,8	43,9	40,9
155	9300	45,5	46,7	43,6
165	9900	50	47,3	44,7
175	10500	51,3	48,1	45,8
205	12300	54	48,4	46,2
235	14100	55,2	49,6	47,1

Tabla C.10.- Valores de los ángulos de contacto en grados.





## C.4.- RESULTADOS DEL APARTADO DEL ENSAYO COLORIMÉTRICO CON BCA

[PEPTIDO] µg/ml	Absorbancia			Promedio	Desviación estándar
1800	3,119	2,836	2,931	2,96	0,140
900	1,717	1,625	1,587	1,64	0,067
600	1,309	1,173	1,315	1,27	0,080
456	1,109	1,071	1,071	1,08	0,022
300	1,03	0,977	0,965	0,99	0,035
144	0,649	0,703	0,732	0,69	0,042
72	0,517	0,481	0,499	0,50	0,018
24	0,338	0,334	0,353	0,34	0,010
0	0,209	0,201	0,213	0,21	0,006

Tabla C.11.- Valores de la absorbancia obtenida.

## C.5.- RESULTADOS DEL APARTADO DEL ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

El área de la imagen tomada corresponde a  $3702087,82 \mu\text{m}^2$ , o lo que es lo mismo,  $0,037 \text{ cm}^2$ .

Ti limpio	Ti- CPTES	Ti- KGRGDS	Ti- KGGGRGDS	Ti- CPTES- KGRGDS	Ti-CPTES- KGGGRGDS	Ti- KGRDGS	Ti- CPTES- KGRDGS	
6	1	11	32	159	48	9	4	
40	0	18	30	71	43	9	4	
6	2	17	13	92	43	12	11	
47	2	18	24	180	33		9	
4	2	22	19	19	31		5	
39	1	25	7	22	52		17	
58	3	22	33	8	41			
19	4	21	14	106	41			
3	1	10	33	15	30			
29	0	26	30	10	9			
30	1	41	21	90	13			
11	3	31	22	99	13			
					11			
<b>Promedio</b>	24,33	1,67	21,83	23,17	72,58	31,38	10,00	8,33
<b>Células/cm<sup>2</sup></b>	657,29	45,02	589,76	625,77	1960,61	847,75	270,12	225,10

Tabla C.12.- Valores del área de las células fijadas sobre la superficie de la muestra.



Número de las células en las diferentes muestras estudiadas:

	Ti limpio	Ti- CPTES	Ti-CPTES- KGGGRGDS	Ti-CPTES- KGRGDS	Ti-CPTES- KGRDGS	Ti-FN	Ti- KGGGRGDS	Ti- KGRGDS
	805,90	508,70	709,35	1008,57	301,24	2737,64	366,85	658,62
	898,19	583,23	770,06	770,81	548,57	1884,00	716,36	566,33
	797,71	188,53	899,89	790,69	644,80	1915,05	830,67	611,31
	679,04	426,82	1342,03	616,09	484,98	1767,67	157,01	627,89
	318,79		722,53	1018,67	641,72	2109,22	605,56	935,20
	493,38		627,89	1172,00	396,30	707,11	526,88	714,24
	587,49		832,80	837,80	663,41	850,56	789,09	643,74
	488,39		548,46	670,43	384,71	1538,85	757,09	632,57
	626,30		1136,38	1027,07	476,69	829,61	373,55	476,48
	800,90		745,50	903,62	441,28		650,01	736,14
	604,08		1135,31	555,06	605,56		576,54	720,30
	684,89		755,49	537,30	661,28		694,99	466,38
	673,72		697,76	555,06	439,37		791,43	751,56
	298,90		648,20	752,20	546,23		655,75	548,04
	594,83		967,84	1407,31	473,92		788,14	360,47
	433,84		1852,10	535,60	303,79		670,43	453,19
	433,94		1390,09	683,51	370,46		384,39	736,57
	927,11		546,02	703,18	361,32		649,48	690,21
	720,09		1205,07	503,59	296,24		610,67	375,25
	679,57		1018,67	1181,78	411,61		740,08	454,36
	531,45			553,57	527,52		325,48	313,89
	716,68			757,41			437,03	589,19
	772,61			743,80			794,62	735,61
	574,30			203,31			469,35	575,47
	893,30			975,92				497,32
	475,20			696,27				266,36
	705,84			832,80				238,72
	730,51			573,03				428,20
	922,12			774,95				393,86
	532,51							438,30
	674,36							653,95
	798,03							722,53
	939,66							361,85
								622,47
								429,90
								379,29
<b>Promedio</b>	661,02	426,82	927,57	770,39	475,29	1593,30	598,39	550,16

Tabla C.13.- Número de células fijadas sobre la superficie de la muestra

