

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales



**“Modificación de la Superficie del Titanio
para Mejorar su Biocompatibilidad Mediante
la Aplicación de Técnicas de Recubrimiento
con Aminas”**

TESIS DE GRADO

Previo a la Obtención del Título de

INGENIERO QUIMICO

PRESENTADA POR:

Erika Priscila Aragundy Hidalgo
Verónica Denise Salas Gómez

Guayaquil - Ecuador

2011

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Katrien Strubbe por darnos la oportunidad de ampliar nuestro mundo, a la Dra. Els Vanderleyden por guiarnos en esta investigación y por compartir sus conocimientos, al Ing. Francisco Torres por su apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por el apoyo y la confianza brindada, a mis sobrinos hermosos por ponerle la alegría a mi mundo, a aquella amiga que libró conmigo todas las adversidades que se presentaron para llegar hasta aquí y a quien estuvo, está y estará siempre apoyándome y amándome sin condición.

Erika

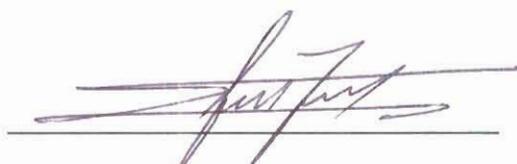
Para mis padres que me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida, a mis hermanos por sus consejos sabios aunque no siempre los escuche, a mis sobrinos por las risas y enseñarme que aunque estén lejos el amor es eterno, y para mi mejor amiga por comprenderme y siempre estar ahí.

Vero

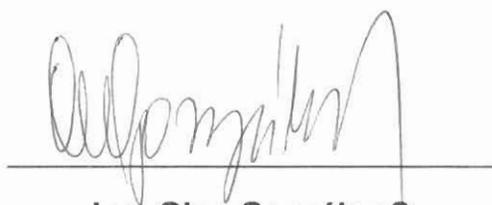
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ph. D. David Matamoros C.
DIRECTOR DEL ICQA



Ing. Francisco Torres A.
DIRECTOR DE TESIS



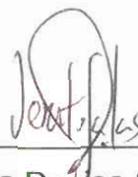
Ing. Olga González S.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”



Erika Priscila Aragundy Hidalgo



Verónica Denise Salas Gómez

RESUMEN

El presente trabajo muestra una investigación acerca de la aplicación de dos técnicas para poder recubrir con aminas la superficie del titanio con la finalidad de aumentar la biocompatibilidad de este metal.

La investigación experimental fue desarrollada desde el mes de febrero hasta mayo del año 2010. Después de buscar información acerca de trabajos anteriores relacionados con éste tema, se procedió a desarrollar los esquemas de las experimentaciones, para ello se decidió comparar técnicas de química inorgánica y de química orgánica, por ello ésta tesis se desarrolló experimentalmente en el Laboratorio de Electroquímica del Departamento de Físico Química y en el Laboratorio de Química Orgánica del Departamento Orgánica de la Universidad de Gante en Bélgica, simultáneamente los resultados del trabajo fueron revisados por nuestro director de tesis en la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

El titanio es un metal que cumple con la mayoría de los requisitos para ser utilizado como un material biocompatible. Ha sido utilizado por muchos años en implantes quirúrgicos, por su compatibilidad con el cuerpo humano y a pesar de esto aún existen dificultades para su uso, ya que una vez que éste reposa dentro del organismo no se puede evitar la liberación de iones cuando se encuentra en contacto con los tejidos circundantes, además es de fundamental importancia que un implante de este tipo se quede fijo en el cuerpo, por ello muchas investigaciones se centran en tratar de recubrir este metal con algún polímero que sea compatible con los sistemas biológicos, de modo que se aprovechan los beneficios que brinda el metal y se vencen las barreras que trae el uso del mismo.

La solución que ha sido estudiada es el de injertar una amina en una superficie de titanio, para así poderlo enlazar con las proteínas del cuerpo humano. Es aquí donde nuestra tesis va a contribuir con la sociedad científica.

Existen algunos métodos para recubrir metales, entre ellos, la técnica de *electrografting* y la técnica de autoensamblaje (*self assembly*), La primera técnica se hizo utilizando la técnica electroquímica de Voltametría Cíclica, en la cual se variaron parámetros como el tipo de solvente, el tipo de electrolito,

los rangos de potenciales, etc. En la segunda técnica se escogió dos tipos de deposiciones, una silanización y una deposición con dopamina.

Además se hicieron estudios de la compatibilidad con el cuerpo humano, donde se midió la estabilidad del metal en un medio similar al del organismo, incubándolo en PBS. También se hizo un recubrimiento con un biopolímero, utilizando la gelatina tipo B para observar qué tan afín es nuestro recubrimiento con las moléculas del ser humano.

Para caracterizar las superficies modificadas se utilizaron técnicas de microscopía como la electrónica de barrido y la de fuerza atómica, técnicas de espectrometría como Espectrometría de Masas por Ionización por Electro Spray y Espectrometría de Energía Dispersiva de Rayos X, técnicas que servían para medir el espesor de las muestras como Elipsometría, y técnicas que servían para medir la mojabilidad de la superficie como la medición de Ángulo de Contacto Estático.

Al final de nuestra experimentación obtuvimos resultados favorables en cuanto a la técnica de *self-assembly*, ya que se pudo determinar condiciones favorables en las cuales se optimizaba el recubrimiento del metal con una amina, con esta técnica se probaron dos aminas la dopamina y el 3-aminopropil trietoxisileno, de las cuales se obtuvieron mejores recubrimientos

con la primera mencionada. Al contrario de esta técnica, la de electrografting no brindó resultados favorables que nos permitan asegurar que la misma es una técnica viable para el propósito de recubrir un metal como titanio con un monómero como el aminoetil metacrilato.

En la ciencia nada está completo o totalmente escrito y esta tesis no se aleja de esta realidad, por eso, aunque ya existen trabajos anteriores relacionados al tema y el presente trabajo aporta cierta cantidad de información a la investigación relacionada con este asunto, el camino que queda por recorrer en este tema es vasto, por ello recomendamos que se siga estudiando acerca del mismo, especialmente con la técnica de *self-assembly* con el único fin de que la ciencia contribuya con un aporte a mejorar la calidad de vida de las personas.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	III
DECLARACIÓN EXPRESA	IV
RESUMEN	V
ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XVIII
ABREVIATURAS	XX
SIMBOLOGÍA	XXI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. LOS BIOMATERIALES	4

1.2.	ELECTROGRAFTING	13
1.2.1.	MECANISMO DE ELECTROGRAFTING	16
1.2.2.	AEMA (Aminoetil Metacrilato)	20
1.3.	SELF-ASSEMBLY	21
1.3.1.	SILANIZACIÓN	22
1.3.1.1.	APTES (3- AMINOPROPILTRIEOXISILENO)	23
1.3.1.2.	MECANISMO DE REACCION DE LA SILANIZACION	27
1.3.2.	RECUBRIMIENTO CON DOPAMINA	30
1.3.2.1.	TRIS BÚFER	32
1.3.3.	RECUBRIMIENTO CON GELATINA	33
1.3.3.1.	GELATINA B	34
1.3.3.2.	EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)	38
1.3.4.	PBS BÚFER	39
CAPÍTULO II		41
2. TRABAJO EXPERIMENTAL		41
2.1.	ELECTROGRAFTING	42
2.1.1.	REACTIVOS Y EQUIPOS	43
2.1.2.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	44
2.1.3.	ESQUEMA DE EXPERIMENTACIÓN EN ELECTROGRAFTING	50
2.2.	SELF ASSEMBLY	51
2.2.1.	REACTIVOS	51
2.2.2.	EQUIPOS	52
2.2.3.	ESQUEMA DE LA EXPERIMENTACIÓN EN SELF-ASSEMBLY	52
2.2.4.	METODOLOGÍA	55
2.2.4.1.	PRETRATAMIENTO EN <i>SELF ASSEMBLY</i>	55
2.2.4.2.	OXIDACIÓN EN <i>SELF ASSEMBLY</i>	56
2.2.4.3.	SILANIZACIÓN	58
2.2.4.4.	RECUBRIMIENTO CON DOPAMINA	60
2.2.4.5.	COLORACIÓN	61
2.2.4.6.	VARIACIÓN DE SOLVENTE EN LA GELATINA	62
CAPÍTULO III		63
3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TRABAJO.		63
3.1.	VOLTAMETRÍA CÍCLICA	63
3.2.	IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY	71
3.3.	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO	74
3.4.	MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	78
3.5.	ELIPSOMETRÍA	82

3.6. ÁNGULO DE CONTACTO ESTÁTICO (SCA)	85
3.7. ESPECTROMETRÍA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM-EDS)	88
CAPÍTULO IV	93
4. RESULTADOS	93
4.1. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE ELECTROGRAFTING	93
4.1.1. EXPERIMENTOS EN SOLVENTE ORGÁNICO	96
4.1.2. EXPERIMENTOS EN SOLVENTE INORGÁNICO	100
4.2. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE SELF ASSEMBLY	117
4.2.1. RESULTADOS DE ÁNGULO DE CONTACTO ESTÁTICO.	117
4.2.2. MICROSCOPIO DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)	131
4.2.3. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA	143
4.2.4. ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DE ENERGÍA DISPERSIVA (EDAX)	156
4.2.5. VARIACIÓN DE SOLVENTE EN LA GELATINA.	163
4.2.6. ELIPSOMETRÍA	166
CONCLUSIONES	174
RECOMENDACIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 ESQUEMA DE UNA CELDA ELECTROQUÍMICA CONVENCIONAL.....	14
FIGURA 1. 2 ESQUEMA DEL MECANISMO PARA LA ELECTROREDUCCIÓN DE UN MONÓMERO ACRÍLICO QUE DEPENDE DEL POTENCIAL APLICADO.....	18
FIGURA 1. 3 MOLÉCULA DE HIDROCLORATO DE AMINOETIL METACRILATO.....	21
FIGURA 1. 4 TIPOS DE AMINAS.....	24
FIGURA 1. 5 FÓRMULA MOLECULAR DE APTES.....	24
FIGURA 1. 7 COMPUESTOS ÓRGANO-SILÍCICOS.....	25
FIGURA 1. 6 ENLACE HIDROLÍTICAMENTE ESTABLE DE APTES.....	25
FIGURA 1. 8 MECANISMO DE REACCIÓN DE LA SILANIZACIÓN.....	28
FIGURA 1. 9 ESTRUCTURA DE AZUL BRILLANTE DE COMASSIE.....	29
FIGURA 1. 10 MOLÉCULA DE DOPAMINA.....	30
FIGURA 1. 11 MOLÉCULA DE TRIS-BÚFER.....	33
FIGURA 1. 12 MES: ÁCIDO 2-(N-MORFOLINA) ETANOSULFÓNICO.....	36
FIGURA 1. 13 ANILLO DE MORFOLINA.....	37
FIGURA 1. 14 ESTRUCTURA DE EDC.....	39
FIGURA 2. 1 FOTOGRAFÍAS DE ALGUNOS DE LOS REACTIVOS USADOS EN <i>ELECTROGRAFTING</i>	44
FIGURA 2. 2 ESQUEMA DE EXPERIMENTACIÓN EN ELECTROGRAFTING.....	50
FIGURA 2. 3 ESQUEMA DE EXPERIMENTACIÓN EN SELF-ASSEMBLY.....	54
FIGURA 3. 1 DIAGRAMA DE UN POTENCIOSTATO.....	65
FIGURA 3. 2 FOTOGRAFÍA DEL POTENCIOSTATO 263 A UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS DE ELECTROGRAFTING.....	65

FIGURA 3. 3 FOTOGRAFÍA DE LA PANTALLA DEL PROGRAMA M270 UTILIZADO EN VOLTAMETRÍA CÍCLICA.	66
FIGURA 3. 4 CELDA ELECTROQUÍMICA ENSAMBLADA UTILIZADA EN LA TÉCNICA DE ELECTROGRAFTING.	66
FIGURA 3. 6 INTENSIDAD DE CORRIENTE VS. TIEMPO EN VOLTAMETRÍA CÍCLICA.	68
FIGURA 3. 5 POTENCIAL VS. TIEMPO EN VOLTAMETRÍA CÍCLICA	68
FIGURA 3. 7 VOLTAMOGRAMA EN EJECUCIÓN DEL PROGRAMA M 270.	69
FIGURA 3. 8 EQUIPO PARA ESI-MS.	72
FIGURA 3. 9 ESQUEMA DE IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY.....	73
FIGURA 3. 10 EJEMPLO DE UN ESPECTROGRAMA DE MASAS.	73
FIGURA 3. 11 IMÁGENES EN SEM DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE DEPOSICIÓN DE AMINAS.	77
FIGURA 3. 12 EQUIPO MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.....	77
FIGURA 3. 13 IMAGEN DE LA PUNTA DEL VOLADIZO Y EL REFLEJO DEL PUNTO LASER.	79
FIGURA 3. 14 MODO DE OPERACIÓN DEL AFM.	80
FIGURA 3. 15 EQUIPO MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA.	82
FIGURA 3. 16 EJEMPLO DE LA INCIDENCIA DEL RAYO DE LUZ SOBRE LA MUESTRA EN ELIPSOMETRÍA.	84
FIGURA 3. 17 EQUIPO PARA ELIPSOMETRÍA	85
FIGURA 3. 18 MOJABILIDAD DE DIFERENTES FLUIDOS.....	86
FIGURA 3. 19 MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO POR EL MÉTODO DE YOUNG LAPLACE	87
FIGURA 3. 20 EQUIPO PARA MEDICIÓN DE SCA.....	88
FIGURA 3. 21 EJEMPLO DE UN ESPECTROGRAMA EN EDS.....	91
FIGURA 3. 22 EQUIPO PARA SEM-EDS	92
FIGURA 4. 1 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ORGÁNICA QUE CONTIENE MONÓMERO AEMA DE 0,1 M TBAP EN DMF, ENTRE V_{CA} Y -2.5 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S. AET1004A SOLUCIÓN PURGADA CON GAS NITRÓGENO. AET1005A SOLUCIÓN SIN PURGAR (CON OXÍGENO).	97
FIGURA 4. 2 DE IZQUIERDA A DERECHA AET1004-AET1005-AET1006 ..	98
FIGURA 4. 3 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ORGÁNICA DE 0,1 M TEAP EN DMF, ENTRE +1V Y -2.5 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S. AET1004A SOLUCIÓN QUE CONTIENE MONÓMERO AEMA. RET1003A SOLUCIÓN SIN MONÓMERO AEMA. AET1008 ENTRE V_{CA} Y -2.5 V.....	99
FIGURA 4. 4 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ACUOSA QUE ENTRE V_{CA} Y -1.6 V. VELOCIDAD DE	

BARRIDO 20 MV/S. AET0002A SOLUCIÓN QUE CONTIENE MONÓMERO. RET0001A SOLUCIÓN SIN MONÓMERO.	101
FIGURA 4. 5 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ACUOSA QUE CONTIENE H_2SO_4 , ENTRE VCA Y -1.6 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S. RET0004A SOLUCIÓN SIN MONÓMERO. AET0005A SOLUCIÓN CON MONÓMERO.	101
FIGURA 4. 6 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ACUOSA QUE CONTIENE MONÓMERO AEMA, ENTRE VCA Y -1.6 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S. AET0023A-B 5 BARRIDOS DE 2 CICLOS. AET0024A 10 BARRIDOS DE UN CICLO.	102
FIGURA 4. 7 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ACUOSA QUE CONTIENE MONÓMERO AEMA, ENTRE VCA Y -1.6 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S. AET0023A-B SOLUCIÓN CON H_2SO_4 . AET0025A-B SOLUCIÓN SIN H_2SO_4	103
FIGURA 4. 8 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ACUOSA QUE CONTIENE MONÓMERO AEMA, ENTRE VCA Y -1.6 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S.	104
FIGURA 4. 9 VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS EN SOLUCIÓN ACUOSA QUE CONTIENE MONÓMERO AEMA, ENTRE VCA Y -1.6 V. VELOCIDAD DE BARRIDO 20 MV/S. AET0026A	104
FIGURA 4. 10 RESULTADOS SEM PARA ELECTROGRAFTING	106
FIGURA 4. 11 TOPOGRAFÍA AFM PARA ELECTROGRAFTING	109
FIGURA 4. 12 VISTAS SUPERIORES (PLANAS) PARA AFM ELECTROGRAFTING	110
FIGURA 4. 13 RUGOSIDAD AFM PARA ELECTROGRAFTING	111
FIGURA 4. 14 A SOLUCIÓN 1, AEMA (0.1MM), H_2SO_4 (0.025 MM), $(NH_4)_2S_2O_8$, SIN MODIFICACIÓN ELECTROQUÍMICA	115
FIGURA 4. 15 MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO DE UNA GOTTA UTILIZANDO DEL MÉTODO DE YOUNG-LAPLACE.	122
FIGURA 4. 16 VARIACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO EN EL TIEMPO PARA EL TITANIO PURO	122
FIGURA 4. 17 VARIACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO EN EL TIEMPO PARA EL TITANIO PRE-TRATADO	123
FIGURA 4. 19 VARIACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO EN EL TIEMPO PARA EL TITANIO PURO, COMPARACIÓN	124
FIGURA 4. 18 VARIACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO EN EL TIEMPO PARA EL TITANIO OXIDADO	124
FIGURA 4. 20 VARIACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO EN EL TIEMPO PARA EL TITANIO PRE-TRATADO, COMPARACIÓN.	125
FIGURA 4. 21 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO COMERCIAL POR EL MÉTODO DE <i>SELF ASSEMBLY</i> , (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	133

FIGURA 4. 22 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO PRE-TRATADO POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	133
FIGURA 4. 23 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO OXIDADO POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	134
FIGURA 4. 24 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	135
FIGURA 4. 25 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES, REACCIÓN DE 24 HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	135
FIGURA 4. 26 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES, REACCIÓN DE VEINTICUATRO HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	136
FIGURA 4. 27 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	137
FIGURA 4. 28 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	138
FIGURA 4. 29 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE VEINTICUATRO HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	138
FIGURA 4. 30 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	139
FIGURA 4. 31 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE VEINTICUATRO HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	140
FIGURA 4. 32 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON DOPAMINA, REACCIÓN DE 3 HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	141
FIGURA 4. 33 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON DOPAMINA, REACCIÓN DE 24 HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY,	

FIGURA 4. 22 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO PRE-TRATADO POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	133
FIGURA 4. 23 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO OXIDADO POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	134
FIGURA 4. 24 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	135
FIGURA 4. 25 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES, REACCIÓN DE 24 HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	135
FIGURA 4. 26 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES, REACCIÓN DE VEINTICUATRO HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	136
FIGURA 4. 27 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	137
FIGURA 4. 28 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	138
FIGURA 4. 29 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 1% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE VEINTICUATRO HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	138
FIGURA 4. 30 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE UNA HORA POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	139
FIGURA 4. 31 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON 5% APTES CON GELATINA, REACCIÓN DE VEINTICUATRO HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	140
FIGURA 4. 32 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON DOPAMINA, REACCIÓN DE 3 HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A....	141
FIGURA 4. 33 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON DOPAMINA, REACCIÓN DE 24 HORAS POR EL MÉTODO DE SELF ASSEMBLY,	

(A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	141
FIGURA 4. 34 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON DOPAMINA REACCIÓN DE TRES HORAS POR EL MÉTODO DE <i>SELF</i> <i>ASSEMBLY</i> CON RECUBRIMIENTO DE GELATINA, (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A.	142
FIGURA 4. 35 IMÁGENES DE SEM DEL TITANIO CON DOPAMINA REACCIÓN DE 24 HORAS POR EL MÉTODO DE <i>SELF ASSEMBLY</i> , CON RECUBRIMIENTO DE GELATINA (A) TOPOGRAFÍA B, (B) IMAGEN COMPLETA Y (C) TOPOGRAFÍA A TITANIO CON DOPAMINA, REACCIÓN DE 24 HORAS.	142
FIGURA 4. 36 IMÁGENES DE TITANIO COMERCIAL EN AFM.	145
FIGURA 4. 37 IMÁGENES DE TITANIO PRE-TRATADO EN AFM	146
FIGURA 4. 38 IMÁGENES DE TITANIO OXIDADO EN AFM.	146
FIGURA 4. 39 IMÁGENES DE TITANIO CON 1% DE APTES, UNA HORA DE REACCIÓN EN AFM.	147
FIGURA 4. 40 IMÁGENES DE TITANIO CON 1% DE APTES, TIEMPO DE REACCIÓN 24 HORAS EN AFM	148
FIGURA 4. 41 IMÁGENES DE TITANIO CON 5% APTES, UNA HORA DE REACCIÓN EN AFM.	149
FIGURA 4. 42 IMÁGENES DE TITANIO CON 5% APTES, VEINTICUATRO HORAS DE REACCIÓN EN AFM	150
FIGURA 4. 43 IMÁGENES DE TITANIO CON 1% APTES CON GELATINA- EDC, UNA HORA DE REACCIÓN EN AFM.	151
FIGURA 4. 44 IMÁGENES DE TITANIO CON 1% APTES CON GELATINA- EDC, 24 HORAS DE REACCIÓN.	152
FIGURA 4. 45 IMÁGENES DE TITANIO CON DOPAMINA, TRES HORAS DE REACCIÓN EN AFM	153
FIGURA 4. 46 IMÁGENES DE TITANIO CON DOPAMINA, VEINTICUATRO HORAS DE REACCIÓN EN AFM	154
FIGURA 4. 47 TITANIO CON DOPAMINA Y GELATINA, TRES HORAS DE REACCIÓN AFM.	155
FIGURA 4. 48 TITANIO CON DOPAMINA Y GELATINA, VEINTICUATRO HORAS DE REACCIÓN.	155
FIGURA 4. 49 ESPECTROGRAMA DE ENERGÍA DISPERSIVA PARA UNA MUESTRA DE TITANIO COMERCIAL.	157
FIGURA 4. 50 ESPECTROGRAMA DE ENERGÍA DISPERSIVA PARA UNA MUESTRA DE TITANIO CON APTES 5%	161
FIGURA 4. 51 ENERGÍA DISPERSIVA DEL TITANIO CON DOPAMINA 3 HORAS. EDS	162
FIGURA 4. 52 COLORACIÓN	165
FIGURA 4. 53 TITANIO PULIDO PARA LA MEDICIÓN DE ELIPSOMETRÍA	166

FIGURA 4. 54 EJEMPLO DE MODELO DE CAPAS PARA LA MEDICIÓN DE ELIPSOMETRÍA.....	169
FIGURA 4. 55 AJUSTE DE CURVA DEL TITANIO REFERENCIAL PARA LA PRIMERA MEDICIÓN	170
FIGURA 4. 56 AJUSTE DE CURVA DEL TITANIO REFERENCIAL PARA LA SEGUNDA MEDICIÓN.....	171
FIGURA 4. 57 . AJUSTE DE CURVA DEL TITANIO REFERENCIAL PARA LA TERCERA MEDICIÓN	172

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE ELECTROGRAFTING.....	43
TABLA II EQUIPOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE ELECTROGRAFTING.....	44
TABLA III TIPOS DE TITANIO UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE SELF-ASSEMBLY.....	51
TABLA IV SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADAS EN LA TÉCNICA DE SELF-ASSEMBLY.....	51
TABLA V EQUIPOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE SELF-ASSEMBLY	52
TABLA VI CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS SOMETIDAS A AFM.....	108
TABLA VII CARACTERÍSTICAS DE SOLUCIONES SOMETIDAS A ESI-MS.....	115
TABLA VIII ENSAYOS PREPARADOS PARA EL ANÁLISIS DE SCA.....	119
TABLA IX EJEMPLO DE LOS DATOS RECOLECTADOS CON EL SOFTWARE OCA20.....	121
TABLA X ÁNGULOS DE CONTACTO [GRADOS] DE LAS MUESTRAS DE TITANIO COMERCIAL, PRE TRATADO Y OXIDADO.....	126
TABLA XI ÁNGULOS DE CONTACTO [GRADOS] DE LAS MUESTRAS DE TITANIO 1% APTES.....	127
TABLA XII ÁNGULOS DE CONTACTO [GRADOS] DE LAS MUESTRAS DE TITANIO 5% APTES.....	128
TABLA XIII ÁNGULOS DE CONTACTO [GRADOS] DE LAS MUESTRAS DE TITANIO CON APTES CON GELATINA B EN EDC.....	129
TABLA XIV ÁNGULOS DE CONTACTO [GRADOS] DE LAS MUESTRAS DE TITANIO CON DOPAMINA.....	130
TABLA XV ENSAYOS PARA EL SEM, SELF ASSEMBLY.....	131
TABLA XVI MUESTRAS QUE SE PREPARARON PARA EL ANÁLISIS DE AFM.....	144
TABLA XVII MUESTRAS ANALIZADAS CON EDS.....	156

TABLA XVIII PORCENTAJES DE MASAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE TITANIO COMERCIAL Y OXIDADO ANALIZADOS CON EDS.....	158
TABLA XIX PORCENTAJES DE MASAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE TITANIO EN REACCIÓN CON APTES ANALIZADOS CON EDS.....	160
TABLA XX PORCENTAJES DE MASAS DE LOS ELEMENTOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE TITANIO EN REACCIÓN CON DOPAMINA ANALIZADOS CON EDS	162
TABLA XXI ENSAYOS PARA ANÁLISIS DE ÁNGULO DE CONTACTO ESTÁTICO BÚFER	164
TABLA XXII MEDIDAS DEL ÁNGULO DE CONTACTO ESTÁTICO PARA MUESTRAS DE TITANIO CON 1% APTES Y RECUBRIMIENTO DE GELATINA CON DIFERENTES SOLVENTES CON DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN.....	165
TABLA XXIII ENSAYOS QUE SE UTILIZARON PARA LA MEDICIÓN DE ELIPSOMETRÍA.....	167
TABLA XXIV ESPESORES DE LAS CAPAS QUE EL TITANIO CONTIENE DURANTE SU MODIFICACIÓN.....	173

ABREVIATURAS

AEMA	Aminoetil Metacrilato
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
ADD	Agua Doblemente Destilada
APTES	Aminopropil Trietoxisileno
DMF	Dimetil Formamida
EC	Electrodo contador
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS	Espectroscopía de Energía Dispersiva
ER	Electrodo de referencia
ET	Electrodo de trabajo
INC	Incubación
MES	2-(N-morfolina) ácido etanosulfónico
MSE	Error Mínimo al Cuadrado
NHS	N-hidroxisuccinimida
NA	No Aplica
PBS	Búfer Fosfato Salino
SCA	Ángulo de Contacto Estático
SEM	Microscopía de Barrido Electrónico

SIMBOLOGÍA¹

ΔE	Diferencia de potencial
g	Gramos
mol	Mol
pK_a	Constante de disociación ácida
% v/v	porcentaje volumen-volumen
mL	Mililitros
°C	Grado Centígrado
h	hora
E_0	Potencial inicial
E_a	Potencial anódico
E_c	Potencial catódico
eV	Electrovoltio
keV	Kiloelectrovoltio
mV	Milivoltios
M	Molar
V_{ca}	Potencial de circuito abierto

¹ Las fórmulas y estructuras moleculares presentadas en este documento fueron realizadas con el programa Chems sketch®

INTRODUCCIÓN

Los recubrimientos orgánicos sobre superficies metálicas es un tema de gran interés en la actualidad, debido a la gran variedad de aplicaciones que van desde la industria automovilística hasta la industria alimenticia. En el caso de los biomateriales, como el titanio, este recubrimiento es crucial, ya que estudios realizados han comprobado que las interacciones metal-tejido biológico dependen de la superficie del metal, esto es: tratamientos superficiales aplicados, propiedades físico-químicas de su rugosidad, iones liberados, etc. Para que un metal sea biocompatible éste no debe ser tóxico, no debe ser cancerígeno, debe ser químicamente estable, no debe presentar degradación con el tiempo, no debe reaccionar con el medio circundante, y a la vez debe tener resistencia mecánica. Sin embargo, cuando un metal se encuentra en contacto directo con algún tejido, es prácticamente seguro que se provocará la liberación de ciertos iones en mayor o menor grado.

El titanio es ampliamente utilizado como material de implantes en la medicina debido a la combinación de sus propiedades mecánicas, la resistencia a la corrosión y su biocompatibilidad. A pesar de ello, este metal carece de propiedades bioactivas, y con la finalidad de que el metal logre una oseointegración adecuada es necesario realizar modificaciones en su superficie, tales como la inmovilización de péptidos y de proteínas. En los últimos años, una gran variedad de métodos y técnicas se han llevado a cabo con el fin de recubrir el titanio con alguna sustancia que logre mejorar la interacción entre el metal y el tejido circundante.

Con este trabajo se busca optimizar las técnicas ya existentes y además compararlas entre sí. *¿Será posible modificar la superficie del titanio para mejorar su biocompatibilidad recubriéndolo con una amina?* Para contestar esta pregunta, en la presente investigación se utilizan dos técnicas para modificar la superficie del titanio: la silanización y la deposición de dopamina y el *electrografting*, las dos primeras pertenecen a la técnica de *self assembly*.

El objetivo principal es injertar una amina a la superficie del titanio con la finalidad de mejorar su biocompatibilidad. Para ello los objetivos específicos son:

- Utilizar dos técnicas diferentes para injertar una amina a la superficie del titanio.
- Recubrir la superficie del titanio modificado utilizando un biopolímero para analizar su afinidad con el organismo.
- Utilizar equipos adecuados para la caracterización de la superficie.

Revisando la literatura relacionada con el presente tema se puede trazar un camino que ayude a encontrar una solución para lograr los objetivos planteados. La materia prima es el titanio comercial, al cual se le hace un pretratamiento de acuerdo a cada técnica para poder limpiar la superficie del titanio de los contaminantes del ambiente. El siguiente paso depende de cada técnica. En la deposición de la dopamina y silanización se oxidan las placas para crear la compatibilidad del titanio, mientras que en electrografting se desoxidan las placas con el fin de tener una superficie de titanio puro, libre de óxidos. Una vez tratado el titanio se busca la forma más adecuada para insertar la amina en la superficie. Se varía la concentración de la solución de amina, los tipos de solventes, el periodo de reacción. Una vez cumplido este objetivo se pretende avanzar utilizando el substrato modificado para añadirle un biopolímero con el fin de que el titanio sea apto para ser utilizado como implante.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. LOS BIOMATERIALES

Una definición común de biomaterial es “un material no viable utilizado como dispositivo médico, que intenta interactuar con sistemas biológicos” (1). En otros términos, un biomaterial es una sustancia farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro de un sistema vivo. A pesar de que los materiales de implantes biomédicos han sido utilizados desde hace varios siglos, algunos de éstos han sido condenados al fracaso debido a importantes conceptos relacionados con infecciones y reacciones biológicas de los organismos a materiales que no han sido establecidas.

Los biomateriales son polímeros, metales, cerámicas y macromoléculas naturales, por ejemplo, biopolímeros, que son manufacturados o procesados para ser aptos para el uso en medicina o como dispositivos médicos que entran en contacto íntimo con proteínas, células, tejidos, órganos y sistemas de órganos. Recientemente, una variedad de polímeros, biopolímeros y materiales inorgánicos han sido desarrollados específicamente para aplicaciones médicas. (2).

El acero inoxidable, el titanio y las aleaciones de titanio son los materiales que usualmente comprenden la base de implantes metálicos para regeneraciones óseas. La mayor parte de los implantes se componen de metales sólidos, mientras que los recubrimientos de partículas de titanio crean una superficie porosa. Diferentes técnicas han sido utilizadas para la manufactura de recubrimientos porosos, entre ellas, la deposición plasmática, la electrodeposición, el electroinjerto, la silanización, entre otras.

La principal ventaja de los implantes de metal son sus excelentes propiedades mecánicas, lo cual las hace ampliamente aplicables como materiales de implantes usados en reparaciones quirúrgicas de

huesos. Sin embargo, la falta de adherencia al tejido y la baja tasa de degradación traen como resultado una segunda cirugía para remover el implante o la implantación permanente en el cuerpo ya que pueden darse riesgos de toxicidad debido a la acumulación de iones metálicos debidos a la corrosión.

El titanio y sus aleaciones son ampliamente utilizados como materiales de implantes debido a la excelente combinación de las propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y su biocompatibilidad. Aunque el uso de materiales basados en titanio es en ocasiones problemático, debido a la lenta acumulación de iones metálicos peligrosos en el tejido suave circundante de la prótesis. En lo que a esto respecta, muchos estudios han señalado una correlación entre la enfermedad de Alzheimer y los iones de aluminio liberados en el organismo. Por esta razón, muchos procedimientos basados en la modificación de la superficie del titanio y sus aleaciones han sido sugeridos para mejorar la biocompatibilidad y su biofuncionalidad de los implantes basados en titanio.

La protección de metales contra la corrosión es un problema muy antiguo, sin embargo recubrir metales con películas de polímeros es

una estrategia valiosa y de gran interés industrial para cambiar las superficies de los metales y/o protegerlos contra la corrosión. Hoy en día se puede encontrar recubrimientos orgánicos tóxicos, desde lubricantes en conectores eléctricos para resistir el desgaste, implantes biocompatibles para aparatos biomédicos e implantes de órganos, hasta empaques de chips microelectrónicos para hacer utensilios de cocina antiadherentes. En todas estas condiciones los recubrimientos pueden ser estables bajo condiciones agresivas, mostrar las propiedades adhesivas necesarias, proteger los substratos contra la corrosión por largos periodos, para ser hidrofílicos e hidrofóbicos y para ser seguros de usar. En el caso de alimentos y de biomateriales, estos requerimientos son cruciales, ya que muchos problemas de salud pueden derivarse de las fallas en el recubrimiento orgánico que no llenen estas especificaciones.

Es entonces de considerable importancia el control tan perfecto como se pueda del mecanismo de formación de estos recubrimientos y para reunir tanta información como se pueda de la fuerza de los enlaces entre la capa orgánica y el substrato, la homogeneabilidad y la permeabilidad de la capa orgánica, y la estabilidad de estas condiciones severas. Investigaciones fundamentales son requeridas no solo para crear nuevas capas orgánicas sobre el substrato con

propiedades adecuadas, sino también dar las herramientas de caracterización que den las respuestas apropiadas a los problemas industriales.

Existen seis métodos de recubrimientos orgánicos que comúnmente se usan a nivel industrial y se investigan en instituciones dedicadas a la ciencia: (3)

- Deposición Plasmática (*Plasma Deposition*)

La deposición plasmática de vapor químico mejorada por plasma (PECVD) se utiliza para el depósito de películas delgadas de un estado gaseoso (vapor) a un sustrato sólido. El plasma es generalmente creado por radio frecuencia o por descarga de corriente continua entre dos electrodos cuyo espacio se llena con los gases de las reacciones químicas que están envueltas en el proceso. Este método se usa comúnmente para recubrir metales contra la corrosión, para la resistencia a la rayadura, para capas de anti-ensuciamiento, aunque las tasas de deposición son relativamente bajas y el espesor de la película es siempre más alto de 1 μm .

propiedades adecuadas, sino también dar las herramientas de caracterización que den las respuestas apropiadas a los problemas industriales.

Existen seis métodos de recubrimientos orgánicos que comúnmente se usan a nivel industrial y se investigan en instituciones dedicadas a la ciencia: (3)

- Deposición Plasmática (*Plasma Deposition*)

La deposición plasmática de vapor químico mejorada por plasma (PECVD) se utiliza para el depósito de películas delgadas de un estado gaseoso (vapor) a un sustrato sólido. El plasma es generalmente creado por radio frecuencia o por descarga de corriente continua entre dos electrodos cuyo espacio se llena con los gases de las reacciones químicas que están envueltas en el proceso. Este método se usa comúnmente para recubrir metales contra la corrosión, para la resistencia a la rayadura, para capas de anti-ensuciamiento, aunque las tasas de deposición son relativamente bajas y el espesor de la película es siempre más alto de 1 μm .

- Recubrimiento por Giro (*Spin Coating*)

El recubrimiento por giro es la técnica más utilizada para recubrimientos orgánicos basados en soluciones de polímeros. Se utiliza para recubrir con películas uniformes y delgadas las superficies completamente planas. Por ejemplo, resinas fotosensibles usadas en litografía en la industria microelectrónica, recubrimientos para hacer las pantallas planas antirreflejos, tubos de televisión y discos compactos. El rango de la capa obtenida es generalmente 1-200 μm , pero se pueden obtener capas más finas con soluciones diluidas y altas velocidades de giro. Un exceso de solución se coloca en el substrato, que luego gira con alta velocidad con el fin de difundir el fluido por la acción de la fuerza centrífuga. La máquina utilizada para el recubrimiento de giro, se llama recubridor de vuelta, o simplemente ruleta.

- Deposición de Vapor (*Vapor Deposition*)

La deposición de vapor es generalmente usada para recubrimientos inorgánicos (cerámicas, carburo de silicio, nitruros, metales) pero puede ser también aplicada para pequeñas moléculas orgánicas, por ejemplo, en la fabricación de películas

orgánicas para transistores delgados, diodos orgánicos emisores de luz y celdas fotovoltaicas orgánicas.

- Electrodeposición (Electrodeposition)

La electrodeposición es un proceso electroquímico en el que se usa una corriente eléctrica para reducir cationes en una solución acuosa que los contiene para propiciar la precipitación de éstos, que suelen ser metales, sobre un objeto conductor que será el cátodo de la celda, creando un fino recubrimiento alrededor de éste con el material reducido. La galvanoplastia es el método más utilizado para recubrir superficies en las industrias automotriz, petroquímica y aeroespacial, propulsión, combustión y aplicaciones microondas; tableros de circuitos impresos, vías e interconexiones de cobre para electrónicos, y muchas aplicaciones decorativas.

- Electroinjerto (*Electrografting*)

Esta es una técnica relativamente nueva que permite la deposición de una capa orgánica muy delgada mediante un enlace muy fuerte entre el sustrato y la molécula. Al contrario de la electrodeposición, la cual requiere de una fuente de potencial a lo largo del proceso para alimentar la reacción redox, el electroinjerto es un proceso electro-iniciado que requiere de un electrodo

cargado solo para el paso del injerto, mas no para el de espesamiento. Las películas orgánicas resultantes son por lo general, aislantes, altamente adherentes y ópticamente transparentes. Como éste es un proceso mayormente catódico, puede ser aplicado generalmente a varias superficies tanto metálicas como semiconductoras sin tomar en cuenta la formación de una capa de óxido.

- Auto ensamblaje (*Self-assembly*)

Es una técnica muy atractiva para formar recubrimientos orgánicos, debido al bajo costo de los procesos, las condiciones suaves de operación, las cuales previenen la degradación de las moléculas que forman el recubrimiento, y la formación espontánea de verdaderos enlaces químicos entre la molécula y el sustrato. Las superficies de los óxidos, metales nobles, y silicio pueden ser exitosamente funcionalizados siempre y cuando las moléculas reactivas provistas sean las adecuadas (halogenosilanos, alcoxisilanos, selenoles, organofosfatos, ácidos carboxílicos, tioles, disulfuros, alquenos, alquinos, etc.). Las interacciones de Van der Waals entre las moléculas vecinas quimisorbidas generalmente

que permiten un ordenamiento de larga distancia en la primera monocapa. (3)

En el presente trabajo se pretende abordar ampliamente dos de las técnicas anteriormente mencionadas, las cuales son electroinjerto (*electrografting*) y la técnica de auto-ensamblaje (*self-assembly*). Debido a que los temas a tratar, son temas relativamente nuevos en América Latina, no existen traducciones exactas acerca de sus nombres, por ello se adoptará el nombre de la técnica en inglés de aquí en adelante en el texto, es decir, cuando se refiera a **electroinjerto** se hablará de **electrografting**, y cuando se hable de **auto-ensamblaje** será **self-assembly**. Como se presenta en la introducción del tema, las dos técnicas tienen el mismo objetivo, tratar de injertar un monómero que facilite la biocompatibilidad del substrato de titanio. Son técnicas completamente distintas, pero en el presente trabajo parten de la misma hipótesis, por lo cual, lo principal que se busca conocer es cuál de las dos técnicas es más efectiva al momento de alcanzar el objetivo planteado. Cabe recalcar que la bibliografía y las investigaciones anteriores a ésta, muestran puntos de partida distintos para ambas técnicas, ya que por ejemplo la técnica de *self-assembly* ha tenido resultados positivos en cuanto a la formación de recubrimientos orgánicos sobre titanio, a diferencia de *electrografting*, la cual es una técnica utilizada más en el

campo de recubrir materiales semiconductores para fines electrónicos, lo cual hace que esta técnica tenga que ser estudiada desde el principio, es decir, no existe una guía clara sobre el tipo de solvente a utilizar, (orgánico o inorgánico, concentraciones), así como el potencial catódico requerido, la técnica electroanalítica necesaria, el mecanismo de reacción, el tiempo de vida del enlace, la fuerza o espesor del mismo, sin embargo se debe resaltar que existe un creciente interés en el tema por parte investigadores, lo cual indica que los desarrollos de las técnicas están en marcha.

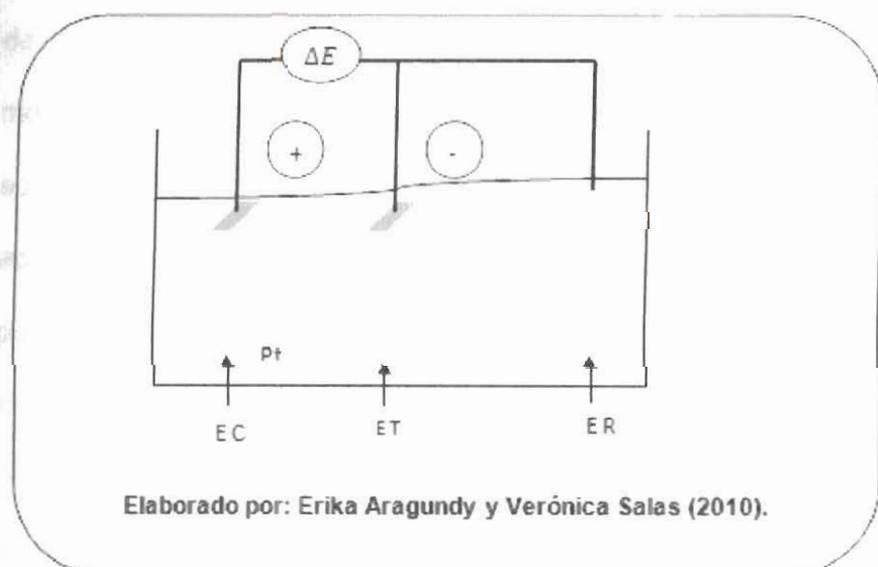
1.2. ELECTROGRAFTING

Electrografting es una poderosa técnica que permite una verdadera modificación química de superficies conductoras y semiconductoras. Esta técnica puede ser aplicada en un amplio rango de superficies semiconductoras manteniendo su identidad química. Pero como todo proceso, tiene sus limitaciones, y entre ellas está el hecho de requerir una atmósfera libre de oxígeno y agua, para poder obtener un ambiente adecuado para que el solvente trabaje correctamente.

Tratar de lograr una adhesión permanente entre dos materiales diferentes como lo son los polímeros y los metales es un reto muy

difícil de alcanzar, actualmente los polímeros sintéticos pueden ser quimisorbidos en una variedad de superficies conductoras mediante el *electrografting* catódico de monómeros acrílicos. *Electrografting* garantiza una interfase orgánico/metal robusta y ofrece la posibilidad de adaptar la funcionalidad del polímero injertado.

Figura 1. 1 Esquema de una celda electroquímica convencional



Este proceso electroquímico es muy fácil de implementar (solo se necesita de un potencióstato convencional) tanto a escala de laboratorio como a nivel industrial y comúnmente requiere de monómeros fácilmente disponibles.

Hoy en día este proceso es utilizado solo para recubrir piezas pequeñas de metales de alto valor, como por ejemplo para implantes

biomédicos y circuitos electrónicos. Es aquí precisamente en donde nace la idea de querer utilizar esta técnica para poder recubrir placas de titanio que sirvan como electrodo de trabajo (substrato) con un monómero que permita la formación de un polímero sobre el substrato que mejore las propiedades biocompatibles ya existentes en el titanio.

Hace más de dos décadas Lecayon publicó un primer reporte acerca de la poderosa y efectiva técnica de quimisorción de poliacrilonitrilo en metales como cobre y níquel. Esta técnica de *electrografting* de un solo paso se basó en la electroiniciación de la polimerización de acrilonitrilo en acetonitrilo bajo condiciones controladas de polimerización catódica. Este trabajo pionero despertó no solo curiosidad, sino también perspectivas optimistas sobre el recubrimiento permanente de metales, cuya protección de la superficie contra los agentes atmosféricos que causan la corrosión son las que siempre se han querido alcanzar, pero no han habido resultados muy prometedores (4).

La técnica de electrografting es simplemente implementada en una celda electroquímica estándar. El substrato a ser recubierto debe estar polarizado catódicamente en una solución del monómero libre

de agua y oxígeno y una sal conductora en un solvente orgánico bajo una atmósfera seca e inerte. Sobre la aplicación de un potencial catódico apropiado al electrodo de trabajo por unos pocos segundos, una capa de polímero fuertemente adherido es depositada en la superficie del cátodo, el cual es consecuentemente pasivado.

La pasivación catódica y por lo tanto la cadena en *electrografting* es un proceso rápido (de pocos segundos), el cual no es influenciado por el tiempo en el que se suministra el potencial, sino por la concentración del monómero y del solvente. La característica clave del proceso de *electrografting* es la fuerte adhesión de una fina capa aislante en la superficie de un substrato conductor polarizado en un potencial apropiado.

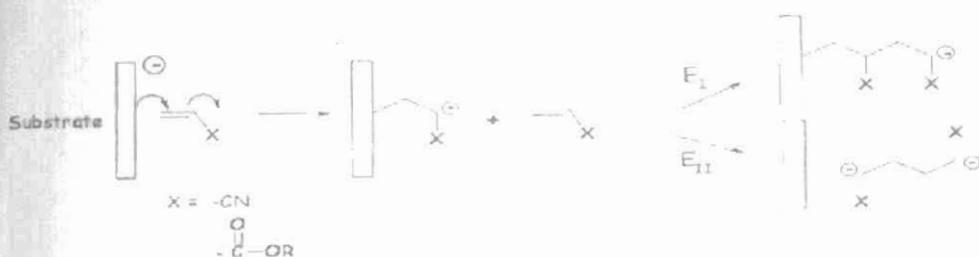
1.2.1. MECANISMO DE ELECTROGRAFTING

El mecanismo de esta muy inusual reacción electroquímica ha sido tema de controversia. Lecayon propuso un mecanismo que consiste en la transferencia de un electrón del cátodo al monómero, con la unión de la especie radical al metal. La cadena de iniciación es por lo tanto un evento electroquímico, en contraste con la propagación que procede a través de la

repetida adición de monómeros a especies anódicas quimisorbidas. Según Jérôme una especie radical sería injertada a la superficie catódica y propagaría la polimerización de AN (5). Una serie de experimentos fueron ideados y llevados a cabo para establecer si el crecimiento de las cadenas injertadas era aniónico o radical. Esas observaciones experimentales son consistentes con el primer esquema, por tanto, con la reducción del monómero acrílico en un anión quimisorbido en el cátodo siempre y cuando el potencial esté en el rango del pico de potencial bajo, es decir, cuando en un voltamograma se obtienen dos picos a potenciales distintos, se puede determinar que el pico al que se da el paso de *electrografting* es precisamente el de menor potencial catódico, ya que según las experiencias cuando se corre el potencial hasta este valor una fina película aparece en la superficie del substrato, en cambio cuando se corre el potencial hasta el segundo pico, ya no aparece dicha película, las conclusiones de los diversos experimentos llevados a cabo para dilucidar este asunto dicen que definitivamente en los dos picos se da una reducción, pero la reducción que se da en el primero es la que causa la polimerización en el cátodo, mientras que si se corre más potencial seguramente el monómero se precipitará y la

polimerización ya no se dará en el cátodo, sino en la solución, por tanto el cátodo sigue sin recubrirse. En otras palabras, un equilibrio entre radical/aniones quimisorbidos y radicales de aniones sin unir es establecido, el cual depende estrechamente del potencial catódico. La muy baja intensidad del primer pico es la característica de la electrodeposición de un polímero aislante. A un potencial más catódico, la quimisorción no es muy efectiva, la intensidad de la reducción del pico 2 incrementa rápidamente, y el rápido acoplamiento de los radical-aniones en dímeros aniónicos es seguido por una propagación en la solución.

Figura 1. 2 Esquema del mecanismo para la electroreducción de un monómero acrílico que depende del potencial aplicado



Elaborado por: Sabine Gabriel (2009)

La elección del solvente es también un parámetro clave para que la técnica de *electrografting* sea efectiva a lo que esto respecta, la donicidad de el solvente es una guía muy útil,

porque un solvente con incrementado número donante tiene menor posibilidad de ser adsorbido en el cátodo, lo cual es conveniente a la hora de adsorber el monómero en la superficie (6). Dimetil Formamida (DMF) es uno de los solventes que se encuentra en la lista de los solventes con número donante alto que puede ser utilizado en *electrografting*.

De Gligio en su publicación determinó que era posible realizar la electrosíntesis de metil metacrilato (MMA) en substrato de titanio mediante un proceso electroreductivo en medio acuoso, produjo además una serie de recubrimientos sobre titanio puro y sus aleaciones de soluciones que contenían el monómero MMA usando voltametría cíclica (CV) como técnica electroquímica. Un rango de potenciales y parámetros de electrolisis (número de ciclos, composición del catolito) fueron explorados para determinar las condiciones óptimas de recubrimiento. Determinó que la presencia del recubrimiento de poli metil metacrilato (PMMA) efectivamente disminuía la liberación de iones del substrato de Titanio (7). La reciente implementación de esta tecnología en agua ofrece prospectos muy optimistas para una larga escala de aplicaciones como el tamaño de las fibras, protección del acero contra la corrosión,

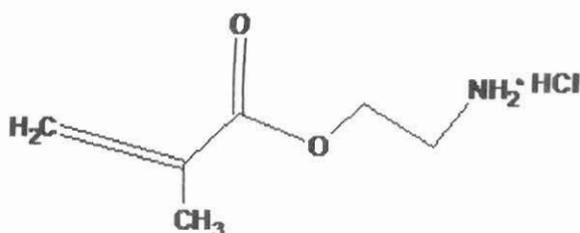
beneficios para el desempeño y la integración en varios ambientes.

1.2.2. AEMA (Aminoetil Metacrilato)

Los monómeros de las aminas primarias pueden ser utilizados para preparar polímeros y copolímeros que contengan una amina primaria funcional colgante, los cuales pueden ser utilizados para facilitar una modificación de dichos polímeros en investigaciones futuras. Estos compuestos se ofrecen en el mercado como puros, cristalinos, y pueden ser utilizados en una variedad de reacciones de polimerización de radicales libres. Sus polímeros neutralizados son muy nucleofílicos y muy reactivos con reactivos electrofílicos.

Estos productos pueden convertirse en muchos tipos diferentes de monómeros intermediarios altamente funcionalizados a través de reacciones estándar como alquilaciones, condensaciones y formaciones heterocíclicas. También pueden ser co-polimerizados con una variedad de co-monómeros, facilitando la síntesis de muchos tipos de aminas que contengan polímeros.

FIGURA 1.3 Molécula de Hidroclorato de Aminoetil Metacrilato



Entre las aplicaciones del monómero que se presenta en la figura 1.3 AEMA, está la preparación de resinas especiales de intercambio iónico y como soporte sólido o base para la inmovilización de ligantes biomoleculares. Se debe tener cuidado para evitar la neutralización de este producto antes de la polimerización, ya que estando neutralizado el monómero se reacomoda a la forma de 2- hidroximetilmetacrilamida. Sin embargo, una vez que el polímero se forma, la espina dorsal del monómero presenta un impedimento estérico para prevenir el arreglo. Entonces, el polímero libre de amina de este producto es muy estable. AEMA es un monómero sólido de color blanco, de una pureza mayor al 98%, su punto de congelamiento está entre los 121 y 124 °C y su densidad a 25°C es de 1.26 g/cm³.

1.3.SELF-ASSEMBLY

Esta técnica combina procesos de bajo costo, condiciones manejables que previenen la degradación del recubrimiento molecular

y la formación de enlaces químicos entre las moléculas y los substratos. Para moléculas pequeñas, el *self-assembly* de soluciones o de estados gaseosos proporciona un buen recubrimiento en poco tiempo. Recubrimientos muy estables son obtenidos de los silanos sobre las superficies oxidadas y los alquenos sobre superficies con silicio. En cambio, los metales nobles con las moléculas que contienen sulfuro tienen enlaces débiles que se pueden romper fácilmente bajo condiciones severas (altas temperaturas, potenciales oxidantes o reductivos, solventes, etc.). Las capas múltiples se pueden obtener por pasos secuenciales, el *self-assembly* es el método de mejor opción para las películas moleculares gruesas para el uso de condiciones moderadas y hasta ahora se ha confinado a ciertos usos tales como electrónica molecular. (3)

1.3.1. SILANIZACIÓN

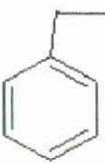
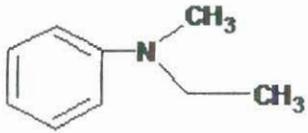
Una de las aplicaciones del *self-assembly* es la *silanización*, en donde se recubre una superficie con moléculas funcionales de alcoxisilanos. Los componentes minerales como mica, vidrio y superficies oxidadas de metales pueden ser silanizadas, debido a que contienen grupos hidroxilos que atacan y desplazan a los grupos alcoxi en los silanos para formar un enlace covalente –

Si-O-Si-. El objetivo de la silanización es formar enlaces a *través del interfaz entre los componentes minerales y los componentes orgánicos. Los grupos funcionales de los alcoxilanos se clasifican de acuerdo a sus propiedades orgánicas, en éste caso se utiliza aminosilanos, ya que la parte de la molécula de interés es la amina primaria o secundaria.*

1.3.1.1. APTES (3- AMINOPROPILTRIETOXISILENO)

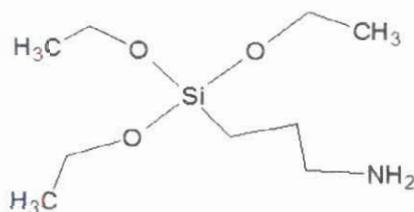
Los compuestos orgánicos que se derivan del amoniaco se los conoce como aminas y se producen cuando se sustituye un hidrógeno del amoniaco por grupos alquilo o arilo. Pueden existir tres tipos de aminas, dependiendo del número de sustituyentes unidos al nitrógeno: aminas primarias, secundarias y terciarias. El APTES es una amina primaria, su nombre químico es 3-aminopropiltriétosisileno, su fórmula molecular se presenta en la figura 1.5.

FIGURA 1. 4 Tipos de aminas

$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}_2$ <p>Amina primaria</p>	 <p>Amina primaria aromática</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Amina secundaria</p>	 <p>Amina secundaria aromática</p>
 <p>Amina terciaria aromática.</p>	

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2011)

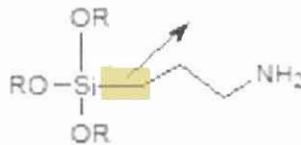
FIGURA 1. 5 Fórmula Molecular de APTES



Es poco probable encontrarla en el ambiente, pues esta molécula es hidrolíticamente inestable, no es fácilmente biodegradable, cuando se añade agua esta molécula se

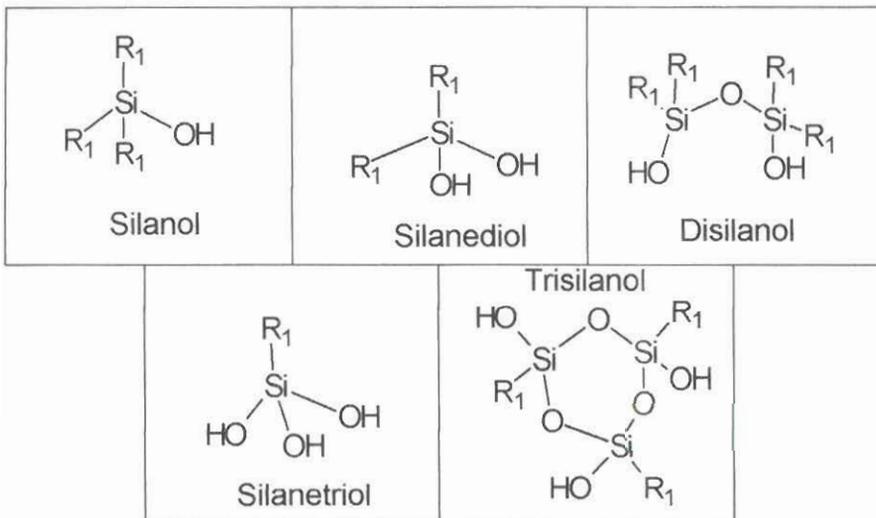
hidroliza generando etanol y derivados de grupos transitorios de silanetrioles, los cuales se entrecruzarán. El enlace Si-C no se somete a hidrólisis, ya que éste si es estable, y el grupo aminopropil no se separa. Solo los grupos etoxi (O-CH₂CH₃) se hidrolizarán y los grupos transitorios de silanoles se condensarán con otros. (9)

Figura 1. 6 Enlace hidrolíticamente estable de APTES



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2011)

FIGURA 1. 7 Compuestos Órgano-Silícicos



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2011)

Las aplicaciones comerciales de este material son numerosas: como agentes de acoplamiento y promotores de la adherencia en la fibra de vidrio, pegamentos y sellantes, resinas de fundición, y en el pre-tratamiento para recubrimientos. En la producción, este material se maneja en sistemas cerrados y generalmente se utiliza en concentraciones menores al 1% como promotor de adherencia y si se desea utilizar como agente de entrecruzamiento se usan del 3% al 5% de APTES.

Las películas de APTES también se utilizan para promover la adherencia de las proteínas y el crecimiento de las células para los implantes biológicos, en los laboratorios en aplicaciones en chips, también se utiliza en la adherencia de nano partículas de metal a substratos de silicio debido a la interacción fuerte entre el grupo amino y las partículas de metal.

Muchos estudios se centran en la caracterización de APTES y otras películas del alcoxisilano, limitándose a investigar las variables de la reacción o condiciones de la

deposición sin tener una guía clara para el mejor método de formación de la película. Consecuentemente, existe una amplia gama de condiciones para la deposición de las películas de APTES. Sin embargo, existen algunos mecanismos básicos que han sido establecidos. La hidrólisis del silano conduce a adherirse el APTES al substrato dando por resultado enlaces de siloxano en la superficie del substrato. Los grupos funcionales básicos tales como aminas se catalizan en donde la reacción de la hidrólisis conduce a una formación más agresiva de una mono-capa. El paso inicial de la hidrólisis puede ocurrir en la solución o en la superficie del substrato dependiendo de la cantidad de agua presente en el sistema. Un exceso de agua da lugar a la polimerización excesiva en la fase solvente, mientras que una deficiencia del agua da lugar a la formación de una mono-capa incompleta. (10)

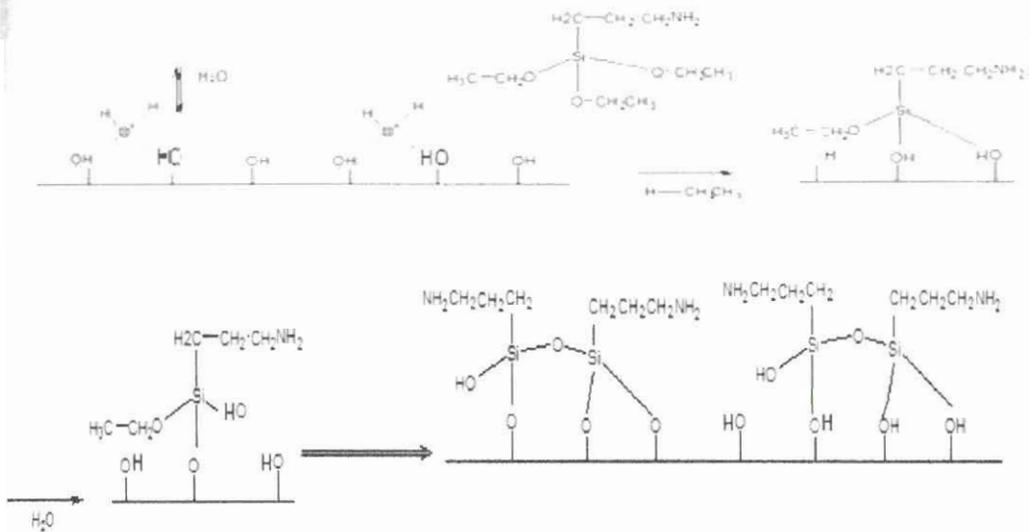
1.3.1.2. MECANISMO DE REACCIÓN DE LA SILANIZACIÓN

El agente que se adhiere a la superficie del titanio es un aminosilano, compuesto de un grupo alcoxi y un grupo amino. Cuando se coloca el titanio oxidado en la solución

de APTES con un constante movimiento, se produce una hidrólisis, donde el grupo alcoxi se convierte en grupos hidroxilos, formando alcohol.

Además los grupos hidroxilos se condensan uno con otro debido a una deshidratación de condensación. Como resultado los grupos hidroxilos se enlazan químicamente con la superficie del titanio, logrando tener una alta adhesividad.

FIGURA 1. 8 Mecanismo de reacción de la Silanización

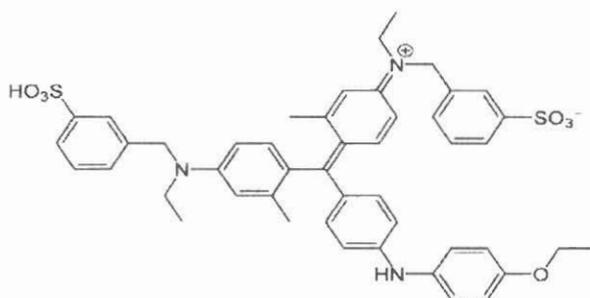


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

1.3.1.2.1. AZUL BRILLANTE DE COMASSIE

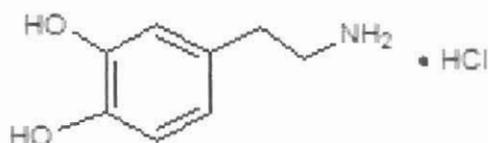
Es un colorante para proteínas muy utilizado en técnicas de cuantificación celular, es de tipo aniónico y se une a las proteínas de un modo no especificado. Este colorante se conecta en todas las proteínas de la célula y, a partir de la intensidad de memoria generada, es posible establecer una relación de la intensidad del color (absorbancia) y cantidad de células. Predomina la no polaridad en su estructura por lo que solo se utiliza el 0,0025% en disolución con metanol al 40% y acético al 7%. Aquellas proteínas que son de gel se fijan al ácido acético y al mismo tiempo se tiñen. El colorante en exceso se puede eliminar con una disolución de composición idéntica excepto por el colorante.

FIGURA 1. 9 Estructura de Azul Brillante de Comassie



1.3.2. RECUBRIMIENTO CON DOPAMINA

Figura 1. 10 Molécula de dopamina



Según su estructura química, la dopamina es una feniletilamina, una catecolamina que cumple funciones de neurotransmisor en el sistema nervioso central. La dopamina tiene la fórmula química $C_6H_3(OH)_2-CH_2-CH_2-NH_2$. Su nombre químico es 4-(2-aminoetil) benceno-1,2-diol. Es una amina primaria debido a que tiene dos enlaces de hidrógeno sustituidos. Se la conoce como dopamina porque es una monoamina, y su precursor sintético es la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa). La dopamina no es solo un precursor de la adrenalina y de la noradrenalina sino también un neurotransmisor. El clorhidrato de la dopamina es un polvo blanco cristalino grisáceo, que puede tener un olor leve de ácido clorhídrico. Es libremente soluble en agua y soluble en alcohol. La dopamina HCl es sensible a los álcalis, a las sales de hierro, y a los agentes oxidantes. Químicamente se lo conoce como 4-(2-aminoetil) pirocatecol hidrociorado, y su

fórmula molecular es $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$. El peso molecular es 189.64. Se debe evitar condiciones de calor, humedad y luz. Las soluciones de dopamina son sensibles a la luz y deben ser protegidas de ella, ya que en presencia de luz se descompone y se decolora, se observan tonos de amarillo, café o de rosado a púrpura. Cuando la solución tiene una coloración oscura, ésta se debe desechar inmediatamente.

La dopamina y otros compuestos de catecol hacen un buen trabajo en el recubrimiento de superficies inorgánicas, pero se ha encontrado que en superficies orgánicas no se desempeñan bien. La presencia de ambos grupos funcionales (catecol y amina) es crucial para que logre una adhesión en una variedad de materiales, creando una poderosa herramienta, ya que se puede depositar una capa fina de una película de un polímero en cualquier superficie espontáneamente, además esta película se puede adaptar a cualquier uso funcional. Para lograr un recubrimiento en particular se debe sumergir el sustrato en una solución acuosa diluida de dopamina, utilizando un búfer de un pH típico de ambiente marino, para el presente caso de estudio 2 mg de dopamina en 10nM tris, pH 8.5.

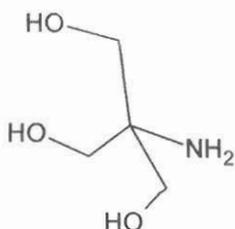
1.3.2.1. TRIS BÚFER

Es un compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Es una amina primaria, tiene un equilibrio ácido-base es por eso su capacidad tamponante. Es un polvo blanco, con peso molecular de 121.14 g/mol. Utilizado comúnmente para investigaciones donde se preparan soluciones tampón. Su pH es de 10,4 que al prepararse diluyendo en agua se tiene un líquido claro e incoloro. (11)

Existen varios métodos para obtener un búfer. La forma básica, que es la de una amina no ionizada, es el tris base en el que se ajusta el pH con H^+ . Si se desea una forma ácida, conocido como el Tris•HCl, se ajusta el tampón con OH^- , cabe recalcar que Tris•HCl solo es una denominación, no necesariamente se ha preparado con hidrocloreuro de Tris, ya que es posible que se haya preparado una Tris base y se ha ajustado el pH con ácido clorhídrico. También se pueden mezclar dos soluciones de Tris•HCl y Tris base hasta un pH deseado.

Se utiliza a menudo como búfer debido a que es una sustancia inocua para la mayor parte de las proteínas, su pK_a es de 8,5 a 20°C lo que lo hace un búfer idóneo para el intervalo de pH entre 7 y 9, lo cual coincide con el pH fisiológico de los seres vivos. El pK_a disminuye 0,03 unidades por cada grado centígrado que incremente la temperatura.

FIGURA 1. 11 Molécula de Tris-Búfer



1.3.3. RECUBRIMIENTO CON GELATINA

Una vez que se ha depositado la amina en la superficie del titanio se necesita conocer si ésta es capaz de enlazarse con un biopolímero. De este modo, se utiliza un recubrimiento de gelatina. El producto final varía de acuerdo a lo que ocurre en la reacción, al tiempo de la misma y a las condiciones del medio. Se utiliza la gelatina tipo B para el recubrimiento, si se utiliza APTES además de la gelatina se coloca EDC para que ésta se

pueda enlazar a la superficie. La gelatina se la diluye en dos tipos de medios acuosos, que son en agua y en MES.

1.3.3.1. GELATINA B

La gelatina es una proteína soluble en agua compuesta por una variedad de aminoácidos conectados a enlaces de amidas que conllevan a un polímero lineal. Se obtiene por hidrólisis parcial irreversible del colágeno procedente del tejido conectivo de despojos animales hervidos con agua. La unidad básica en el colágeno está constituida por tres cadenas de polipéptidos que se encuentran dobladas en forma de hélice y fijadas por uniones intermoleculares, lo que hace que tenga propiedades mecánicas notables y que constituya la estructura del tejido conectivo de la piel, los tendones, los cartílagos y los huesos de los animales. La gelatina es un polímero compuesto por aminoácidos, es decir, una proteína compleja. La propiedad primordial de ésta es su comportamiento frente a las distintas temperaturas, con el agua caliente se derrite mientras que con el agua fría se hincha y se solidifica. La mayor composición es la

proteína con un 84-90%, contiene sales minerales entre 1-2% y el resto es solo agua.

Existen dos tipos de gelatina que se distinguen de acuerdo con el proceso el de su producción: la gelatina tipo A, la cual se obtiene por la hidrólisis ácida del colágeno, es decir contiene un pH 3.8-6, en el punto iso-eléctrico, y el pH es 6-8 cuando la carga neta del polímero es cero y la gelatina tipo B que se produce por tratamiento alcalino del colágeno, es decir, que contiene un pH 5-7.4, y en el punto iso-eléctrico va ser un pH 4.7-5.3. (12)

La gelatina de tipo B es diferente de la de tipo A, debido a la hidrólisis del grupo amida, en donde la aspartina y la glutamina son convertidos a ácido aspártico y ácido glutámico. Los grupos ácidos extras reducen el punto iso-eléctrico de la gelatina.

1.3.3.1.1. MES Ácido 2-(N-morfolina) etanosulfónico

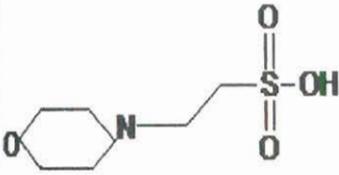
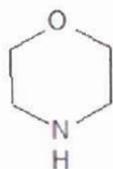


Figura 1. 12 MES:
Ácido 2-(N-morfolina)
etanosulfónico

MES es el nombre abreviado para el compuesto ácido 2-(N-morfolina) etanosulfónico. En su estructura química contiene un anillo de morfolina (C_4H_9ON). Tiene un peso molecular de 195,2 g/mol y su fórmula química es de $C_6H_{13}NO_4S$. Este compuesto es utilizado como agente tampón en biología y bioquímica, tiene un valor de pK_a 6,15 a $20^\circ C$. Este búfer se desarrolló teniendo un criterio de que el pK_a sea intermedio, la solubilidad máxima de agua y una solubilidad mínima con el resto de solventes, efectos mínimos de salinidad, mínimos cambios de pK_a con respecto a la temperatura, que sean químicamente y enzimáticamente estables, mínima absorción en la gama espectral visible o ultravioleta y razonablemente fácil para ser sintetizada. El punto de fusión es a $300^\circ C$, es soluble en agua hasta 2M. Para el caso de estudio, el pH debía encontrarse entre 4,5 y 5.

Figura 1. 13 Anillo de morfolina

El anillo de morfolina es un grupo orgánico, que se encuentra formado por un grupo amino y un grupo éter en un heterociclo. La amina, morfolina es una base y su ácido conjugado se llama morfolinium. Se utiliza la morfolina porque su volatilidad es similar a la del agua, así que una vez que se agrega al agua, su concentración se distribuye uniformemente en las fases del agua y del vapor. La morfolina por ser una amina secundaria experimenta la mayoría de las reacciones químicas típicas aunque la presencia del oxígeno del éter retira la densidad electrónica del nitrógeno, haciéndola menos nucleofílica y menos básica. Es comúnmente utilizada como solvente debido a su bajo costo y a su polaridad.

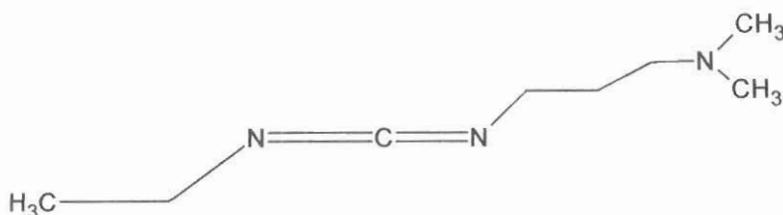
1.3.3.2. EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)

El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida con fórmula molecular $C_8H_{17}N_3$, es un compuesto soluble en agua que generalmente se obtiene como clorhidrato, es empleado comúnmente en un rango de pH 4.0-6.0, se utiliza como agente activo de carboxil para el acoplador de aminas primarias para alcanzar enlaces de amida. Es usado como reticulante químico para el colágeno, reaccionando con los grupos del ácido carboxílico del polímero del colágeno que puede entonces enlazarse al grupo amino en la mezcla de reacción.

Adicionalmente, EDC puede usarse también para activar grupos fosfatos. Entre los usos comunes de este carbodiimida están las síntesis de péptidos, las proteínas reticulante a los ácidos nucleicos y a las preparaciones de inmunoconjugados. EDC es usualmente combinado con N-hidroxisuccinimida (NHS) o sulfo-NHS para incrementar la eficiencia o crear un producto amina reactivo-estable. El EDC es también usado en la química orgánica para acoplar un ácido carboxílico a un alcohol

usando DMAP (4-Dimethylaminopyridine) como un catalizador. (13)

FIGURA 1. 14 Estructura de EDC



1.3.4. PBS BÚFER

El búfer fosfato salino, conocido como PBS por sus siglas en inglés, es una solución tampón usada en generalmente en investigaciones biológicas. Es una solución de agua de base salina que contiene cloruro de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio y fosfato de potasio. El objetivo de los búferes es ayudar a mantener un pH constante, debido a que la molaridad y las concentraciones iónicas de la solución usualmente se asemejan a los del ser humanos, siendo isotónicos. Este tampón se utiliza en muchas ocasiones debido a que es isotónico, la concentración de soluto es la misma fuera y dentro de una célula, y no es tóxica para la misma. Puede ser utilizado para diluir sustancias, para enjuagar contenedores que contienen células. Además puede usarse como diluyente en

métodos para secar biomoléculas, como moléculas de agua que se encuentran estructuradas en el interior de una sustancia por ejemplo las proteínas, para ser secadas e inmovilizadas a una superficie solida. La fina película de agua que ata a la sustancia previene la desnaturalización u otros cambios de ajustes. Se podría utilizar éste búfer para tomar un espectro de referencia al medir la adsorción de la proteína en elipsometría. Generalmente, PBS contiene 137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 con un pH de 7,4.

CAPÍTULO II

2. TRABAJO EXPERIMENTAL

En el capítulo de trabajo experimental se presentan los distintos aspectos que se tomaron en cuenta en la experimentación. Los experimentos fueron realizados desde Febrero del 2010 hasta Mayo del 2010 en la Universidad de Gante, en Bélgica. Las experiencias relacionadas con la técnica de *electrografting* fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Electroquímica, en el Departamento de Inorgánica y Físico-Química a cargo de Ph. D. Katrien Strubbe, quien supervisó periódicamente el avance de la experimentación, y quien determinó si se seguía o no con determinados parámetros, en base a los resultados que se presentaron. Los experimentos relacionados con la técnica de *self assembly* fueron

realizados en el Laboratorio de Química Orgánica de la misma universidad a cargo de Ph.D. Els Vanderleyden.

2.1. ELECTROGRAFTING

Para la experimentación se partió de literatura revisada, debido a que es un tema nuevo, es decir, se ha probado que la técnica de *electrografting* es adecuada para recubrir ciertos materiales semiconductores con polímeros, lo cual es muy útil en el campo de la electrónica, sin embargo, tratar de recubrir un metal conductor con un polímero que contenga una amina, con la finalidad de hacer de éste un material biocompatible para ser utilizado como injerto de huesos en el ser humano es relativamente nuevo, por lo cual se empezó desde lo básico, ya que todos los experimentos debían realizarse con la mayor cantidad de variaciones posibles para poder comparar, es decir, realizar blancos, pruebas con soluciones con oxígeno y sin él, utilizar solventes orgánicos e inorgánicos, variar los límites de potenciales, etc. Los distintos reactivos utilizados fueron seleccionados en base a artículos experimentales publicados anteriormente referentes a *electrografting* y titanio. Los nombres de los experimentos nos dicen el tipo de monómero utilizado (las dos primeras letras, AE para AEMA y AN para acrilonitrilo), el solvente

utilizado (el primer número, 1 para DMF y 0 para ADD), y el número de experimento realizado (los tres últimos números).

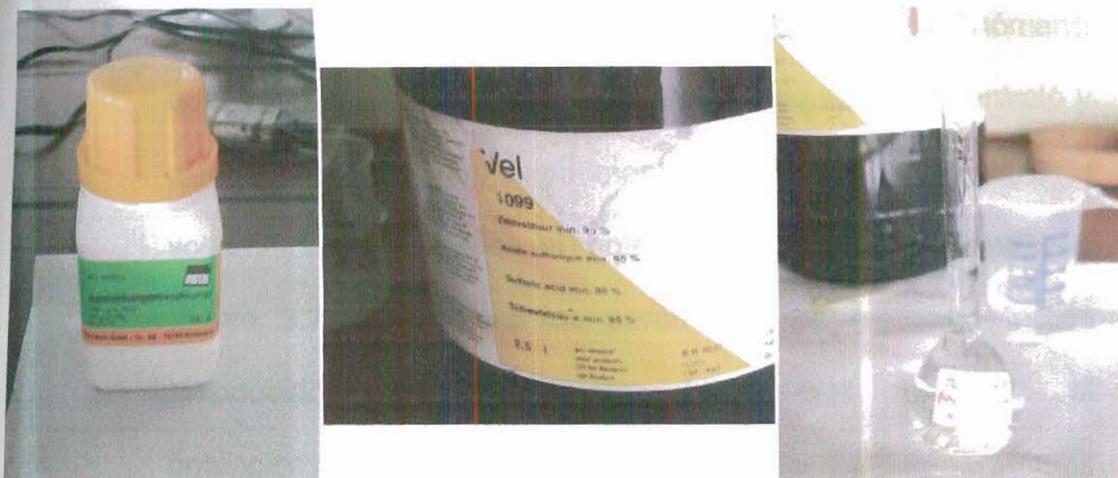
2.1.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

TABLA I Reactivos utilizados en la técnica de Electrografting

NOMBRE DE LOS REACTIVOS	FÓRMULA	PESO ATÓMICO, DENSIDAD	LABORATORIO
AEMA (Aminoetil metacrilato hidrocloreto)	$C_6H_{11}NO_2 \cdot HCl$	165.62 g/mol	SIGMA
TBAP (tetrabutilamonio perclorato)	$C_{16}H_{36}NClO_4$	341.92 g/mol	FLUKA
TEAP (tetraetilamonio perclorato)	$C_8H_{20}NClO_4$	229.71 g/mol	ACROS ORGANICS
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	98.07 g/mol, 95%	VEL
Persulfato de amonio	$(NH_4)_2S_2O_8$	228.20 g/mol	ROTH
AN (acrilonitrilo)	C_3H_3N	53.06 g/mol	FLUKA
DMF (dimetilformamida)	C_3H_7NO	73.10 g/mol	ROTH
ADD (agua doblemente destilada)	H_2O	18 g/mol, 1 g/mL	NA
Ácido nítrico	HNO_3	63.02 g/mol, 1.41 g/mL, 69%	MERCK
Titanio	Ti	47.87 g/mol	CHEMPUR
Ácido fluorhídrico	HF	20.01 g/mol, 1.13 g/mL, 38-40 %	MERCK
Acetona	C_3H_6O	58.08 g/mol	ROTH
Persulfato de potasio	$K_2S_2O_8$	270.33 g/mol	MERCK

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Figura 2. 1 Fotografías de algunos de los reactivos usados en *Electrografting*



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

TABLA II Equipos utilizados en la técnica de *Electrografting*.

Equipo	Modelo	Compañía
Potenciostato-Galvanostato	Modelo 263 A	Princeton Applied Research
SCA (Ángulo de Contacto Estático)	Programa OCA 20, camera CCD	Dataphysisc USA
pH metro	Modelo PHM210	Radiometer Copenhagen
Espectrómetro de masas/ionización por electroespray	ND	ND

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

2.1.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En *electrografting* se utiliza la diferencia de potencial como iniciador de una reacción, por lo cual, la clave de la experimentación está en el correcto ensamblaje de una celda

electroquímica (figura 3.4) y en contar con un equipo que permita investigar de manera electroquímica algún fenómeno que ocurra en la superficie del titanio. El equipo que controló y ejecutó los diferentes experimentos electroanalíticos como la voltametría cíclica fue un potenciostato/galvanostato 263 A (figura 3.2). Los diferentes parámetros de medición fueron introducidos en el programa M270 que manejaba el potenciostato, las curvas que resultaban de las diferentes mediciones fueron exportadas a una hoja de cálculo, con la finalidad de analizar y comparar los resultados de las diferentes celdas electroquímicas a las que se les aplicó alguna modificación. La técnica de voltametría cíclica permite conocer si una especie es electroactiva, ya que la aparición de un pico de corriente a un potencial dado indica si el material está envuelto en la reacción y ésta es una forma de caracterizar un sistema electroquímico. De las técnicas electroanalíticas conocidas, ésta se utiliza por lo general al inicio de una investigación ya que a pesar de que da resultados generales, es útil para discriminar si es factible o no continuar con dicha experimentación o con dichos parámetros.

El diseño y ensamblaje de la celda electroquímica depende de la técnica y de los requerimientos del sistema a ser estudiado, en éste caso se utilizó una celda de tres electrodos: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo contador.

- El electrodo de trabajo fue una placa de titanio puro de 2.1 x 2.1 cm cuya área activa fue de 1.54 cm², ya que se necesitó conocer si ocurría algo en la superficie cuando se variaba la intensidad de corriente en función del tiempo en un rango de potencial determinado, es por ello que el pretratamiento del electrodo de trabajo fue crucial en esta experimentación, ya que se requería anular la posibilidad de que las curvas que arrojaban los experimentos fueran sobre una capa de óxido de titanio y no sobre titanio puro, es por ello que antes de ensamblar la celda era necesario sumergir la placa de titanio en una solución HF (1% v/v) | HNO₃ (10% v/v), durante dos minutos con el fin de eliminar la capa de óxido presente en la superficie de la placa de titanio, y luego enjuagar con ADD la placa con el fin de limpiar por completo el titanio.

- El electrodo contador, el cual consistía en una malla de platino, la cual fue sumergida en HNO_3 (20% v/v) durante tres minutos y se enjuagó con ADD por un minuto o con acetona dependiendo del solvente que haya sido utilizado, si era orgánico o inorgánico.
- El electrodo de referencia, electrodo de calomel, el cual se mantenía en una solución saturada de cloruro de potasio y cuando iba a ser utilizado se enjuagaba con ADD o con acetona, dependiendo del tipo de solvente en el que estaba sumergido.

Las soluciones utilizadas en la celda electrolítica fueron preparadas en matraces volumétricos lavados con detergente y enjuagados con ADD cada vez que iban a ser usados, los reactivos que formaban las soluciones fueron debidamente pesados en una balanza analítica. Los solventes utilizados fueron DMF y ADD. Debido a que el monómero que se intentó injertar en la superficie del titanio no formaba una solución electrolítica fue necesario el uso de electrolitos como TBAP (tetrabutilamonio perclorato), TEAP (tetraetilamonio perclorato) o persulfato de amonio con el fin de obtener una solución

electrolítica fuerte. Los monómeros utilizados fueron AEMA (aminoetil metacrilato) y AN (acrilonitrilo). El doble enlace de un extremo de la molécula permite la posibilidad de que se injerte a la superficie del titanio durante un proceso electroquímico y el grupo amino del otro extremo permitiría la formación del polímero que puede interactuar con las moléculas del cuerpo humano con el fin de que exista mejor biocompatibilidad. Para poder analizar las curvas de la voltametría cíclica fue necesario retirar el oxígeno presente en la solución, éste fue removido haciendo pasar nitrógeno a través de la solución en una botella de lavado durante al menos 20 minutos en un sistema cerrado, con ello se eliminaba la posibilidad de que el pico que se presente en las curvas resultantes sea producto de la reducción del oxígeno presente en la solución. El cilindro de vidrio que contenía la solución y formaba la celda electroquímica fue sumergido en HNO_3 (20% v/v) durante tres minutos y enjuagado con ADD o acetona, se utilizaba 2 mL de solución por cada ensayo.

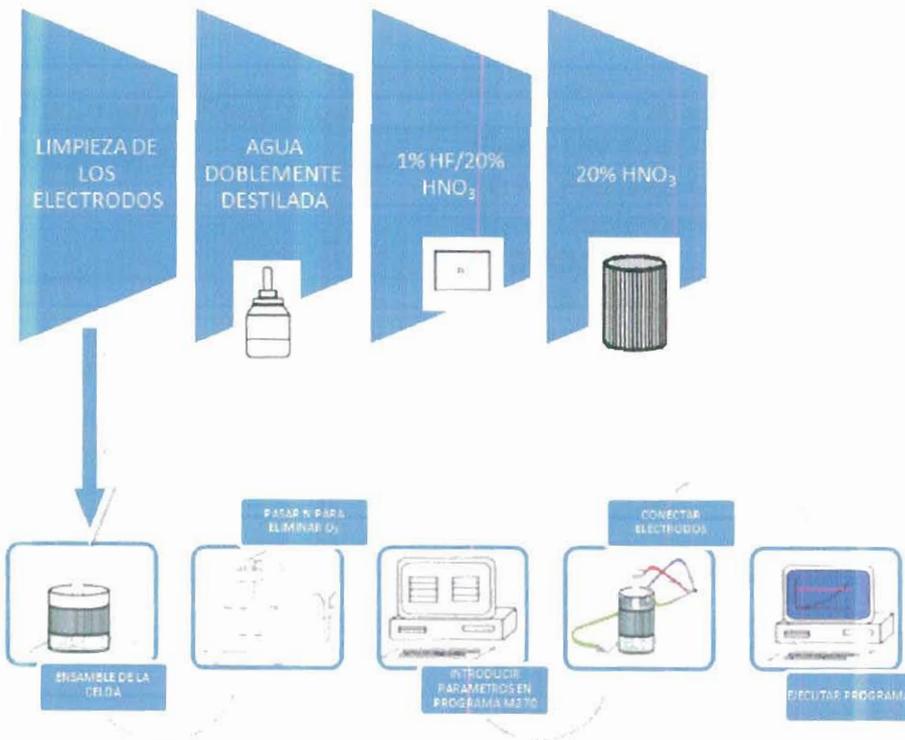
En síntesis, primero se preparó la solución electrolítica, luego se ensambló la celda electroquímica, se purgó el oxígeno de la solución y luego se conectó los diferentes electrodos al

potenciostato, el cual tenía previamente introducidos los diferentes parámetros en el software, se corría el experimento designado y una vez terminadas las diferentes corridas del experimento se exportó los datos a una hoja de cálculo, con el fin de analizar los resultados. En algunas ocasiones se guardó las soluciones que habían sido alteradas electroquímicamente con el fin de analizarlas posteriormente. Las técnicas electroanalíticas además de provocar el cambio electroquímico que necesitó la reacción, sirvió para identificar tentativamente si pasó algo en la superficie del titanio con las diferentes variaciones de monómero, de solvente, de rango de potencial, pero esto no fue completamente determinante, por ello se necesitó la realización de ensayos posteriores al cambio electroquímico al que fue sometido el titanio, con la finalidad de comprobar si existió o no un cambio sustancial en dicha superficie, para ello se utilizó distintas técnicas como la medición del Ángulo de Contacto Estático (*SCA Static Contact Angle*), para comparar superficies hidrofílicas e hidrofóbicas, además para observar la superficie del titanio se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido (*SEM Scanning Electron Microscope*), para medir rugosidades se seleccionaron las muestras más representativas para realizar pruebas en

Microscopio de Fuerza Atómica (*AFM Atomic Force Microscope*), además para descartar o comprobar la posibilidad de que el monómero polimerice en la solución antes de que interactúe con los átomos de titanio se realizó pruebas de Espectrometría de Masas por Ionización de Electro spray (*ESI-MS Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry*).

2.1.3. ESQUEMA DE EXPERIMENTACIÓN EN ELECTROGRAFTING

Figura 2. 2 ESQUEMA DE EXPERIMENTACIÓN EN ELECTROGRAFTING



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2011)

2.2.SELF ASSEMBLY

2.2.1. REACTIVOS

TABLA III Tipos de Titanio utilizados en la técnica de Self-Assembly

Titanio	Láminas (99,6% puro, distribuida por Chempure)
	Placas (2do grado comercial, ASM 4902 F- distribuida por Nippon Steel Corporation)
	Pulido (3,3 de radio y 0,5 de espesor)

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

TABLA IV Soluciones y reactivos utilizadas en la técnica de Self-Assembly.

Soluciones y Reactivos	Características
Ciclo hexano, C ₆ H ₁₂	Fiers, UN 1145
HCl	10 N, Panreac Quimica S.A.
ADD	Agua Doblemente Destilada, >18MΩcm.
H ₂ O ₂	30 wt% solución en agua, Aldrich
NH ₄ OH	25% solución en agua, Acros
Pentano, C ₅ H ₁₂	Chromasolv, 99% puro, Sigma-Aldrich.
APTES, C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	99%, Acros
Dopamina, C ₈ H ₁₁ NO ₂ ·HCl	2 mg/mL, Sigma
Gelatina Tipo B	Rausselet
Búfer fosfato Salino, PBS	pH = 7,4
Mes	pH = 4,5-5
Ácido sódico, NaN ₃	Para regular el pH de un búfer.
Tris búfer	10 mM ; pH = 8,4
EDC	Sigma-Aldrich, Grado comercial
Azul brillante de coomassie	1g de coomassie en 100 mL de MeOH.
Metanol	>99,85% puro, distribuido por Fiers

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

2.2.2. EQUIPOS

TABLA V Equipos utilizados en la técnica de Self-Assembly

Equipos	Características
Baño ultrasónico	Bransonic 3210 Branson
Calentador eléctrico	Labotech EM 33000 T
Agitador de plataforma orbital	Heidolph Instruments Unmax 1010
Sistema de purificación de agua	synergy uv millipore, millipak express 20; 0.22um
Incubadora con agitación	Julaba sw22
Equipos	Características
Ángulo de Contacto Estático	OCA20, Benelux Scientific
Espectrómetro Elipsométrico (SE)	FLS 300 Xe Arc Light Source, Base-160, LOT ORIEL GRUPPE EUROP
Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)	Veeco Instruments Inc.
Microscopio electrónico de barrido (SEM)	PHENOM, FEI, Griffin Technology Hp L1706
SEM-EDS	JEOL-JSM 5600

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

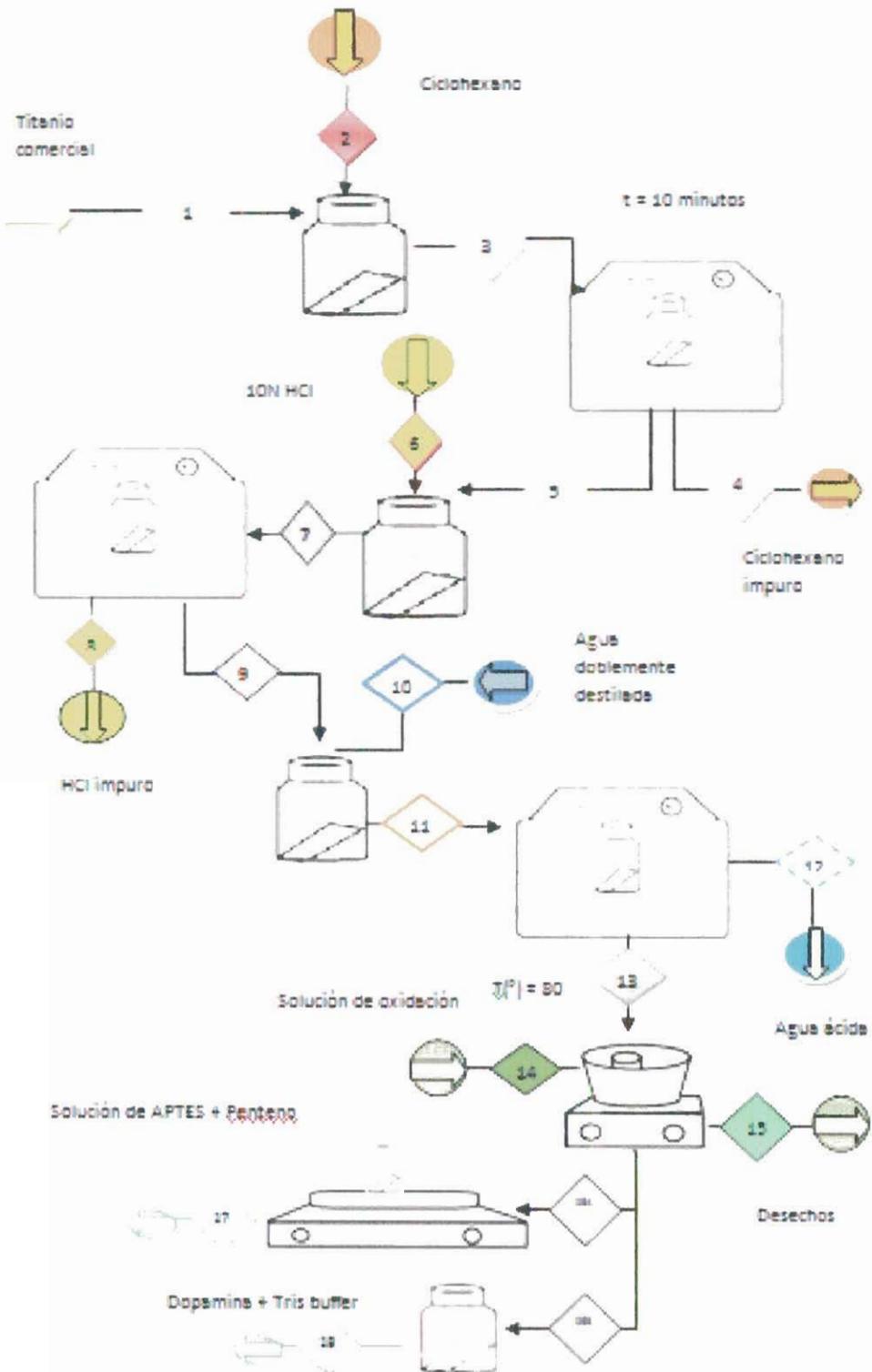
2.2.3. ESQUEMA DE LA EXPERIMENTACIÓN EN SELF-ASSEMBLY

El esquema de experimentación de self assembly se presenta en la figura 2.3 tiene la siguiente leyenda:

1. Titanio comercial se coloca en un frasco.
2. Se introduce ciclohexano en el frasco que contiene titanio.

3. Se somete a baño de ultrasonido para remover impurezas, grasas, etc.
4. Se desecha el ciclohexano con impurezas.
5. El titanio sin impurezas del ambiente se coloca en otro frasco.
6. Se le agrega 10N HCl.
7. Se desoxida con un baño de ultrasonido.
8. Se retira el HCl para desecharlo.
9. Se introduce el titanio desoxidado en otro frasco.
10. Se le coloca agua doblemente destilada para remover el cloro de la superficie del titanio.
11. Una última limpieza ultrasónica.
12. Se desecha el agua ácida.
13. El titanio pre-tratado se oxida para tener más enlaces de hidroxilo.
14. Se introduce una solución de hidróxido de amonio, peróxido de hidrogeno y agua, en baño maría hasta 80°C.
15. Se retira la solución para oxidar.
16. Adición de la amina.
 - a. Solución con APTES en pentano con agitación.
 - b. Solución de Dopamina con Tris-buffer en un frasco oscuro.

Figura 2. 3 Esquema de experimentación en self-assembly



Elaborado por: 1 Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

2.2.4. METODOLOGÍA

2.2.4.1. PRETRATAMIENTO EN SELF ASSEMBLY

Antes de comenzar la modificación del titanio, se necesitó realizar una serie de pasos previos para poder llegar a la biocompatibilidad del mismo. Se utilizó tres presentaciones de titanio distintos para la realización de los análisis.

El pretratamiento consistió en una limpieza de la superficie para remover las partículas suspendidas del aire que se depositaron en el titanio. La limpieza de la superficie consistió en tres pasos:

1. Se colocó la muestra en un frasco y se agregó ciclohexano hasta que toda la superficie de la placa de titanio fue cubierta, se tapó el frasco y se agitó la muestra utilizando un baño de ultrasonido por 10 minutos, con ello se pretendió remover la suciedad de la superficie del titanio. Mediante unas pinzas se sacó la muestra del frasco manteniendo hacia arriba el lado del titanio que se

limpió, se enjuagó con acetona y se secó ambos lados de la muestra utilizando aire a presión.

2. Se introdujo la muestra en un frasco que contenía HCl 10N, colocando el lado tratado hacia arriba, se limpió mediante ultrasonido por 30 minutos. Una vez que transcurrió este tiempo se enjuagó la muestra con ADD y se secó con aire.

3. Se ubicó la muestra dentro de un frasco que contenía ADD, y se lo llevó al ultrasonido durante 30 minutos.

2.2.4.2. OXIDACIÓN EN SELF ASSEMBLY

La muestra de titanio que se encontraba libre de impurezas del ambiente fue sometida a una reacción de oxidación. El pretratamiento que se utilizó en el paso anterior fue severo, ya que no solo se removieron las impurezas sino también algunas capas de superficie, es por eso que se necesitó oxidar debido a que ya no

existían en esta etapa muchos grupos hidroxilos adheridos a la superficie del titanio.

La muestra de titanio se introdujo en un frasco que permitió que toda su superficie fuera recubierta. Cuando se usó placas de titanio se colocó una proporción de 5 mL de ADD, 1.5 mL de peróxido de hidrógeno y 1.5 mL de hidróxido de amonio, y cuando se utilizó láminas de titanio se usó 0.5 mL de peróxido de hidrógeno, 0.5 mL de hidróxido de amonio y 2.5 mL de ADD.

Se colocó la muestra en un recipiente a baño María a 90°C para que la reacción se efectuara a 80°C por 20 minutos. Después se retiró el frasco con precaución y se enjuagó la muestra con ADD, luego con acetona y finalmente se lo secó con aire a presión.

Para realizar una silanización o un recubrimiento con dopamina se debe realizar tanto el pretratamiento como

la oxidación de la muestra de titanio. En esta etapa del proceso el titanio ya es biocompatible (14)

Para el método de *self-assembly* se decidió usar dos técnicas para observar cual daría mejores resultados: la silanización que consiste en la deposición de moléculas orgánicas como los alcoxisilanos sobre un substrato metálico como el titanio y la deposición de la molécula de dopamina sobre la superficie del titanio.

2.2.4.3. SILANIZACIÓN

Se lavó el recipiente que se utilizó para la silanización con ADD y acetona, se lo secó con aire y se lo llevó al horno a 105 °C durante media hora, debido a que no era favorable que existiera agua en la placa.

Para la silanización se hizo ensayos con diferentes concentraciones y diferentes tiempos de reacción para observar cuál fue el mejor. Se utilizó concentraciones de 1% y 5% de APTES, y el tiempo de reacción fue de 1h y 24h. Las soluciones se prepararon con pentano. Una vez que el titanio se oxidó, se enjuagó y se secó, se lo colocó

en un frasco que contenía la solución de pentano y APTES con la concentración que se determinó para el estudio, se procuró además colocar la superficie que se trató y oxidó hacia arriba, se tapó y selló con una cinta plástica para evitar el ingreso de aire al frasco. Se dejó en una plataforma de agitación eléctrica con baja vibración el tiempo que se estipuló para la reacción. Una vez que transcurrió ese tiempo se retiró la muestra y se lo enjuagó con pentano y se lo secó con aire.

En ciertos análisis, se colocó las muestras en incubación con una solución de PBS con $\text{pH} = 7.5$ a 37°C . El tiempo de incubación dependió de la técnica, para los ensayos en APTES se incubó por 2h y 24h. Después se lo enjuagó con ADD y se lo secó con aire.

A algunas de las muestras que estuvieron inmersas en la solución de APTES, se les colocó gelatina B como biopolímero. Dependiendo de la técnica, la preparación de la solución fue diferente, para las muestras que fueron tratadas con APTES se preparó una solución de 5 mg/mL de gelatina tipo B en agua, se colocó la muestra

en esta solución, se la agitó y se la dejó reaccionar durante una hora, después transcurrido este tiempo se la colocó en una solución de 100 mg/mL de EDC en agua, y se lo dejó reaccionar durante 4 horas. Finalmente se la enjuagó con ADD y se secó con aire a presión.

2.2.4.4. RECUBRIMIENTO CON DOPAMINA

Para el recubrimiento con dopamina, se preparó una solución de 2 mg/mL de dopamina con TRIS búfer 10 mM con un pH= 8.4. Se colocó las muestras dentro del frasco oscuro que contenía esta solución, se tapó y se cubrió con papel de aluminio debido a que la dopamina es fotosensible. Para la deposición con dopamina no se varió las concentraciones sino el tiempo de reacción, que fueron entre 3h y 24h. Al igual que en la silanización se realizó incubación en PBS y tuvieron un tiempo de reacción de 24h, no se varió el tiempo de incubación.

Para los ensayos que fueron sumergidos en biopolímeros, se utilizó una solución de 2 mg/mL de gelatina B en una solución de TRIS búfer, se colocó la

muestra y se llevó a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

2.2.4.5. COLORACIÓN

Para esta prueba se utilizó una muestra de titanio oxidada y las sometidas a reacciones con concentraciones de 1% y 5% de APTES, para ambas se usó un tiempo de reacción de 1h y 24h. Además, se hicieron muestras en gelatina con EDC. En cambio, para la dopamina se usó un tiempo de reacción de 3h y 24h, y muestras en gelatina.

Una vez que se realizó las muestras, que en total fueron 15, se procedió a colocar el titanio en una bandeja clara, se colocó 2 gotas de azul de comassie. Este es un colorante con una sensibilidad de 1 g/mm². La prueba consistió en teñir de azul la lámina de titanio, se esperó 30 minutos y una vez transcurrido este tiempo se enjuagó con metanol. Se llevaron las muestras para análisis mediante SEM y se observaron las superficies de la lámina de titanio.

2.2.4.6. VARIACIÓN DE SOLVENTE EN LA GELATINA

Se varió las condiciones de reacción al colocarle gelatina a las muestras que tenían APTES en las concentraciones de 1% y 5% con tiempo de reacción por 24 horas. La gelatina fue disuelta en dos tipos de medios, la primera fue en agua y la segunda en búfer. Para el búfer se usó una solución de 543 mg de MES y se colocó en 250 mL de ADD. Se puso en un matraz y se introdujo un agitador magnético, se midió el pH y cuando estuvo básico se le colocó NaN_3 y se agitó continuamente. Se debía mantener el pH entre 4,5 - 5 y si no bajaba el pH se colocaba poco a poco 0,05 N HCl hasta que llegara a un pH ideal, en éste caso fue de 4,75. Se utilizó el mismo método de siempre para cubrir la superficie de gelatina con EDC. Después de que transcurrieron las 5 horas de reacción, se llevaron ciertas muestras a incubación con PBS. Al final se obtuvieron las muestras con 0h-1h-12h-24h de incubación.

Nuevamente se aplicó el método de coloración, y se observó lo que le pasó al titanio al variar el medio de reacción.

CAPÍTULO III

3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TRABAJO.

3.1. VOLTAMETRÍA CÍCLICA

La electroquímica experimental es una ciencia que estudia los procesos de reacción que ocurren en la interfase metal/solución generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa.

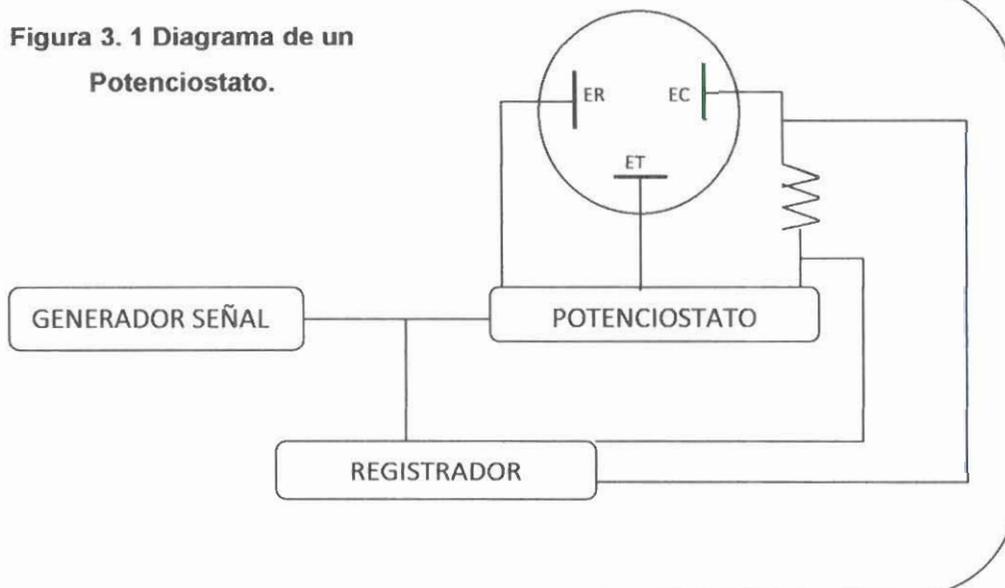
Para analizar qué sucede con la corriente que circula por el sistema a medida que se modifica el potencial de electrodo, es necesario emplear un sistema de tres electrodos, uno de trabajo, uno de referencia y uno auxiliar. Los mismos son conectados a un

potenciostato, el cual controla el potencial del electrodo de trabajo y a la vez registra la corriente resultante. Con el sistema de tres electrodos se evita el paso de la corriente a través del electrodo de referencia y por tanto, la polarización del mismo, lo que provocaría la modificación del potencial del electrodo de referencia con el paso de corriente. Es necesario acotar que el potenciostato utilizado en el presente trabajo es uno modelo 263A del fabricante EG&G Princeton Applied Research conectado a una computadora con el programa M270 en el cual se realizaba el registro de los datos que luego eran exportados para ser analizados en una hoja de cálculo.

Los diferentes tipos de arreglos de las celdas dependen de la técnica que se vaya a utilizar, en el caso del estudio de electrografting de un monómero sobre titanio, se decidió emplear como técnica preliminar la voltametría cíclica. Como se mencionó en el capítulo anterior, ésta técnica permite caracterizar un sistema electroquímico, y permite conocer si una especie es electroactiva; la aparición de un pico indica si la especie está envuelta en la reacción de alguna forma. La voltametría cíclica es muy útil para estudios iniciales de sistemas nuevos, muchos experimentos pueden ser llevados a cabo en pocos minutos. Además los datos que se obtienen permiten una interpretación rápida y cualitativa sin recurrir a cálculos detallados. De

hecho, los resultados obtenidos en un experimento pueden ser usados inmediatamente para el diseño del siguiente.

Figura 3. 1 Diagrama de un Potenciostato.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Figura 3. 2 Fotografía del Potenciostato 263 A utilizado en los experimentos de electrografting.



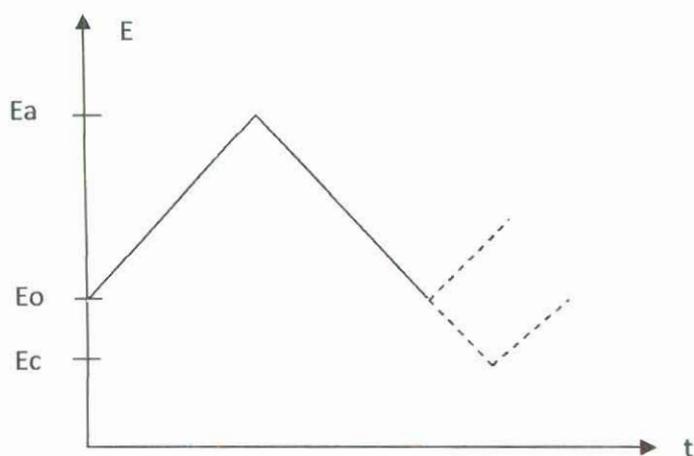
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

realmente se llama voltamperometría, pero se la conoce por voltametría cíclica.

Es importante destacar que según la convención que se utiliza en este documento, cuando el potencial es barrido positivamente se habla entonces de potencial anódico, y cuando es negativo, se habla de potencial catódico. La curva del potencial de la corriente puede ser graficado en un diagrama x-y cuando son velocidades de escaneo lentos, cuando son altos se puede usar un osciloscopio.

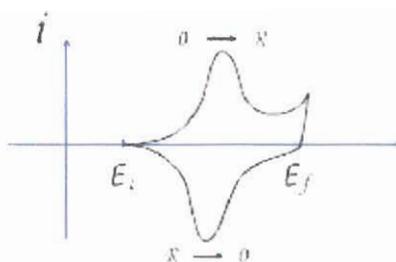
La curva de potencial vs tiempo utilizada en voltametría cíclica se presenta en la figura 3.5. Existen dos parámetros que se deben determinar en voltametría cíclica, la velocidad de barrido y los límites de potencial. La pendiente de la variación de potencial se la conoce como "velocidad de barrido" (*scan rate*) y dice básicamente en qué intervalo de tiempo se están haciendo modificaciones. Por lo general se habla de 3 valores de potencial importantes, el potencial inicial (E_0), el potencial de corte anódico (E_a) y el potencial de corte catódico (E_c). El barrido puede ser iniciado en sentido anódico o catódico, y la técnica permite repetir los ciclos las veces que sea necesario.

FIGURA 3. 5 Potencial vs. Tiempo en Voltametría Cíclica



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Figura 3. 6 Intensidad de Corriente vs. Tiempo en Voltametría Cíclica

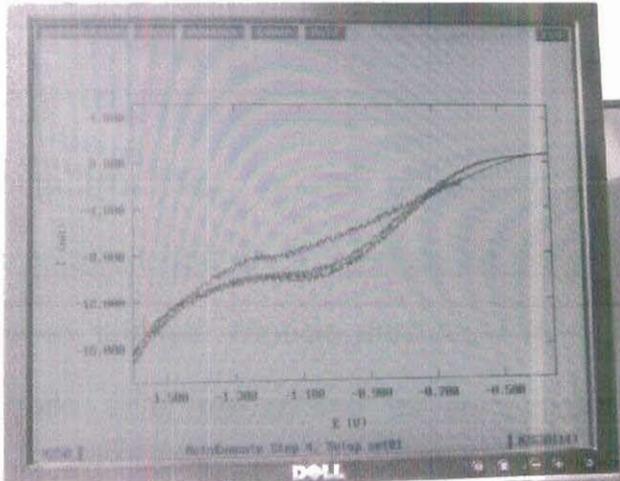


Elaborado por: Mario Vazquez, docente Instituto de Química U de A (2007)

El potencial es barrido positivamente cuando se quieren estudiar reacciones de oxidación, y negativamente cuando se quiere investigar

reducciones. Para un sistema reversible, la respuesta corriente-potencial que se obtiene es similar a la presentada en la figura 3.6.

Figura 3. 7 Voltamograma en ejecución del programa M 270.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Las curvas de intensidad o densidad de corriente frente al potencial que se obtienen en las experiencias de voltametría se llaman voltamogramas, los cuales se caracterizan por la existencia de máximos de corriente en un proceso farádico, o picos, definidos por los correspondientes valores de máximo de densidad de corriente de pico y potencial de pico.

Si bien, esta técnica brinda mucha información, es importante aclarar que es una técnica muy limitada para la identificación de las especies

presentes en la interfase electrodo/solución. Esto se debe a que los métodos electroquímicos se basan por lo general en propiedades macroscópicas cuya respuesta es proporcional al número de especies implicadas.

De este modo la información que se obtiene no permite conocer desde qué molécula situada en la interfase se está produciendo el flujo de electrones y a qué especie dará lugar la transferencia de carga, sobre todo si el mecanismo es complejo. Para intentar solventar esta limitación y obtener más información, se suele acoplar al sistema electroquímico otras técnicas espectroscópicas como espectroscopia infrarroja (IR), ultravioleta visible (UV-vis), técnicas microscópicas como microscopia de fuerza atómica (AFM), microscopia de barrido electrónico (SEM).

En el caso particular de electrografting para injertar el monómero AEMA en una superficie de Titanio, se busca estudiar una reacción de reducción, ya que lo que se necesita es que el electrodo de trabajo, en este caso titanio se cargue negativamente para que pueda activarse para que el monómero AEMA que está en la disolución pueda injertarse en él a través del mecanismo de electrografting, es

por ello que en la mayoría de las experimentaciones se realizan barridos catódicos únicamente.

3.2. IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY

La ionización por electroespray ha surgido recientemente como una poderosa técnica para la producción de iones intactos en el vacío de las especies grandes y complejas de una solución. La ionización por electroespray (ESI) es una técnica utilizada en espectrometría de masas para producir iones (ESI-MS). Se utiliza para producir iones a partir de moléculas grandes o macromoléculas, presentando la ventaja de que éstas no se ionizan al fragmentarse. Gracias a esta técnica es posible la aplicación de la espectroscopía de masas para las moléculas grandes, polares y frágiles que juegan un rol vital en los sistemas biológicos. Se han obtenido espectros para biopolímeros como oligonucleótidos y las proteínas, estas últimas tienen pesos moleculares de hasta 130.000, hasta el momento no hay evidencia de un límite superior.

La muestra en solución que se quiere analizar se hace pasar a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico, a la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por

pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente por un proceso de desorción del campo eléctrico ó de evaporación del solvente. Conforme el solvente se evapora, las moléculas de analito se aproximan, se repelen y finalmente, cuando la repulsión de las cargas positivas vence la tensión superficial, estallan las gotas (Explosión de Coulomb). El proceso se repite hasta que el analito está libre de solvente, de modo que no quedan más que iones. Los iones se mueven hacia el analizador de masa, para después llegar al detector que permita obtener el respectivo espectro de masas (15).

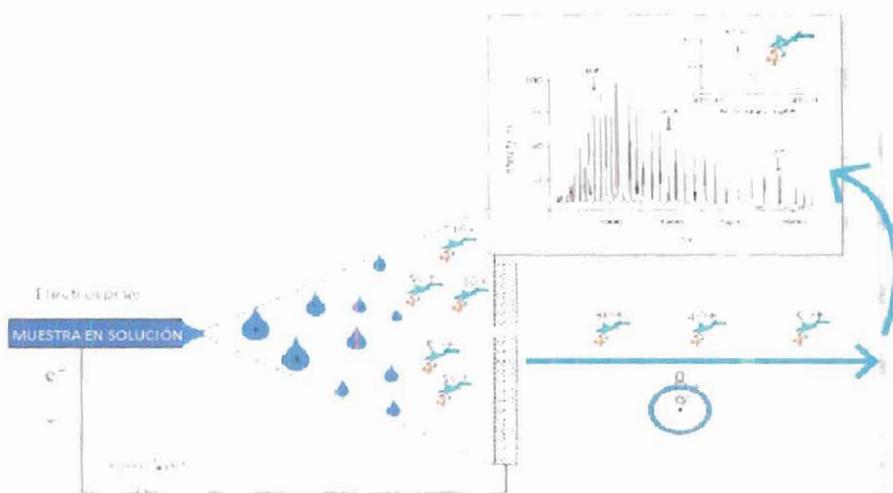
En la investigación de electrografting de AEMA sobre titanio, se tomaron las muestras más representativas de las soluciones alteradas electroquímicamente y se las sometió a espectrometría de masas con ionización por electro spray, el objetivo era conocer si el monómero se estaba polimerizando en la solución o no.

Figura 3. 8 EQUIPO PARA ESI-MS.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Figura 3. 9 Esquema de ionización por electrospray.

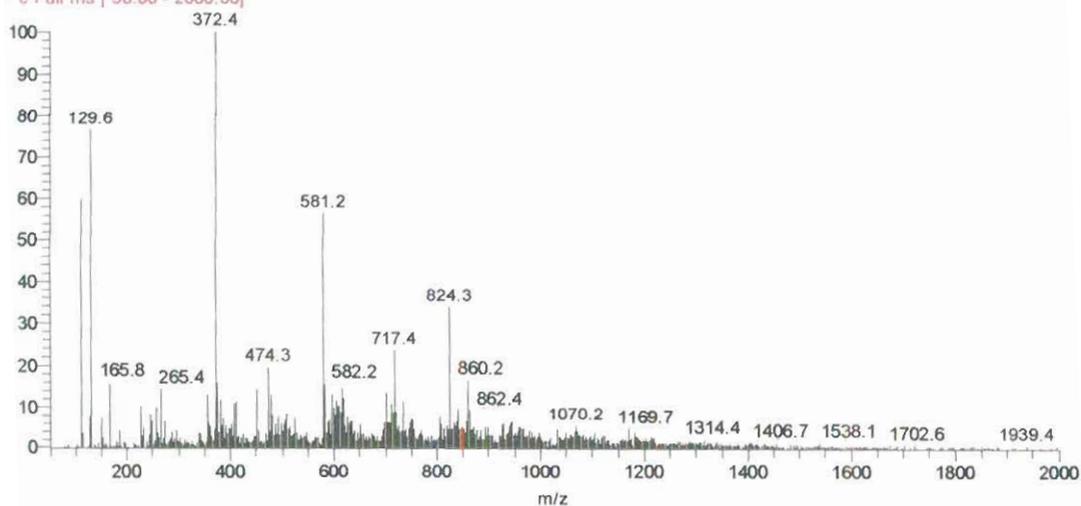


Elaborado por: Karin Markides, Uppsala University (2003)

Figura 3. 10 Ejemplo de un espectrograma de masas.

: 57-71 RT: 1.39-1.69 AV: 15 SB: 141 0.29-1.14, 3.10-5.91 NL: 2 19E6

- c Full ms [50.00 - 2000.00]



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

3.3. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

SEM por sus siglas en inglés, *Scannig Electron Microscope*, es un microscopio electrónico de barrido que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Los electrones interactúan con los átomos de la muestra produciendo señales que contienen información acerca de la topografía de la superficie de la muestra, composición y otras propiedades como la conductividad eléctrica.

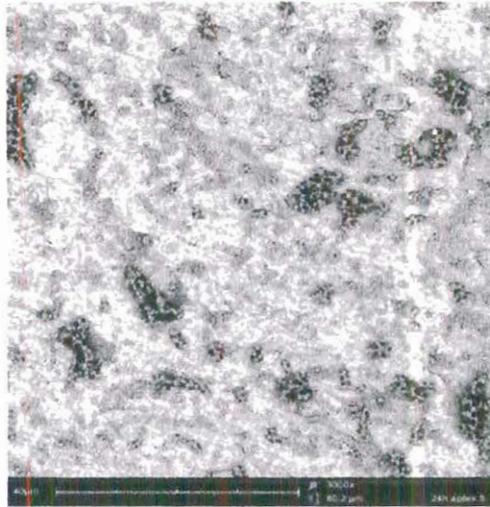
La mayoría de los SEMs necesitan que se utilicen muestras que sean conductoras. El microscopio electrónico de barrido, PHENOM, FEI, Griffin Technology Hp L1706, que se encuentra en el Laboratorio de Orgánica de la Universidad de Gante utiliza dos métodos distintos dependiendo de la muestra que se quiere examinar. Para muestras como polímeros, se recubre la muestra con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras a la muestra. Para el presente estudio, la muestra que se utilizó fue un metal con propiedades conductoras, es decir, no se requiere recubrirlo con ninguna capa, más bien se lo adhiere con cinta adhesiva sobre la superficie de un soporte. Se introduce cuidadosamente al lector, ésta es barrida con los electrones acelerados que viajan a través del cañón. Mediante un detector se

mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra.

Este equipo tiene una gran profundidad de campo, permitiendo un gran enfoque de la muestra. Las imágenes que se obtienen son de alta resolución, es decir, se pueden examinar a una alta magnificación características espaciales cercanas en la muestra obteniendo diferentes tipos de imágenes, pudiendo captar imágenes en tres dimensiones dependiendo de la dirección que se envié el haz de electrones.

En este tipo de microscopios se necesita acelerar los electrones en un campo electrónico, así se aprovecha su comportamiento ondulatorio. Esto ocurre en una columna que contiene el microscopio, en donde se acelera por una diferencia de potencial de 1,000 a 30,000 voltios. Si la muestra es muy sensible como las muestras biológicas o aislantes, los electrones se aceleran con un voltaje pequeño. Mientras los altos voltajes se utilizan para muestras metálicas, la razón es porque éstas no sufren daños como en el caso de las biológicas, y se puede aprovechar la menor longitud de onda para tener una mejor resolución. Una vez que los electrones hayan

Figura 3. 11 Imágenes en SEM de las diferentes técnicas de deposición de aminas.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Figura 3. 12 EQUIPO MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.



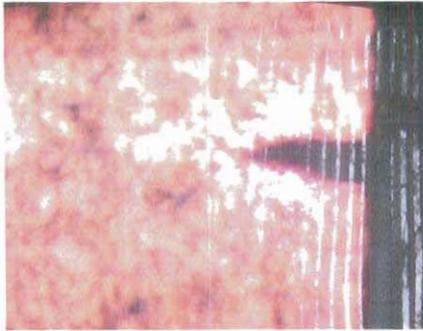
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

3.4. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

El AFM por sus siglas en inglés, *Atomic Force Microscope*, conocido en español como el microscopio de fuerza atómica es una herramienta mecano-óptico que puede detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al introducir la muestra, éste registra de manera continua su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda se encuentra acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200 μm . El microscopio de fuerza atómica es una técnica analítica muy esencial para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas.

El voladizo con punta aguda (sonda) en su extremo, que se utiliza para explorar la superficie de la muestra de manera precisa, se encuentra hecho de silicio o nitruro de silicio. Al acercarse este extremo con la superficie de la muestra, las fuerzas que se ejecutan en ese instante entre el extremo y la muestra, producirán que se desvíe el voladizo de acuerdo a la Ley de Hook. La desviación del voladizo se mide utilizando un punto laser que se refleja de la superficie superior del voladizo en un conjunto de fotodiodos.

Figura 3. 13 Imagen de la punta del voladizo y el reflejo del punto laser.



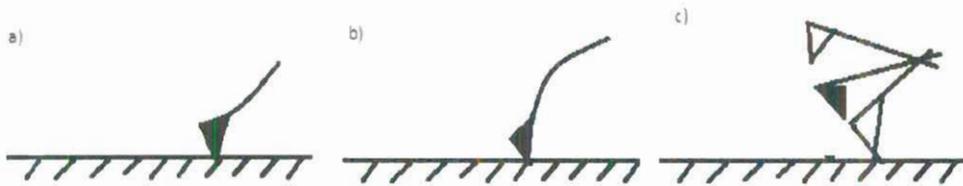
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Existen varias fuerzas que estarán involucradas que el AFM detecta durante la medición, entre ellas se encuentran la fuerza mecánica del contacto, fuerzas de Van der Waals, fuerzas capilares, fuerzas magnéticas, fuerzas electrostáticas, etc.

El microscopio de fuerza atómica puede hacer mediciones de dos tipos en base a la imagen y en base a la fuerza. Si la medición es de acuerdo a la imagen, se utiliza la punta para hacer un barrido por la superficie seleccionada, en la cual existirá una flexión del listón cuando suceda una interacción de fuerzas interatómicas entre los átomos de la punta con los átomos de la superficie de la muestra. Mientras que si la medida se basa en la fuerza de la punta, esta va a oscilar verticalmente y al mismo tiempo se registrará la flexión del listón.

El AFM tiene distintos modos de operación dependiendo de la naturaleza de la superficie de la muestra. En la figura 3.14 se muestran los diferentes modos que pueden existir.

Figura 3. 14 Modo de Operación del AFM.



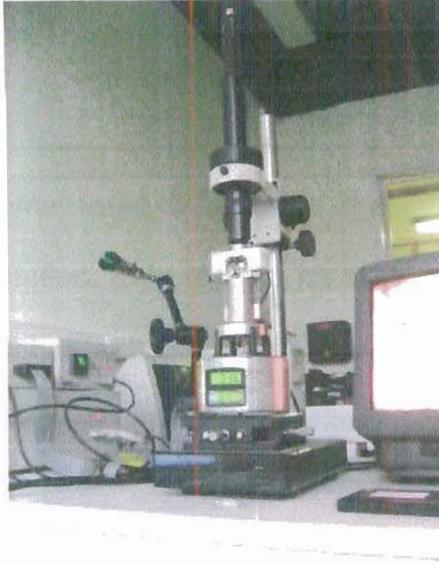
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

El primer esquema (a), se lo conoce como el modo de contacto, donde la fuerza entre la punta y la muestra se va a mantener constante, a la vez ocurrirá una deflexión invariable, esto quiere decir que la punta se mantendrá estática para ser utilizada como una señal de retroalimentación, aquí se involucra en todo el proceso la fuerza de adhesión. Para muestras de tipo biológicas, las que son delicadas y blandas, no deben utilizarse para el modo de contacto debido a que tienden a dañarse. Mientras que las muestras que se encuentran potentemente adheridas a la superficie, funcionarán mejor en este modo.

Para el modo dinámico (b y c), mediante un actuador piezoeléctrico se crea una vibración en el voladizo a una cierta frecuencia. Se pueden modificar tanto la amplitud como la frecuencia y la fase de resonancia para las interacciones entre la punta y la superficie de la muestra, pero el lazo que produce la retroalimentación va mantener constante cualquiera de estas tres.

- El Modo de no contacto (b) se lleva a cabo cuando se mantiene constante la frecuencia de resonancia. Este se aplica muy a menudo cuando se requiere levantar topografías de superficies duras a escala atómica y operando en vacío extremo.
- El Modo de repiqueteo o "*tapping mode*" (c), la amplitud se mantendrá. Se utiliza para obtener imágenes de muestras biológicas, que se encuentran estables en soluciones acuosas.

Figura 3. 15 EQUIPO MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

El AFM utiliza un software llamado NanoScope(R) IIIa producido por Veeco Instruments en el cual se pueden obtener imágenes de la superficie topográficamente, y observar qué tan rugosa se encuentra la muestra.

3.5. ELIPSOMETRÍA

Es una técnica analítica sensible de medición en donde se hace incidir un haz de luz sobre un material en el cual mediante el cambio en el estado de polarización de la luz se pueden determinar espesores de las películas finas de la muestra y sus constantes

ópticas. Se debe recalcar que este análisis no destruye la superficie de la muestra.

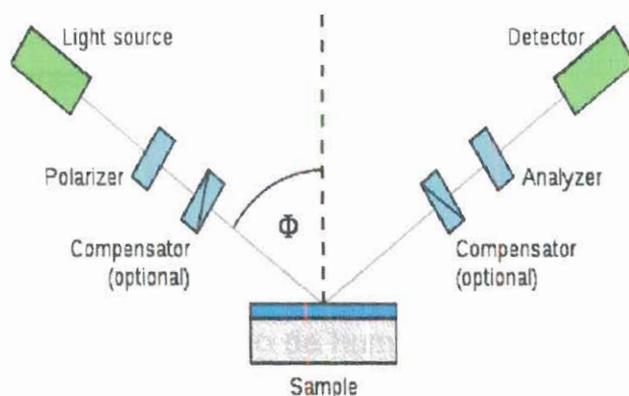
El nombre de elipsometría se debe a que el estado más frecuente de la polarización es elíptico. Esta técnica ha sido conocida durante casi un siglo, y tiene muchas aplicaciones. Hoy en día, ésta práctica está siendo utilizada por investigadores en áreas de biología y medicina.

La elipsometría mide el cambio de la polarización de la luz sobre su reflexión o su transmisión, solamente se evalúa en la disposición de la reflexión. Las características de la muestra como el grosor, el índice de refracción, etc. determinan el cambio de la polarización.

La elipsometría solo se aplica a películas finas con un grosor menor a un nanómetro, la muestra se debe componer de una pequeña cantidad de capas moderadas, bien definidas que sean ópticamente homogéneas e isotrópicas.

El equipo FLS 300 Xe Arc Light Source, Base-160, LOT ORIEL GRUPPE EUROP, funciona de la siguiente manera: se debe calibrar el equipo para esto se utilizaron muestras patrón, en este caso SiO_2 . Se incide un haz de luz cuyos rayos sean paralelos entre sí, del cual se conoce el estado de polarización sobre la muestra. Para esto se utiliza una fuente monocromática, en este caso el equipo utiliza un láser. Después, con la ayuda de un polarizador se modifica el estado de polarización del láser a una forma lineal. Una vez modificado, se envía ésta a un retardador de media onda, para variarse el ángulo de inclinación del vector eléctrico. Cuando haya interactuado la luz con la muestra, utilizando un analizador se cambia el estado de polarización, el cual es el elemento óptico que rectifica la polarización y le da forma a la intensidad de luz final que llega al detector.

Figura 3. 16 Ejemplo de la incidencia del rayo de luz sobre la muestra en elipsometría



Elaborado por: John Wiley, Principios y Aplicación de la Elipsometría (2008)

Figura 3. 17 Equipo para elipsometría



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

El software que utiliza este equipo se llama CompleteEASE, en donde se encuentran guardadas todas las mediciones, y se va modificando las variables hasta conseguir que la medición que se obtiene con el equipo se asimile con la que se encuentra registrada en el software. Cuando ambas sean similares se puede concluir que el equipo se encuentra calibrado.

3.6. ÁNGULO DE CONTACTO ESTÁTICO (SCA)

El ángulo de contacto o ángulo de humectancia, como se lo describe en algunos libros, es aquel ángulo que se forma cuando interactúa un líquido con la superficie de un sólido. Este valor depende de las fuerzas adhesivas y las cohesivas, el primero es entre el líquido y el

sólido mientras que el segundo es solo del líquido. Si las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido son mayores a las fuerzas cohesivas, el ángulo de contacto será menor de 90 grados, lo que indica que el líquido baña la superficie.

El ángulo de contacto es utilizado mayormente para conocer si el sólido que se está midiendo es hidrofílico o hidrofóbico. Una vez que el líquido se deja caer sobre la superficie sólida, se observa la interacción que ocurre entre la gota y la superficie. Si el líquido es atraído forzosamente por la superficie sólida la gota se extiende por todo el sólido y el ángulo de contacto se acerca a 0° , esto quiere decir que se trata de un sólido hidrófilo. Si el sólido es menos hidrofílico el ángulo de contacto puede variar entre 0° y 30° . En cambio, si el ángulo de contacto es mayor de 90° se dice que es un sólido hidrofóbico, si son superficies muy hidrofóbicas el ángulo puede ser mayor a 150° hasta cercano a 180° en la cual el agua que se encuentra en la superficie va descansar sobre ella sin extenderse ni mojar el sólido.

Figura 3. 18 Mojabilidad de diferentes fluidos.

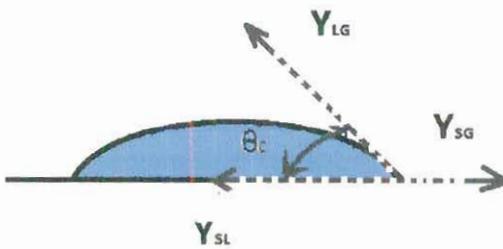


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Los equipos de medición suelen grabar la interacción entre estas fases, la forma de la gota se determina por la relación de Young. Esta medición también es aplicable para interfases de dos líquidos o dos vapores.

Consiste en el equilibrio termodinámico de tres fases, se tiene la fase sólida que es la superficie del substrato, en este caso de estudio las placas de titanio. La fase líquida que es la gota de agua que deja caer sobre la superficie y la fase gaseosa es el aire del ambiente. Se debe recalcar que la tercera fase también puede ser un líquido inmisible. En equilibrio el potencial químico en las tres fases deben ser iguales.

Figura 3. 19 Medición del ángulo de contacto por el método de Young Laplace



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

El OCA20, Benelux Scientific es un equipo que tiene una plataforma en donde se coloca la muestra, tiene tres jeringas que se las rellena de acuerdo a las condiciones de la muestra. Se utilizó una jeringa de 500 μl Hamilton rellena de ADD. Se deja gotear 3 μl de ADD sobre la superficie del metal. El OCA20 contiene una cámara de video que graba automáticamente cuando la gota se deja caer sobre la superficie hasta que la gota se estabiliza en ella. El ángulo de contacto se determina mediante un software SCA 20, versión 2.1.5. Se hicieron tres mediciones en cada muestra.

Figura 3. 20 EQUIPO PARA MEDICIÓN DE SCA



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

3.7. ESPECTROMETRÍA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM-EDS)

Es un microscopio electrónico de barrido con un micro analizador de rayos X. Como se indicó anteriormente, en el SEM un haz electrónico escanea a través de la superficie de la muestra, cuando los

electrones chocan con la muestra se generan señales, y detectando señales específicas se produce una imagen o una composición elemental de la muestra. Las tres señales que proporcionan mayor cantidad de información en SEM son los electrones secundarios, los rayos X y los electrones retro dispersados.

Los electrones secundarios se emiten de los átomos que ocupan la superficie superior y producen una imagen fácilmente interpretable de la superficie. El contraste en la imagen es determinado por la morfología de la muestra. Una imagen de alta resolución se puede obtener debido al diámetro del haz electrónico primario.

Los electrones retro dispersados son rayos de electrones primarios que se reflejan desde los átomos en el sólido. El contraste en la imagen producida es determinado por el número atómico de los elementos en la muestra. La imagen por lo tanto demostrará la distribución de diversas fases químicas en la muestra. Debido a que estos electrones se emiten desde la profundidad en la muestra, la resolución en la imagen no es tan buena como la de los electrones secundarios.

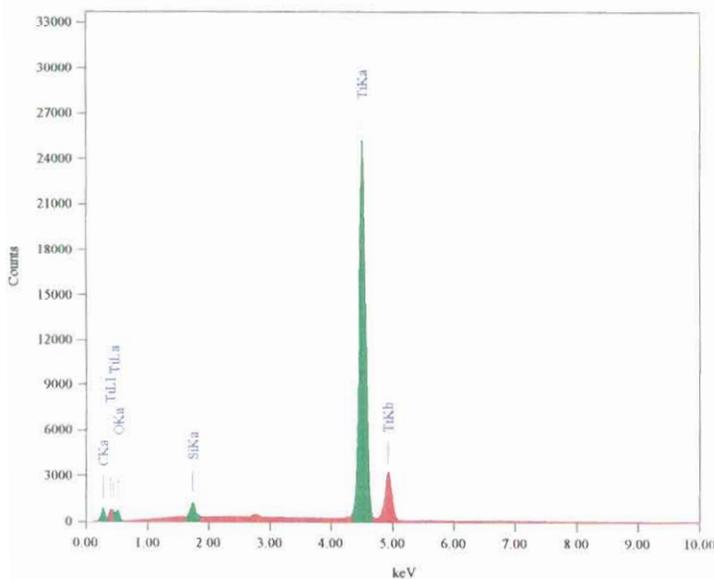
Las interacciones de los rayos primarios con átomos en la muestra causan transiciones en la capa y como resultado se emite un rayo X. El rayo X tiene una energía característica de un elemento padre, la detección y medición de la energía permite un análisis elemental. El EDS puede proveer estándares adecuados cuantitativos de análisis elemental de la composición con una profundidad de muestreo de 1-2 micrones. Los rayos X se utilizan también para formar mapas o perfiles de líneas demostrando la distribución elemental en la superficie de la muestra.

La energía-dispersa de espectroscopia de rayos X, es una técnica de análisis utilizada para caracterizar químicamente una muestra. Esto se hace basándose en el principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única permitiendo que los rayos X, que son características de la estructura atómica de un elemento, puedan ser identificados únicamente el uno del otro.

Para estimular la emisión de rayos X características de una muestra, un haz de gran energía de partículas cargadas tales como electrones o protones, o un haz de rayos X, se enfoca en la muestra que es estudiada. En reposo, un átomo dentro de la muestra contiene

electrones en estado basal en niveles de energía discretos o capas del electrón limitadas al núcleo. El rayo incidente puede excitar un electrón en una capa interna, expulsándolo de la capa mientras que crea un agujero del electrón donde estaba el electrón. Un electrón externo, de una capa de alta energía llena el agujero, y la diferencia en energía entre la capa de alta energía y la capa más baja de energía es que libera en forma de rayo X. El número y la energía de los rayos X emitidos de una muestra se pueden medir por un espectrómetro energía-dispersivo. Pues la energía de los rayos X son características de la diferencia en energía entre las dos capas, y de la estructura atómica del elemento del cual fueron emitidos, éste permite que la composición elemental de la muestra se mida.

Figura 3. 21 Ejemplo de un Espectrograma en EDS



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

El JEOL JSM-5600 es un microscopio electrónico de barrido, este aparato se utiliza en el modo secundario del electrón (SEI) el cual se encuentra equipado de un JED 2300 del micro sondeo electrónico y de un detector de EDS (espectroscopía dispersiva de la energía) para el análisis elemental. SEM-EDS es capaz de detectar todos los elementos del carbón al uranio, con un límite de detección de 0.2 wt.% para la mayoría de los elementos (15)

Parámetros de Medición:

- Voltaje de aceleración: 20 keV
- Resolución: 150 eV
- Tiempo de escaneo: 15 marcos
- Modo de Escaneo: trazado de mapas.
- Magnificación: 1000x

Figura 3. 22 EQUIPO PARA SEM-EDS



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En el presente capítulo se presenta los resultados de la aplicación de las técnicas de *electrografting* y *self-assembly*. Se pretende mostrar y analizar los resultados que llevaron a establecer las conclusiones de este trabajo sobre la aplicación de estas técnicas para recubrir una superficie de titanio con el fin de darle mejores características de biocompatibilidad.

4.1. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE ELECTROGRAFTING

En el anexo 1 y 2 del documento se encuentra una lista de las características de los experimentos llevados a cabo en electrografting con la técnica de voltametría cíclica, en el presente capítulo se pretende mostrar los resultados de dichas experimentaciones. Como

se ha explicado en el capítulo anterior, los resultados de los experimentos que han sido sometidos a la técnica de voltametría cíclica son gráficos en eje x-y, los cuales permiten realizar interpretaciones cualitativas de lo que está sucediendo en la interfase orgánico/metal (en la superficie del titanio), es por ello que el éxito de la utilización de esta técnica depende de la correcta comparación entre resultados.

Al ser una técnica cualitativa, y al no tener antecedentes con respecto al uso de AEMA sobre titanio, en cada grupo de experiencias fue necesario realizar muestras con monómeros y sin él para realizar las respectivas comparaciones y poder analizar si efectivamente los picos que se presentaban en los resultados eran debidos a la reducción de dicho monómero o no. Los parámetros como el límite superior e inferior del potencial, el tipo de electrolito, el tipo de solvente, la velocidad de barrido y el número de ciclos fueron determinados inicialmente por datos obtenidos en investigaciones anteriores (literatura revisada), y a medida que la investigación avanzaba, dichos parámetros se determinaban de acuerdo con los resultados de los experimentos realizados en el laboratorio. Al ser la voltametría cíclica una técnica cualitativa, fue necesario, además de la interpretación correcta de los resultados, utilizar técnicas más avanzadas que

permitieron observar de una forma más precisa la superficie del titanio, para así poder descartar o aceptar la técnica de electrografting como una técnica prometedora para realizar el injerto de un monómero como AEMA sobre un substrato como titanio para recubrir este material con el objetivo de prepararlo para que dicho monómero pueda polimerizarse y de esta manera mejorar sus características de biocompatibilidad.

De acuerdo con la literatura, una disminución en la densidad de corriente después de un múltiple barrido voltamétrico es usualmente observado como un indicador de éxito en electrografting de un monómero en un substrato, la razón detrás de aquello radica en el hecho de que la capa de polímero formado sobre la superficie actuaría como un recubrimiento aislante y entonces se limitaría la corriente producida en cierto potencial. Por otro lado, si aparece un pico en algún potencial dado, esto podría indicar actividad química, es decir, que alguna reacción está sucediendo, y en el caso de que se haga un barrido catódico, esto podría tratarse de una reducción, y si el barrido es anódico, es decir, positivo, se hablaría entonces de una oxidación. Cuando se habla de electrografting el interés principal es hacer barridos catódicos, es por ello que en éste estudio los potenciales empezaban en el potencial de circuito abierto y se llevaban hasta un

límite de potencial negativo, cuyo valor dependía del avance de los experimentos y de la literatura revisada. Fueron utilizados dos tipos de solventes para las soluciones, orgánico e inorgánico.

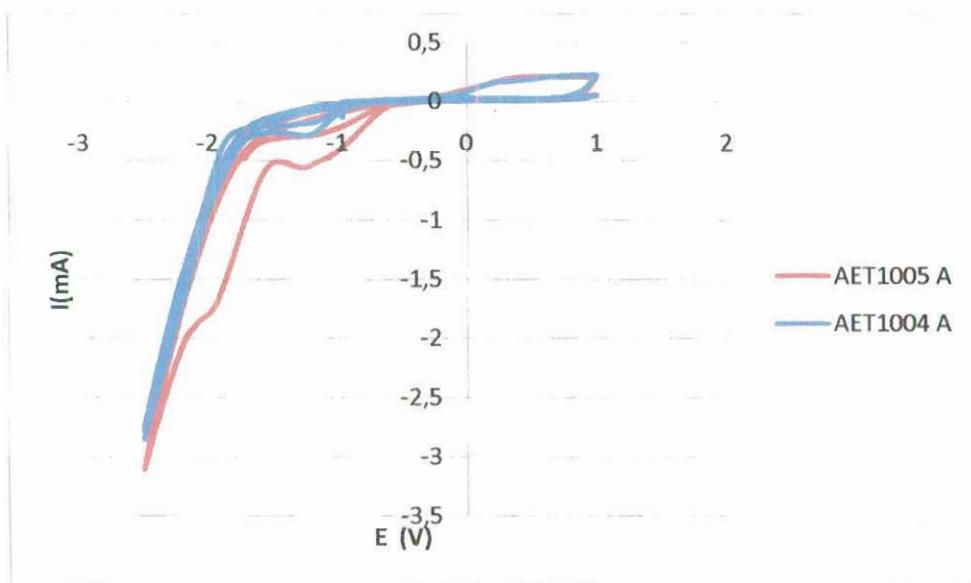
Las diferentes soluciones y celdas electroquímicas utilizadas fueron preparadas bajo los mismos protocolos, el electrodo de trabajo se limpió y la capa de óxido se removió usando una solución de 10% (v/v) HNO_3 |1%(v/v) HF. Las muestras fueron sumergidas en la solución mencionada durante dos minutos y luego enjuagadas con agua doblemente destilada. Para remover el oxígeno presente en la solución se hizo pasar gas nitrógeno a través de la solución durante al menos 20 minutos.

4.1.1. EXPERIMENTOS EN SOLVENTE ORGÁNICO

En la figura 4.1 se muestra un gráfico en el que se comparó un voltamograma de una solución que fue purgada con gas nitrógeno (AET1004A), contra una solución que contenía oxígeno (AET1005A), se observó que en la curva AET1005A existían dos picos, uno pudo ser debido a la reducción del monómero en el substrato y el otro debido a la reducción del oxígeno, al compararlo con la curva AET1004A, se podría

pensar que el pico de menor intensidad es el de la reducción del monómero, lo cual concuerda con lo que dice la literatura revisada, ya que solo aparece un pico y éste es de baja intensidad comparado con el otro. Sin embargo, éstas fueron solo las primeras observaciones, y estos resultados encaminan, pero no aseguran que se trate de electrografting.

FIGURA 4. 1 Voltamogramas cíclicos registrados en solución orgánica que contiene monómero AEMA de 0,1 M TBAP en DMF, entre V_{ca} y -2.5 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET1004A solución purgada con gas nitrógeno. AET1005A solución sin purgar (con oxígeno).



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

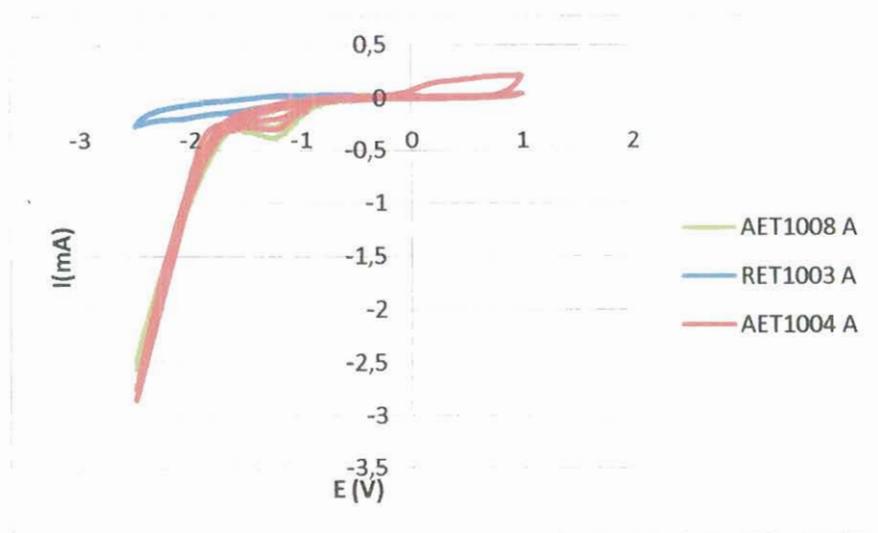
En la figura 4.3 se puede observar que en la curva AET1004A de la solución que contiene el monómero, la corriente se incrementa significativamente en comparación con la solución que sirve de referencia RET1003A ya que no contiene monómero, esto podría indicar un tipo de pasivación en la superficie, además se observa que no hay pico en la curva RET1003A. Sin embargo, es posible que en el barrido anódico el sustrato se haya oxidado dando lugar a TiO_2 , el cual es un semiconductor de tipo n, los niveles de energía de este semiconductor de tipo n podrían permitir algún tipo de reacción redox con el monómero. Por lo cual, no se muestran señales típicas de electrografting todavía. Pero cuando se observa la curva AET1008A, la cual solo tiene un barrido anódico que empieza en V_{ca} , se puede notar el mismo pico de la curva AET1004A, por lo cual se puede descartar el hecho de que la reacción haya sido producto de la oxidación del titanio en el primer barrido.

FIGURA 4. 2 De izquierda a derecha AET1004-AET1005-AET1006



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 3 Voltamogramas cíclicos registrados en solución orgánica de 0,1 M TEAP en DMF, entre +1V y -2.5 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET1004A solución que contiene monómero AEMA. RET1003A solución sin monómero AEMA. AET1008 entre V_{ca} y -2.5 V.



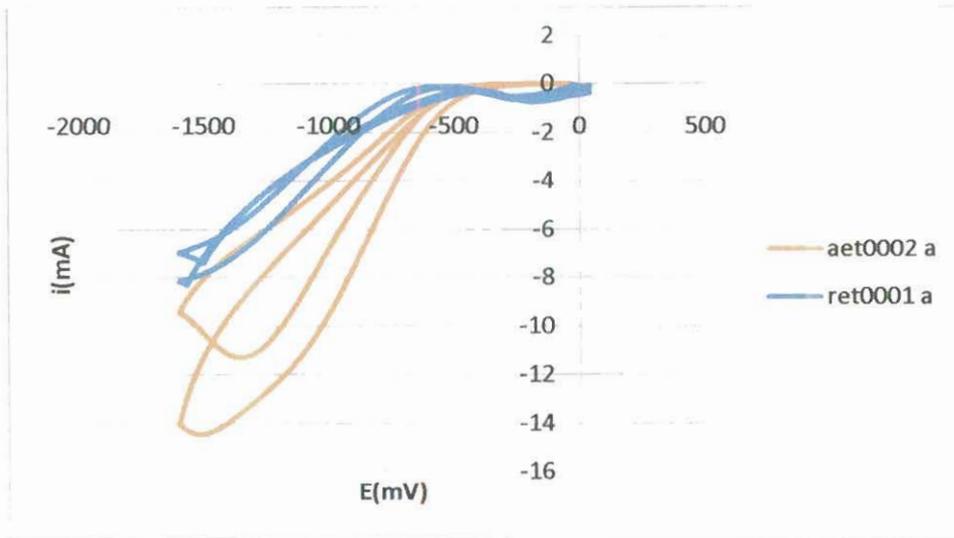
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Debido a que los distintos voltamogramas obtenidos en solución orgánica no arrojaban resultados concluyentes, y además, como se puede observar en la figura 4.2, no se observaron cambios en la superficie de los electrodos de trabajo empleados en las distintas celdas, es decir en la superficie no se observaban indicios de modificación, por ello, se procedió al cambio de solvente, en lugar de utilizar DMF se empezó a utilizar ADD.

4.1.2. EXPERIMENTOS EN SOLVENTE INORGÁNICO

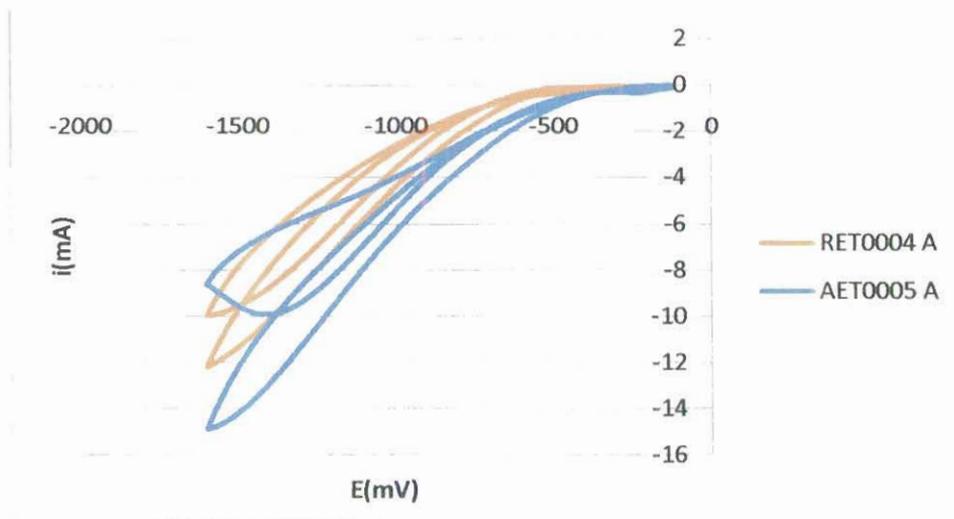
En el trabajo publicado por E. De Giglio sobre *“Electrosíntesis y caracterización analítica de recubrimientos de PMMA sobre substratos de titanio como barrera contra la liberación de iones”* se obtuvieron resultados prometedores en cuanto al injerto del polímero PMMA en titanio, lo particular de este trabajo fue que el solvente que se utilizó fue un solvente acuoso. En vista de que no se obtuvieron resultados prometedores con el solvente orgánico, se tomó la decisión de hacer pruebas con soluciones acuosas. Se intentó emular el procedimiento que se utilizó en dicho trabajo, sabiendo que los resultados no podían ser los mismos, principalmente porque el monómero que se quería injertar no era Metil Metacrilato (MMA) sino Aminoetil Metacrilato (AEMA), sin embargo, se consideró el documento como una guía. No solo se cambia el solvente, sino también el electrolito, se empezó a utilizar persulfato de amonio y ácido sulfúrico concentrado.

FIGURA 4. 4 Voltamogramas cíclicos registrados en solución acuosa que entre V_{ca} y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET0002A solución que contiene monómero. RET0001A solución sin monómero.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

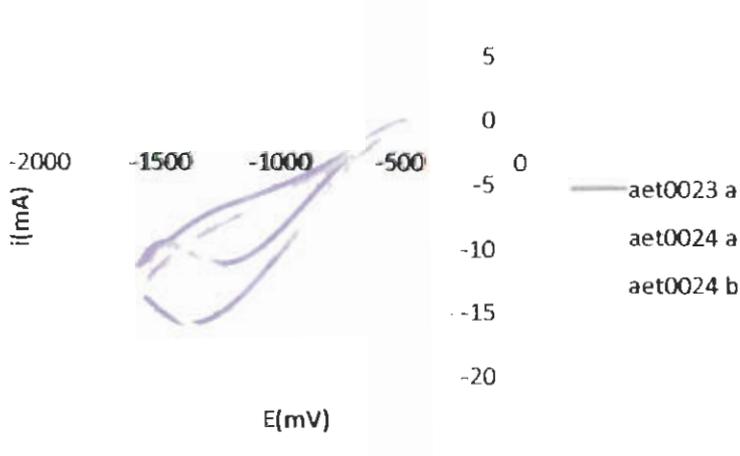
FIGURA 4. 5 Voltamogramas cíclicos registrados en solución acuosa que contiene H_2SO_4 , entre V_{ca} y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s. RET0004A solución sin monómero. AET0005A solución con monómero.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

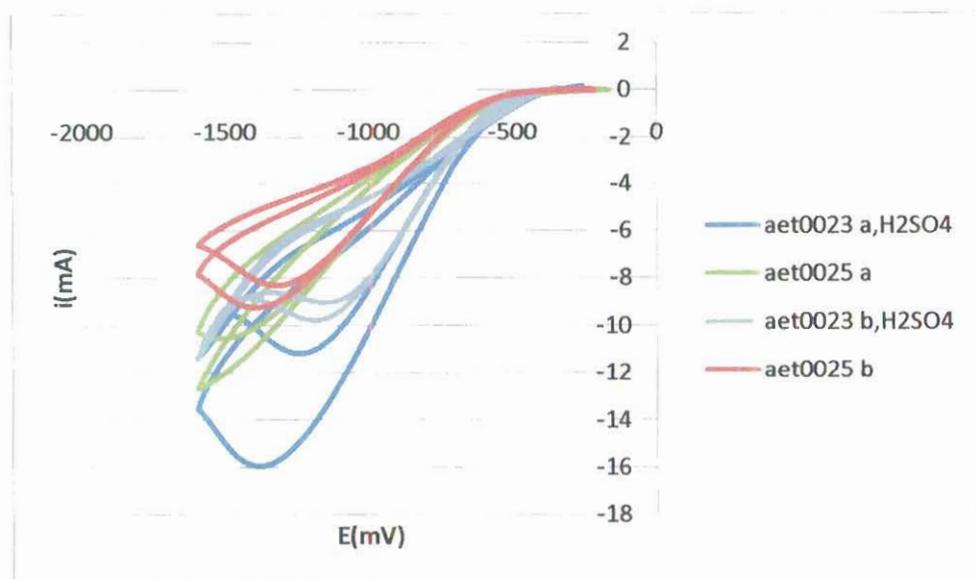
En la figura 4.4 se puede observar la curva AET0002A, cuya solución contiene AEMA, y la curva RET0001A cuya solución no contiene AEMA, se observan diferencias entre las corrientes en el voltaje máximo y además que hay un pico en la figura contiene el monómero, por lo que se lo podría atribuir a la reducción del mismo, sin embargo, existe la posibilidad de que este pico se deba a la reducción del persulfato a sulfato. En la figura 4.5 se observan los mismos parámetros que en la figura 4.4 con la diferencia de que estas soluciones no contenían ácido sulfúrico, el comportamiento de las curvas es el mismo, aparece un pico y la corriente decrece conforme aumentan los barridos.

FIGURA 4. 6 Voltamogramas ciclicos registrados en solución acuosa que contiene monómero AEMA, entre Vca y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET0023A-B 5 barridos de 2 ciclos. AET0024A 10 barridos de un ciclo.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 7 Voltamogramas cíclicos registrados en solución acuosa que contiene monómero AEMA, entre Vca y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET0023A-B solución con H₂SO₄. AET0025A-B solución sin H₂SO₄.

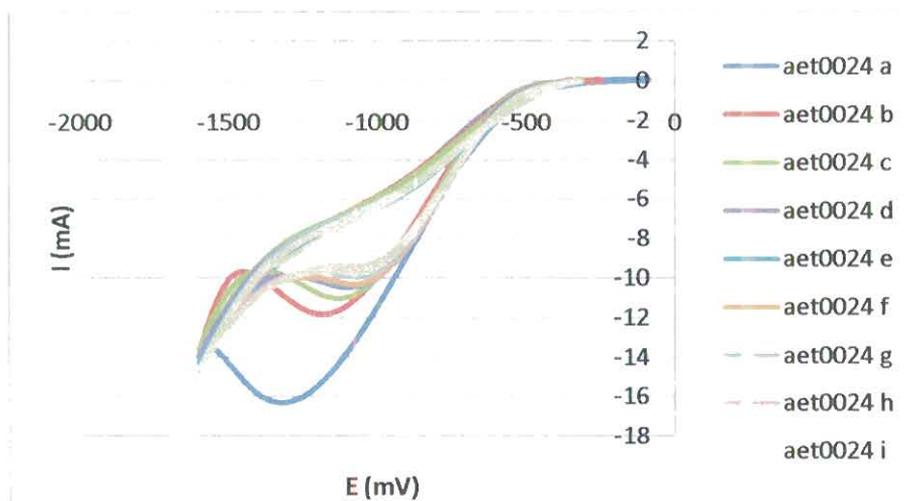


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

En la figura 4.6 se intentó observar si había diferencia o no en los voltamogramas si se cambiaba la forma del barrido, AET0023A eran 5 barridos de 2 ciclos y AET0024 eran 10 barridos de 1 ciclo cada uno, no se observó mucha diferencia entre las curvas, el comportamiento era el mismo. En la figura 4.7 se trató de observar como influía la presencia de ácido sulfúrico en la solución y aparentemente no hubo diferencia. Los voltamogramas que presentaron las características más prometedoras relacionadas con electrografting son la de las muestras AET0024 y AET0026 y se presentan en las figuras 4.8

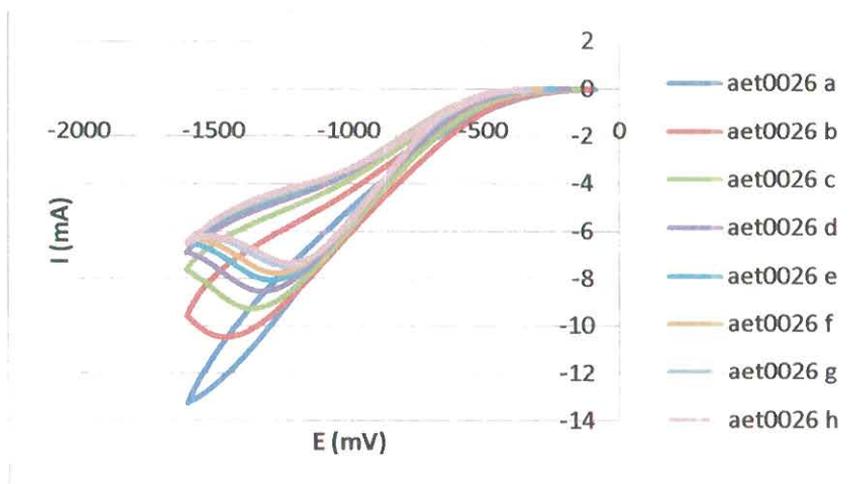
y 4.9 respectivamente, sus características son similares, solo difieren en la cantidad de barridos.

FIGURA 4. 8 Voltamogramas cíclicos registrados en solución acuosa que contiene monómero AEMA, entre Vca y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 9 Voltamogramas cíclicos registrados en solución acuosa que contiene monómero AEMA, entre Vca y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET0026A



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Sin embargo, como se ha repetido en este documento, esta técnica es solo cualitativa, incluso la medición del SCA de las muestras a pesar de arrojar una cantidad, es un valor que da una cualidad de la misma, ya que permite comparar las muestras entre sí y determinar si las mismas son hidrofílicas o hidrofóbicas, el SCA de estas muestras fue de $45^\circ \pm 2^\circ$, y aunque los voltamogramas permitieron pensar que efectivamente hubieron picos que indicaban reducción del monómero en el substrato y la disminución de corriente en el límite de potencial hizo pensar que existía una posible pasivación, las técnicas más avanzadas como AFM y SEM fueron las técnicas que permitieron llegar a conclusiones más acertadas con respecto al éxito o el fracaso de la técnica de electrografting para recubrir con un polímero la superficie del titanio. En la figura 4.10 se observan los principales resultados que se obtuvieron al utilizar el microscopio electrónico de barrido, las imágenes de la columna de la izquierda pertenecen a muestras que contenían monómeros y las de la columna derecha son imágenes de muestras que contenían monómeros. Se compararon las muestras más representativas con sus respectivas referencias y de ello se obtuvieron resultados desalentadores, ya que no hubo diferencia entre lo que se

observaba entre la superficie que había sido expuesta a actividad electroquímica con monómero y entre la que no tenía monómero, las superficies presentaban la misma forma, las imágenes eran muy parecidas.

FIGURA 4. 10 Resultados SEM para electrografting



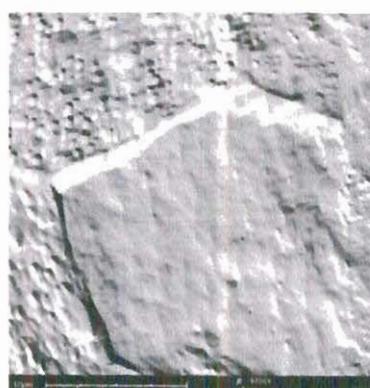
AET0024-3



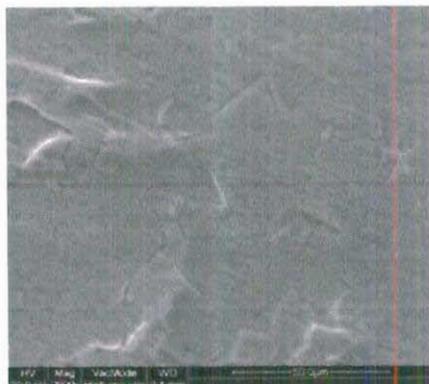
RET0011-3



AET0024-9



RET0011-9



AET0026-3



RET0013-3



AET0026-1



RET0013-1

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

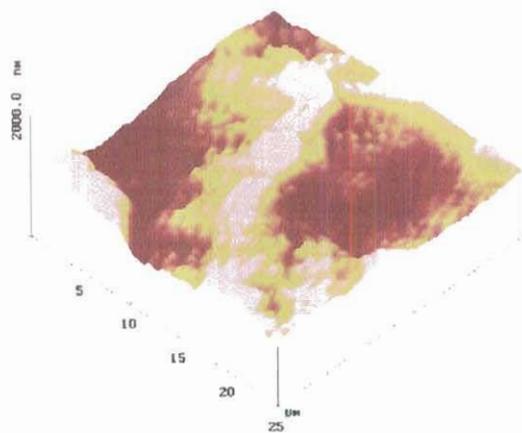
Otra de las técnicas de caracterización que se utilizó en la electrografting fue la del uso del microscopio de fuerza atómica, básicamente este equipo se lo utiliza para conocer la topografía de la superficie de una muestra, en éste caso específico para conocer la superficie del titanio luego de haber sido sometido a la técnica de electrografting. Al ser esta una técnica cuya respuesta depende de la rugosidad de la superficie, ésta no se la pudo aplicar en todas las muestras, ya que se contaba con

un solo equipo para varios investigadores, y además su operación la hacía solo un operador específico, por lo cual solamente se hicieron pruebas con tres de las muestras sometidas a electrografting. En la tabla VI se pueden leer las características de las muestras sometidas a este análisis. Hubo algunos problemas en las mediciones de las muestras, por ejemplo, cuando se cortaban las placas para poder dejarlas de un tamaño adecuado para el equipo, estas dejaban de ser planas, lo que dificulta la digitalización de la superficie. Por ello cada una de las tres muestras tuvo que ser medida cuatro veces para poder obtener buenas imágenes.

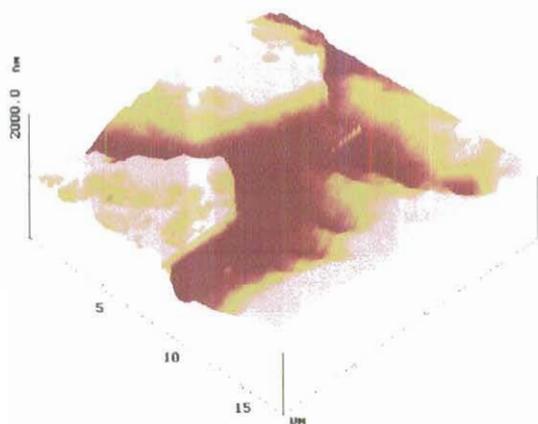
TABLA VI Características de las muestras sometidas a AFM

MUESTRA	TECNICA	ELECTROLITO	PH	V Min	V Max	VELOCIDAD DE BARRIDO	CANTIDAD	SCA
RET0011	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1M	3.13	-1.6	Vca	20	8*1CV 1*2CV	44.78
AET0024	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1M	3.13	-1.6	Vca	20	8*1CV 1*2CV	47.29
AET0025	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1M	3.13	-1.6	Vca	20	5*2CV	41.47

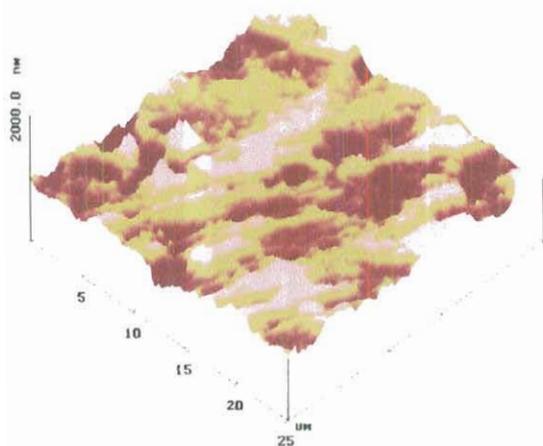
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 11 Topografía AFM para electrografting

RET0011A



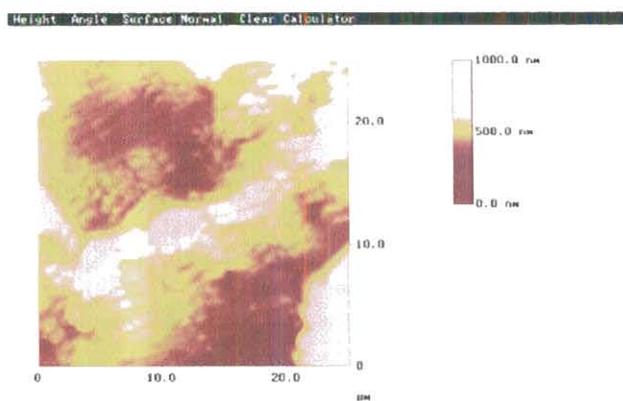
AET0024F



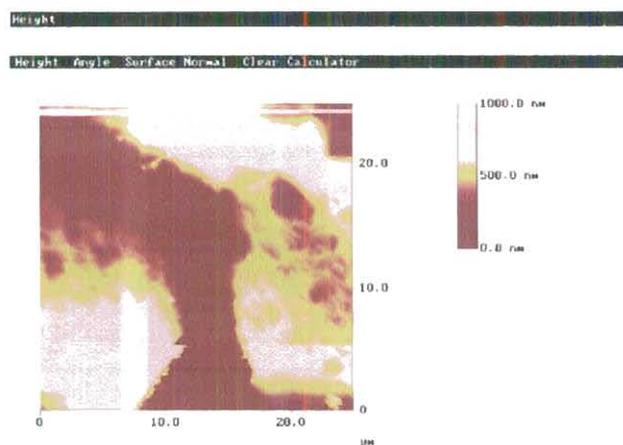
AET0025I

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

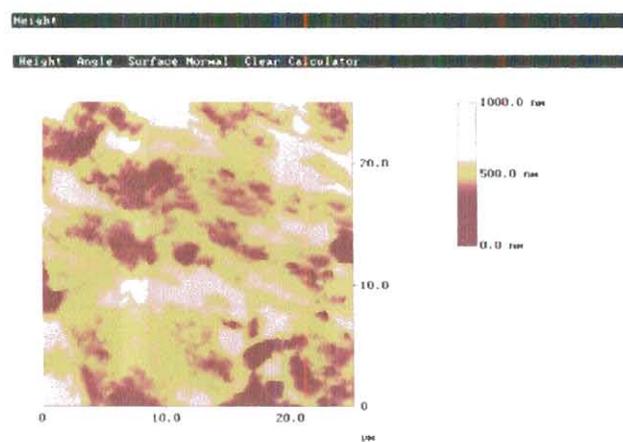
FIGURA 4. 12 Vistas Superiores (Planas) para AFM electrografting



RET0011B



AET0024

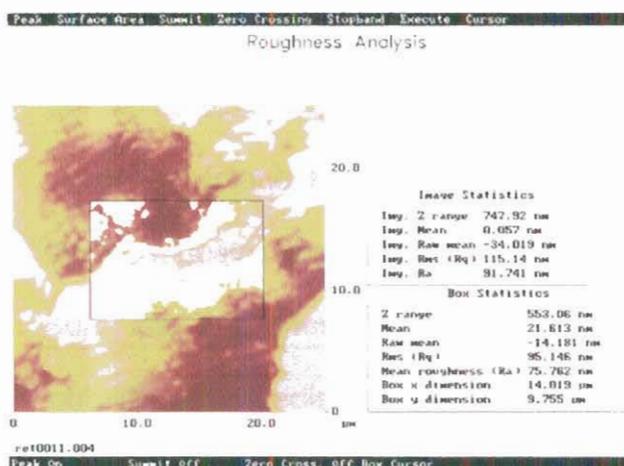


AET0025

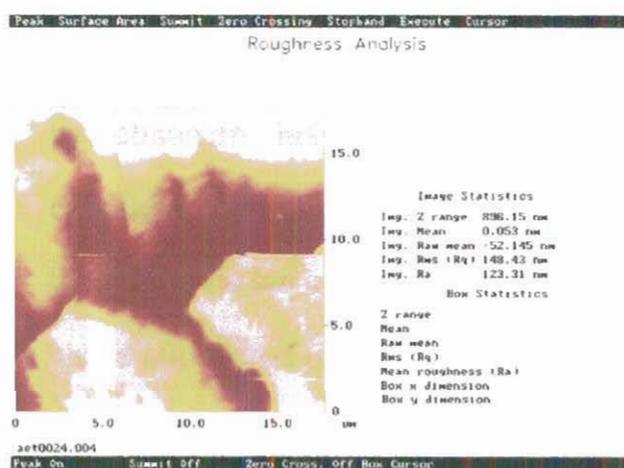
Height

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

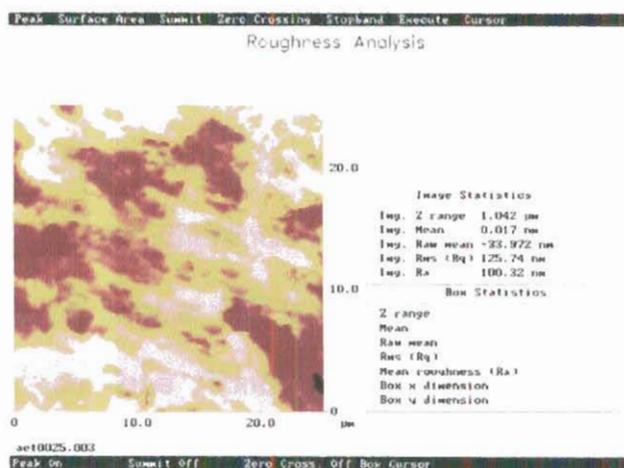
FIGURA 4. 13 Rugosidad AFM para electrografting



RET0011



AET0024G



AET0025F

Los nombres de las imágenes obtenidas se encuentran a la derecha de cada figura. Se tienen imágenes de topografía (3d), puntos de vista superior (plana) y las imágenes de análisis de la rugosidad (plano + cálculos). Las comparaciones que se hacen de las muestras son solo de las “vistas”, es decir, se compara solo las imágenes, ya que los valores numéricos que se obtuvieron la media muy poco permiten comparar. La rugosidad es un método numérico: la desviación estándar de la altura. Sin embargo este valor no lo dice todo. En el presente documento se observan las comparaciones de las imágenes AFM obtenidas. En la figura 4.11 se encuentra la comparación de la topografía de las imágenes (vistas en 3D). En la figura 4.12 las vistas superiores (planas) y en la figura 4.13 la comparación de las rugosidades, los valores “Img.” Son indicadores de la rugosidad de la superficie, si estos valores difieren mucho los unos de los otros, entonces se tendrían diferencias en la topografía de las superficies. Como se puede observar no hay mayor diferencia entre las imágenes de la topografía de la referencia RET001 (muestra sin monómero) con la que si contiene monómero AET0024, la misma imagen de “valle-montaña” se observa en las dos imágenes, prácticamente se observa la estructura policristalina del titanio. Y aunque si hay

diferencia entre estas dos con respecto a AET0025, ya que en ella no se ve “valle-montaña” sino mas bien pequeños picos, cuando se observa el valor de las rugosidades estos no difieren mayormente, sin embargo, la topología policristalina del titanio no se observa en esta muestra.

Con respecto a la técnica de electrografting, los resultados no fueron prometedores, una de las causas principales pudo ser el hecho de que el monómero se polimerice en la solución incluso antes de que el mismo se adhiera a la superficie del titanio, para descartar o coincidir con esta posibilidad se realizaron análisis de espectrometría de masas por electroespray ESI-MS (*electrospray ionization- mass spectrometry*), con ello se analizaban las soluciones que formaban parte de las celdas electroquímicas utilizadas en electrografting y se obtenían espectrómetros de masas de las soluciones. En la tabla VII se observan las características de las soluciones que fueron sometidas a esta técnica. Cuando se habla de “blanco” en esta técnica, se refiere a la solución que no ha sido modificada electroquímicamente. Se debe acotar además que esta técnica es muy sensible, por lo tanto, no se debe recargar de soluciones muy concentradas, por ello, fue necesario diluir las

soluciones en el orden de mil. En la figura 4.14 se observa el espectrómetro de masas de las diferentes soluciones, se sabe que la interpretación de los espectrómetros se vuelve compleja cuando no se conoce el tipo de sustancias que están envueltas en el compuesto analizado, pero como se sabe exactamente lo que se busca, se puede observar claramente que en los cuatro resultados aparece el pico correspondiente al monómero AEMA, este sería el de 129, en las muestras que fueron modificadas electroquímicamente, este pico aparece en una abundancia superior que en la de las soluciones que no fueron sometidas a electroquímica. Otro pico que es común en los cuatro análisis es el de 372.2, probablemente este se deba a algún tipo de polimerización, ya que es una molécula grande en comparación a las que se sabe que están en la solución, el valor de 581 también está presente en todos los espectrómetros, dando así un patrón de polimerización, no se sabe exactamente cuál es la molécula formada, lo que si resulta curioso es el hecho de que si esta molécula grande estuviese relacionada con el monómero, este se polimerizaría en la solución, incluso sin haber estado sometida a algún cambio electroquímico, esto podría deberse al tipo de solvente utilizado.

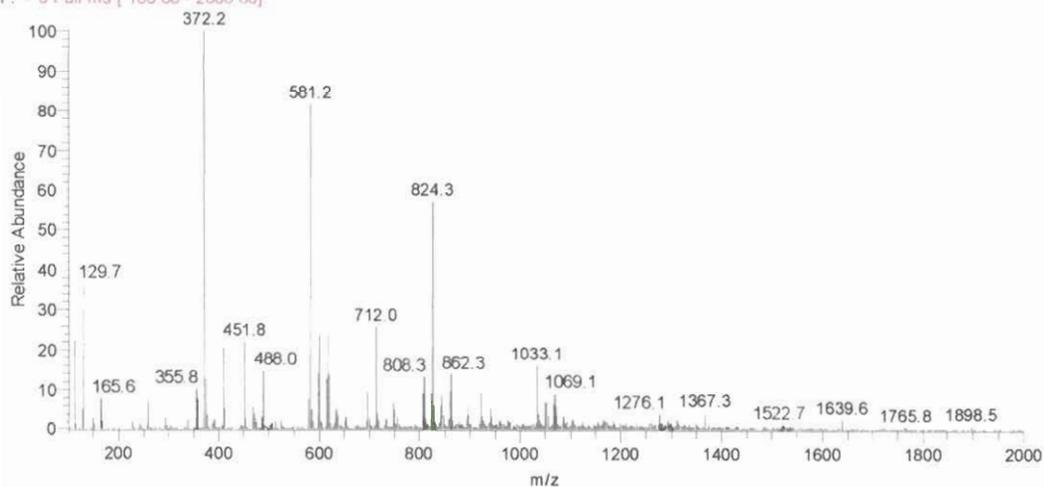
TABLA VII CARACTERÍSTICAS DE SOLUCIONES SOMETIDAS A ESI-MS

	SOLUCIÓN 1	SOLUCIÓN 2	SOLUCIÓN 3	SOLUCIÓN 4
MUESTRA	Blanco	AET0015	Blanco	AET0020
AEMA	0.3312 g	0.4150 g	0.3312 g	0.4144 g
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0.4562 g	0.5273 g	0.4562 g	0.5722 g
H_2SO_4	0.025 mM	0.025 M	NA	NA

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 14 a Solución 1, AEMA (0.1mM), H_2SO_4 (0.025 mM), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, sin modificación electroquímica

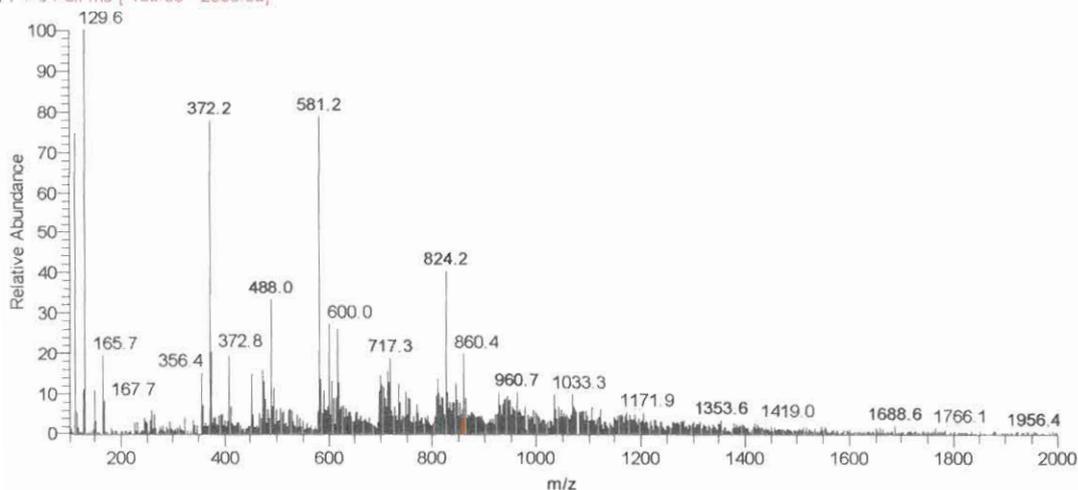
S#: 51-76 RT: 1 13-1 60 AV: 26 SB: 159 3.92-7 49 NL: 1 85E7
F: + c Full ms [100.00 - 2000.00]



Elaborado por: Vensterman J, Universidad de Gante (2010)

FIGURA 4.14 b Solución 2, AET0015

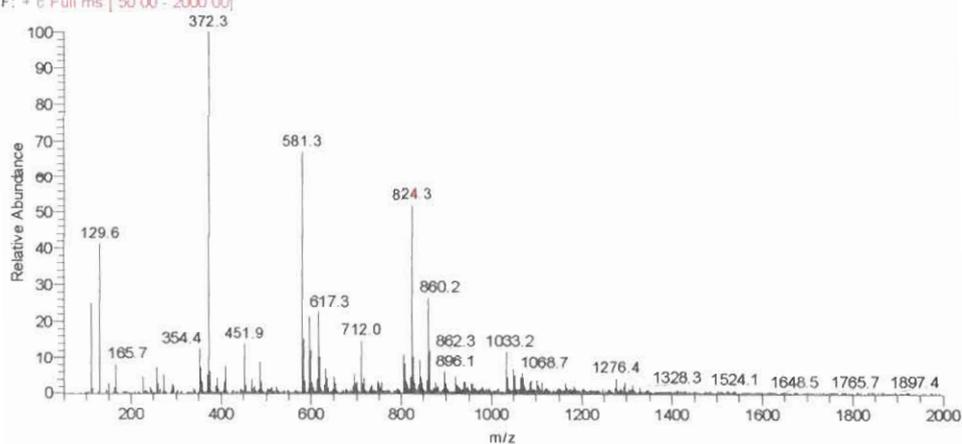
S#: 545-564 RT: 11.86-12.23 AV: 20 SB: 36 12 68-13.45 NL: 2.94E6
 F: + c Full ms [100.00 - 2000.00]



Elaborado por: Vensterman J., Universidad de Gante (2010)

FIGURA 4.14 c Solución 3, AEMA (0.1mM), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.1 Mm), sin modificación electroquímica

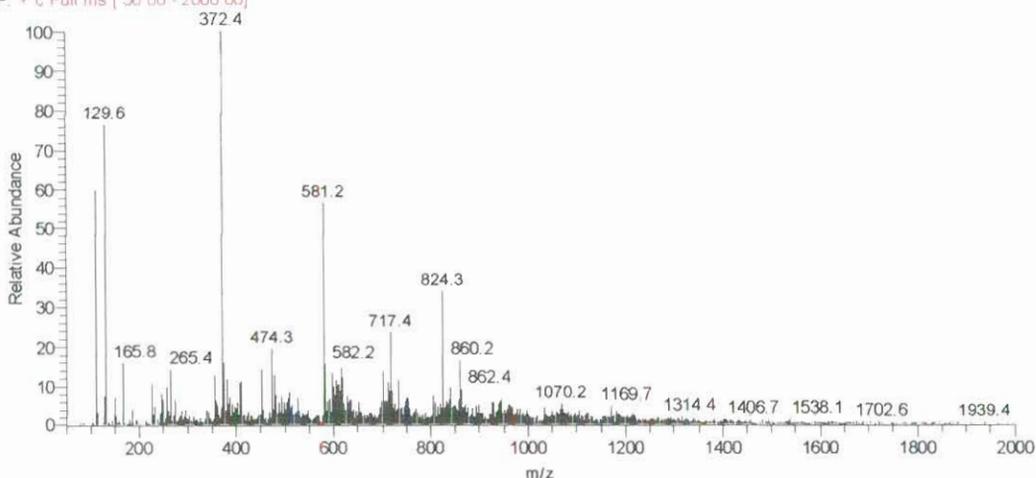
S#: 269-290 RT: 6.14-6.56 AV: 22 SB: 123 4 07-5 86 8 55-9 96 NL: 1.29E7
 F: + c Full ms [50.00 - 2000.00]



Elaborado por: Vensterman J., Universidad de Gante (2010)

FIGURA 4.14 d Solución 4 AET0020

S#: 57-71 RT: 1.39-1.69 AV: 15 SB: 141 0 29-1 14, 3 10-5 91 NL: 2.19E6
 F: + c Full ms [50 00 - 2000 00]



Elaborado por: Vensterman J, Universidad de Gante (2010)

4.2. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE SELF ASSEMBLY

4.2.1. RESULTADOS DE ÁNGULO DE CONTACTO ESTÁTICO.

Uno de los primeros análisis que se deben efectuar no solo por lo sencillo que son, sino para comprobar si se ha alterado la superficie del titanio es la medición del ángulo de contacto estático. Esta técnica es adecuada para conocer si una superficie es hidrofílica o hidrofóbica, ya que el principal objetivo del estudio es injertar una amina sobre la superficie del titanio, el resultado que se espera es que las muestras de titanio modificadas con APTES y dopamina tengan una tendencia hidrofílica.

La tabla VIII indica las muestras que se prepararon para esta técnica. Se hicieron pruebas con concentraciones diferentes de APTES y con diferentes tiempos de reacción, mientras que para la dopamina solo se varió el tiempo de reacción y la concentración se la mantuvo constante. También se prepararon muestras en gelatina para los casos definidos anteriormente, se evaluó la modificación del titanio en sus primeras etapas y ensayos con incubación en una solución de PBS.

El software OCA20 por medio de ecuaciones obtiene una serie de datos en función del tiempo, donde mide el ángulo de contacto de la gota de agua sobre la superficie del metal. Con estos datos se puede graficar el ángulo de contacto estático vs. el tiempo. Dependiendo de la curva que se obtiene se puede comprobar qué clase de superficie se tiene, hidrofílica o hidrofóbica. Para esta técnica se utilizaron placas de titanio sobre las cuales se realizaron tres mediciones en ellas, y basándonos en éstas, se utilizan cálculos estadísticos para verificar si la superficie era hidrofílica o hidrofóbica. Sobre la superficie de dichas placas de titanio se dejaba caer la gota y se medía el ángulo desde ese momento hasta cuando la misma se estabilizaba sobre la superficie en el tiempo programado.

Con los datos obtenidos se determinó la media y la desviación estándar del ángulo de contacto al inicio² y al final del proceso, para visualizar mejor cómo la gota se iba estabilizando en la superficie.

TABLA VIII Ensayos preparados para el análisis de SCA

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	TIEMPO(h)			
		Reacción	Gelatina B	EDC	Incubación PBS
Titanio Comercial	NA	NA	NA	NA	NA
Titanio Pre-tratado	NA	NA	NA	NA	NA
Titanio Oxidado	NA	NA	NA	NA	NA
Titanio con dopamina	2 mg/mL	24	NA	NA	NA
		24	24	NA	NA
		24	NA	NA	24
		24	NA	NA	24 2
		3	NA	NA	NA
		3	24	NA	NA

² Cuando se habla del "inicio del proceso" se refiere al primer segundo en el que la gota se estabiliza en la superficie y el ángulo puede ser medido y "el final del proceso" se refiere al ángulo medido a los treinta segundos.

(Continuación) Tabla VIII Ensayos preparados para el análisis de SCA

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	TIEMPO(h)			
		Reacción	Gelatina B	EDC	Incubación PBS
Titanio con dopamina	2 mg/mL	Reacción	Gelatina B	EDC	Incubación PBS
		24	NA	NA	2
		24	NA	NA	24
		NA	NA	NA	0
		1	NA	NA	2
		1	NA	NA	24
		NA	NA	NA	NA
		24	1	4	2
		24	1	4	24
	5%	24	NA	NA	NA
		24	NA	NA	2
		24	NA	NA	24
		1	NA	NA	NA
		1	NA	NA	2
		1	NA	NA	24
		24	1	4	2
		24	1	4	24

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Se explicó en el capítulo II que antes de injertar una amina sobre la superficie del titanio, éste se sometía a una serie de pasos previos para hacerlo biocompatible, es decir, al titanio puro se le hacía un pre-tratamiento y además se lo oxidaba. Se hicieron mediciones del ángulo de contacto estático para observar cómo la superficie se iba modificando en el transcurso del proceso. Cada vez que se hacía una medición en la placa de titanio, el software OCA20 calculaba inmediatamente el ángulo de contacto durante un tiempo establecido por el operador, en el cual se mostraba un gráfico y una tabla con todos los datos recolectados. En la tabla IX se muestra la medición de la muestra de titanio puro, donde el tiempo de grabación fue de 30 segundos, para el cálculo del ángulo de contacto se usó el método de ajuste de Young-Laplace para la gota de agua.

TABLA IX Ejemplo de los datos recolectados con el software OCA20

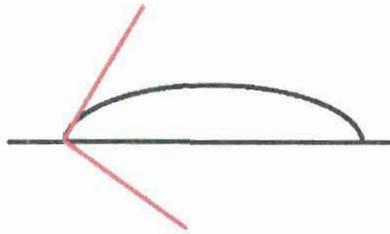
Tiempo	1.965	2.964	3.963	4.961	5.96	6.958	7.957	8.955	9.954
CA (L)	63.1	57.1	53.58	52.07	51.2	50.06	49.34	48.57	48.14

Elaborado por: 2 Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

La curva que se observa en la figura 4.16 es de una superficie hidrofílica, en la cual la gota se extiende sobre la superficie. En la medición del ángulo de contacto con Young-Laplace

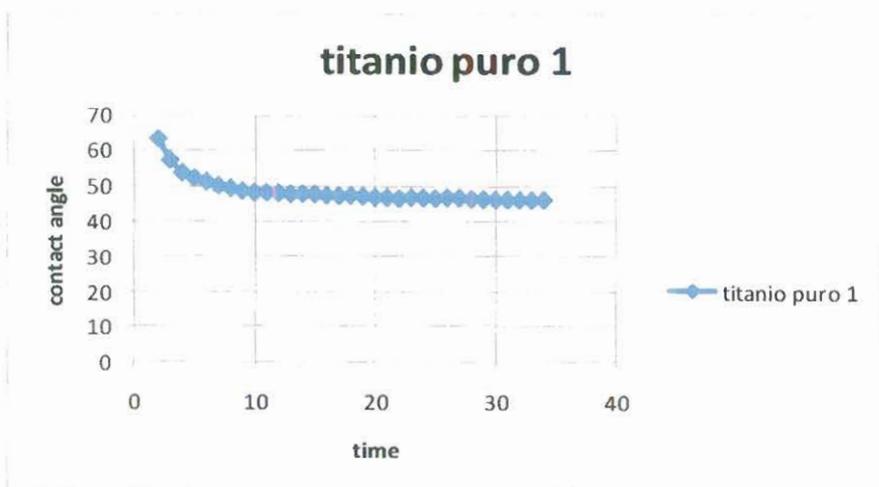
solo se calcula utilizando el lado izquierdo del ángulo de la gota. Cabe recalcar que para todas las mediciones se usó el método antes mencionado. En la figura 4.15, se demuestra cómo se va calculando el ángulo durante el tiempo.

FIGURA 4. 15 Medición del ángulo de contacto de una gota utilizando del método de Young-Laplace.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

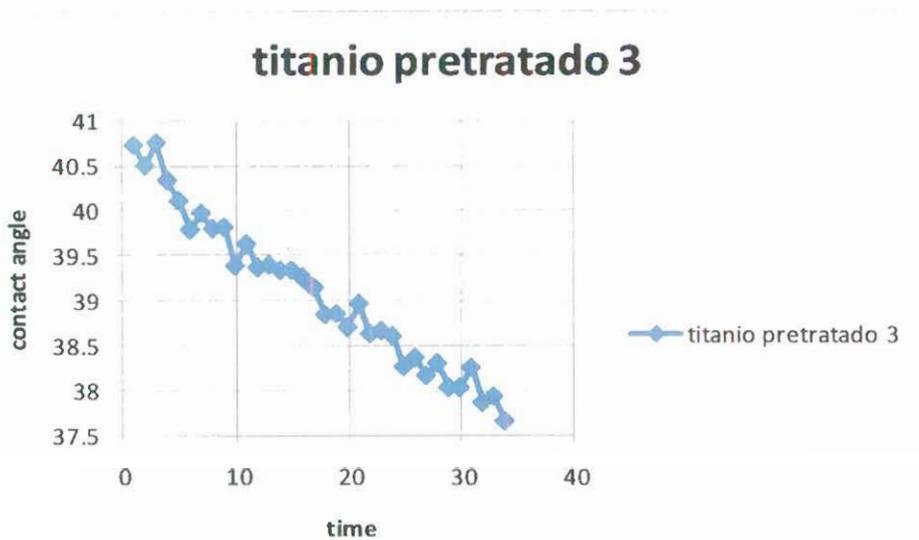
FIGURA 4. 16 Variación del ángulo de contacto en el tiempo para el titanio puro



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Para el titanio pre-tratado se observó una curva menos suave. Existen tres factores que inciden en que la gráfica de medición del ángulo de contacto sea irregular: la vaporización, la gravedad y la emulsificación de la atmósfera.

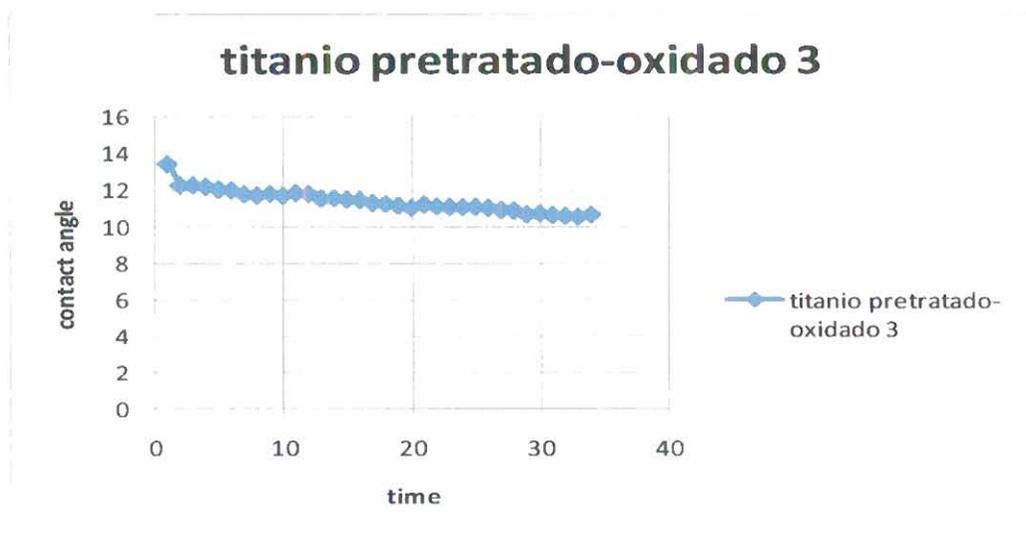
FIGURA 4. 17 Variación del ángulo de contacto en el tiempo para el titanio pre-tratado



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

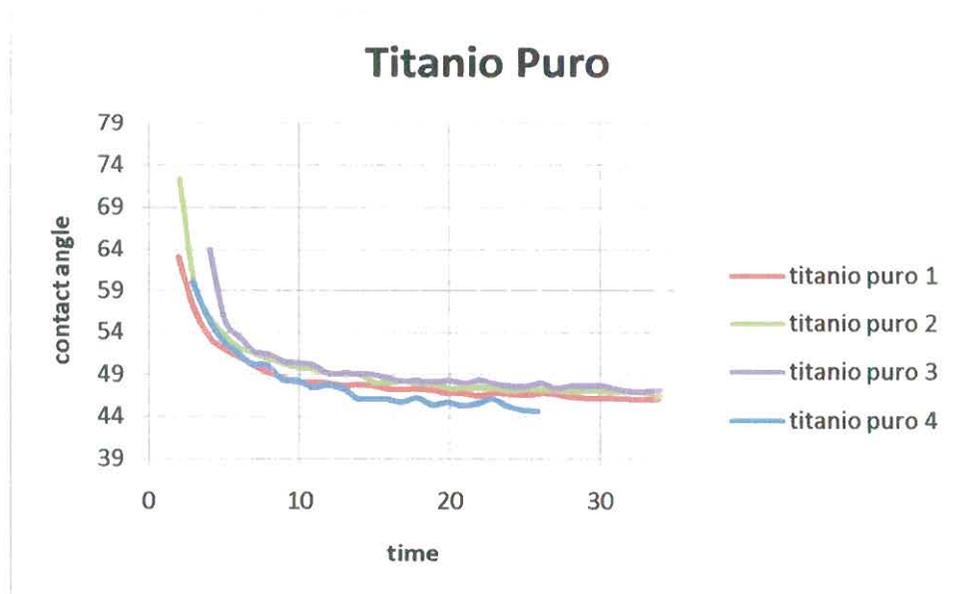
En la figura 4.18 se muestra la curva de titanio oxidado, en donde se puede observar que es más hidrofílica en comparación al titanio comercial. A cada placa se le hizo mínimo tres mediciones y se graficaron sus curvas para una comparación subjetiva. Como se observa todas tienen la misma tendencia, y la superficie es hidrofílica.

FIGURA 4. 18 Variación del ángulo de contacto en el tiempo para el titanio oxidado.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

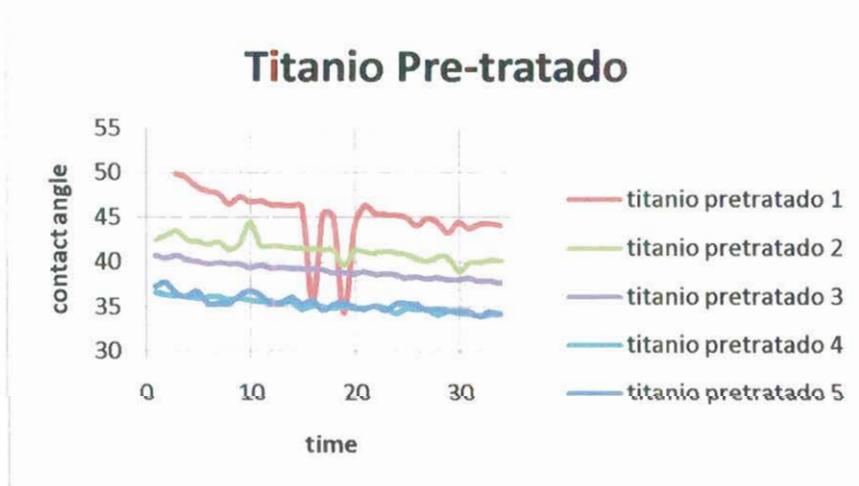
FIGURA 4. 19 Variación del ángulo de contacto en el tiempo para el titanio puro, comparación.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Al comparar las curvas del titanio pre-tratado, se observa que la mayoría tenían una forma irregular, son menos hidrofílicas ya que no presentaron la curva típica.

FIGURA 4. 20 Variación del ángulo de contacto en el tiempo para el titanio pre-tratado, comparación.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Cuando ya se tuvieron las mediciones de cada una de las placas, se recurrió a un análisis estadístico de los datos obtenidos. Para cada medición se tomó el ángulo de contacto inicial y el ángulo de contacto final. Se calculó el promedio y la desviación estándar, y con esta información se pudo visualizar la tendencia de las curvas, cómo esta disminuía su ángulo de

contacto al caer la gota sobre la superficie del titanio y esta era atraída forzosamente hasta desplazarse por toda la superficie del sólido.

TABLA X Ángulos de contacto [grados] de las muestras de titanio comercial, pre tratado y oxidado

	Titanio comercial	Titanio pre-tratado	Titanio oxidado
Inicio	63,42±6,65	41,31±4,96	9,61±3,59
Final	46,11±1,06	38,03±4,17	8,14±3,25

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

En la tabla X se puede apreciar que los ángulos de contacto de esta muestra disminuyeron con el tiempo, se entiende que la gota se fue extendiendo por la superficie y que la superficie fue hidrofílica. También se observa que cada vez que se modificaba la superficie ésta tendía a hacerse más hidrofílica, ya que la superficie del titanio oxidado presentó el menor ángulo de contacto en comparación al titanio comercial y al pre-tratado.

La humectancia de la superficie del titanio comenzó a cambiar cuando el mismo se someta a una limpieza severa, el ángulo de contacto disminuyó desde un ángulo de contacto del titanio comercial de 63,42° a 41,31° del titanio pre-tratado, esto

corresponde a un 35% de disminución, esto puede ser debido a que en un titanio pre-tratado se encuentra expuesta la capa de un titanio oxidado de una superficie no contaminada. La superficie de metal cubierta con una capa contaminada inicialmente presentó mayor ángulo de contacto que la muestra que se había sido sometida a un pre-tratamiento, porque contiene hidrocarburos. Mientras que en la etapa de oxidación el ángulo de contacto disminuyó significativamente, comparándolo con un titanio comercial se obtuvo un 85% de disminución.

En las mediciones de 1% de concentración de APTES (tabla XI), las curvas tendieron a ser menos hidrofílicas al compararlas con un titanio comercial y un titanio pre-tratado. Presentó un ángulo de contacto mayor cuando tuvo un tiempo de reacción alto y cuando se incubó en PBS se volvieron más hidrofílicas.

TABLA XI Ángulos de contacto [grados] de las muestras de titanio 1% APTES

Medición	APTES 24h	APTES 1h	APTES 1h INC 2h	APTES 24h INC 24h	APTES 24h INC 2h
Inicio	69,14±4,38	56,12±1,75	36,11±4,27	27,99±2,23	31,51±11,86
Final	56,71±4,23	50,84±1,98	29,60±2,32	25,10±3,32	33,18±2,19

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Para una concentración de 5% de APTES (tabla XII), los ángulos de contacto al inicio fueron menores en comparación al 1% APTES. Es decir, la superficie se iba haciendo más hidrofílica a medida que se incrementaba la concentración de aminas en una superficie de titanio. Además en la etapa de incubación se presenta el menor ángulo de contacto.

TABLA XII Ángulos de contacto [grados] de las muestras de titanio 5% APTES

Medición	APTES 24 h	APTES 1 h	APTES 1h INC 2 h	APTES 24 h INC 24 h	APTES 24 h INC 2 h	APTES 1 h INC 24 h
Inicial	58,81±8,1	46,82±12,77	32,04±19,98	21,70±4,57	18,57±9,37	9,17±2,06
Final	49,13 ±13,6	42,89±13,35	28,71±17,47	19,07±4,22	18,49±11,52	9,05±11,52

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Una vez que se hicieron las pruebas injertando la amina, se procedió a un siguiente paso, que fue la adición de un biopolímero para simular la afinidad que tiene el recubrimiento con el cuerpo humano, ya que se pretendía además que la placa de titanio se quede inmovilizada en el cuerpo, esto era lo que garantizaba que la placa no se fuera a despegar, el biopolímero que se utilizó para el presente caso de estudio fue la gelatina B. La placa del titanio con APTES fue sumergida en gelatina B y después en EDC, la amina reaccionó con la gelatina B formando enlaces entrecruzados, lo que creó unas

multicapas en la superficie. En esta etapa se observó que la gota de agua sufrió una atracción mayor a la superficie, los ángulos de contacto cada vez se hicieron más pequeños en comparación a las muestras de titanio que contenían solo concentraciones de aminos. En la tabla XIII se observa que a medida que el tiempo de incubación aumentaba, el ángulo de contacto disminuía.

TABLA XIII Ángulos de contacto [grados] de las muestras de titanio con APTES con gelatina B en EDC

Medición	1% APTES 24h Gel B- EDC 2h inc	1% APTES 24h Gel B- EDC 24h inc	5% APTES 24h Gel B- EDC 24h inc	5% APTES 24h Gel B- EDC 2h inc
Inicial	49,28±5,59	21,72±4,96	44,89±2,70	49,17±2,71
Final	41,73±15,83	16,01±4,63	40,08±1,57	44,03±3,39

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

El recubrimiento de la superficie del titanio utilizando dopamina es una técnica de deposición. En este caso se hicieron diferentes muestras para observar cómo se veía afectada la superficie bajo ciertas condiciones. Se incubaron las muestras en PBS, ya que se pretendía simular el interior del cuerpo humano, es por esta razón se utilizó un búfer ya que se quería

analizar la interacción de la placa del titanio modificada con una amina en un medio que es similar al de un cuerpo humano por el pH. A la vez, se hicieron muestras con gelatina B para observar la superficie con el biopolímero, y poco a poco se iban alterando las condiciones, para conocer cómo cambiaba el ángulo de contacto de las superficies respectivas.

Como se puede observar en la tabla XIV entre más tiempo de reacción menor era el ángulo de contacto, cuando se colocaba un biopolímero la disminución era mayor, pero al incubar la placa de titanio en PBS los ángulos de contacto no disminuían tanto.

TABLA XIV Ángulos de contacto [grados] de las muestras de titanio con dopamina

Medición	Inicial	Final
DOPAMINA 24 h	27,22±1,56	22,34±2,67
DOPAMINA 3 h	45,74±7,36	38,78±6,39
DOPAMINA 24h INC PBS	13,30±1,81	11,68±1,66
DOPAMINA 24h INC 24h inc 2h	21,66±1,83	17,48±2,15
DOPAMINA 3h INC gelatina	20,68±2,17	17,01±1,97
DOPAMINA 24h INC gelatina	16,39±1,56	14,41±1,56
DOPAMINA 24h gelb-24h PBS	19,48±2,78	13,90±0,55
DOPAMINA 24h- 2h INC PBS	34,54±5,01	29,71±2,89
DOPAMINA 24h-GELB-2h INC PBS	27,23±1,95	23,22±1,19

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

4.2.2. MICROSCOPIO DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

Se utilizó este análisis para observar la superficie de las muestras y así comprobar si se alteró la superficie del metal. Antes de visualizar la superficie se preparó las muestras y se realizó pruebas de coloración, en las que el titanio se tiñó de azul, luego de lo cual se enjuagaba por unos minutos con metanol. Con esta prueba solo las muestras que contenían proteínas mantenían la coloración azul, en este caso las muestras que contenían un recubrimiento de gelatina presentaron cierta coloración. La tabla XV describe las muestras que se utilizaron para esta prueba analítica.

TABLA XV Ensayos para el SEM, Self Assembly

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	Tiempo (h)		
		Reacción	Gelatina B	EDC
Titanio Comercial	Ninguno	NA	NA	NA
Titanio Pre-tratado	Ninguno	NA	NA	NA
Titanio Oxidado	Ninguno	NA	NA	NA
Titanio Dopamina	2mg/mL	24	NA	NA
		24	24	NA
		3	NA	NA
		3	24	NA

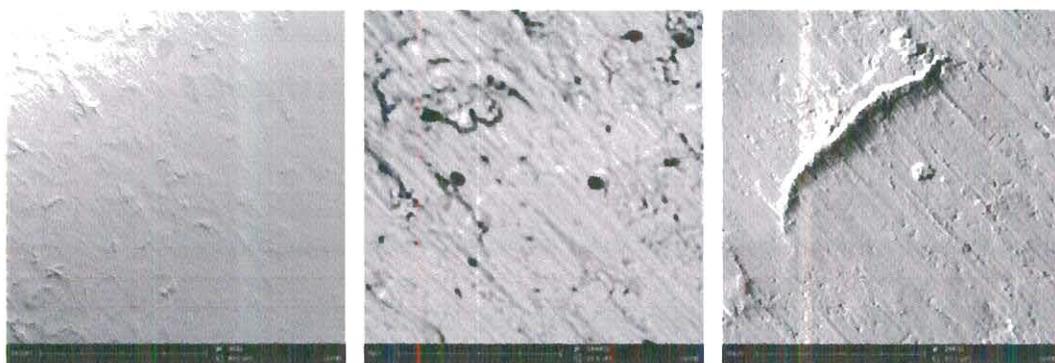
Tabla XV Ensayos para el SEM, Self Assembly				
MUESTRA	CONCENTRACIÓN	Tiempo (h)		
		Reacción	Gelatina B	EDC
Titanio APTES	1%	24	NA	NA
		1	NA	NA
		24	1	4
		1	1	4
	5%	24	NA	NA
		1	NA	NA
		24	1	4
		1	1	4

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Se observaron superficies del titanio comercial antes y después de un pre-tratamiento. Las imágenes fueron capturadas con diferentes ángulos, para poder visualizarlos en diferentes topografías y enfoques. Las imágenes fueron de tres tipos, una completa donde el haz de electrones incide perpendicularmente, topográficas A y B, donde el haz incidía diagonal a la superficie. Las imágenes expuestas muestran la modificación de la superficie del titanio, el primer grupo de imágenes corresponden a una muestra de titanio comercial (Figura 4.21), en el cual se observó la superficie casi lisa con pequeñas estrías. Después, en las figuras 4.22 la superficie

sufrió un pre-tratamiento severo y se observó una superficie rugosa. Pero la superficie que presentó una mayor rugosidad fue el titanio oxidado, se observó una mayor cantidad de estrías en toda la muestra (Figura 4.23).

FIGURA 4. 21 Imágenes de SEM del Titanio comercial por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



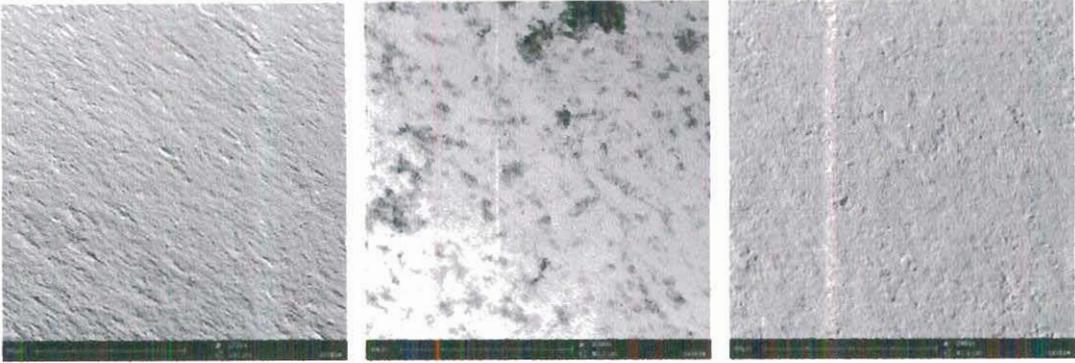
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 22 Imágenes de SEM del Titanio pre-tratado por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

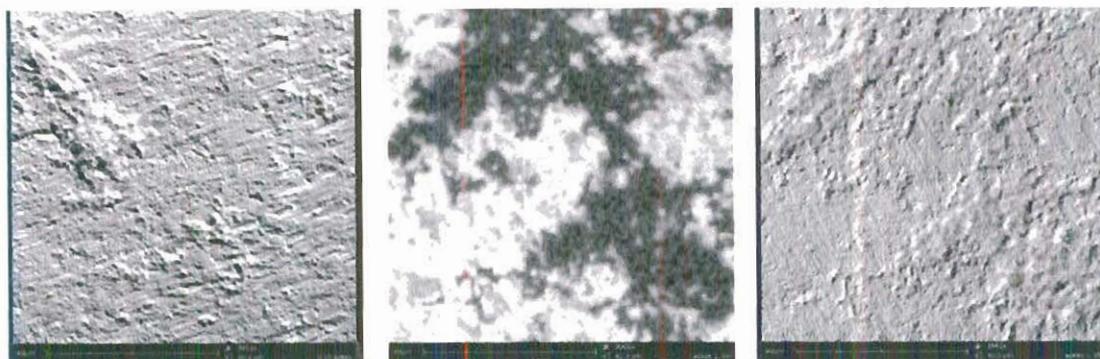
FIGURA 4. 23 Imágenes de SEM del Titanio oxidado por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Se preparó las muestras con diferentes concentraciones de APTES, y diferentes tiempos de reacción. Las imágenes que se muestran a continuación son de una concentración de 1% con un tiempo de reacción de una hora. Una de las características de las muestras de APTES es que se pudo observar agregados en la superficie del titanio con o sin recubrimiento de gelatina. Debido a que el APTES tiende a reaccionar así, en las imágenes presentadas en la figura 4.24 se pueden visualizar estos agregados (manchas negras), a pesar de que tenían solamente una hora de reacción y que tenían una concentración baja.

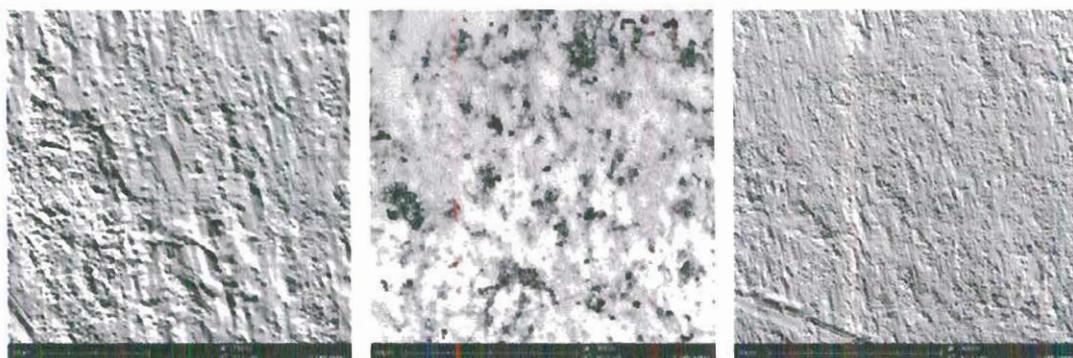
FIGURA 4. 24 Imágenes de SEM del Titanio con 1% APTES, reacción de una hora por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Cuando se aumentó el tiempo de reacción para una concentración baja, se visualizó una mayor cantidad de agregados como las presentadas en la figura 4.25.

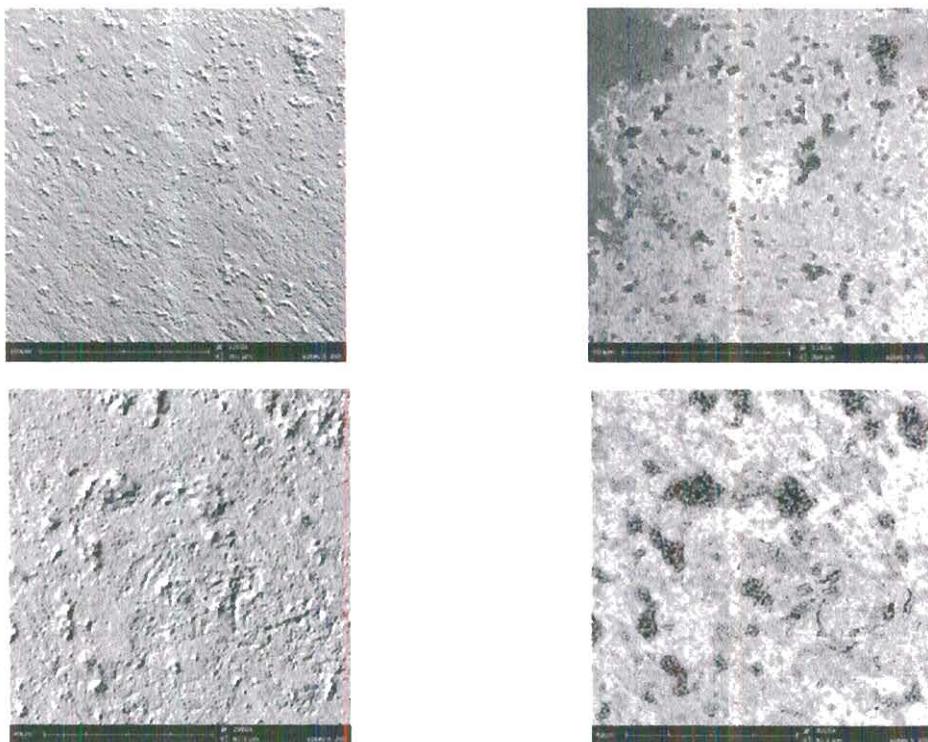
FIGURA 4. 25 Imágenes de SEM del Titanio con 1% APTES, reacción de 24 horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

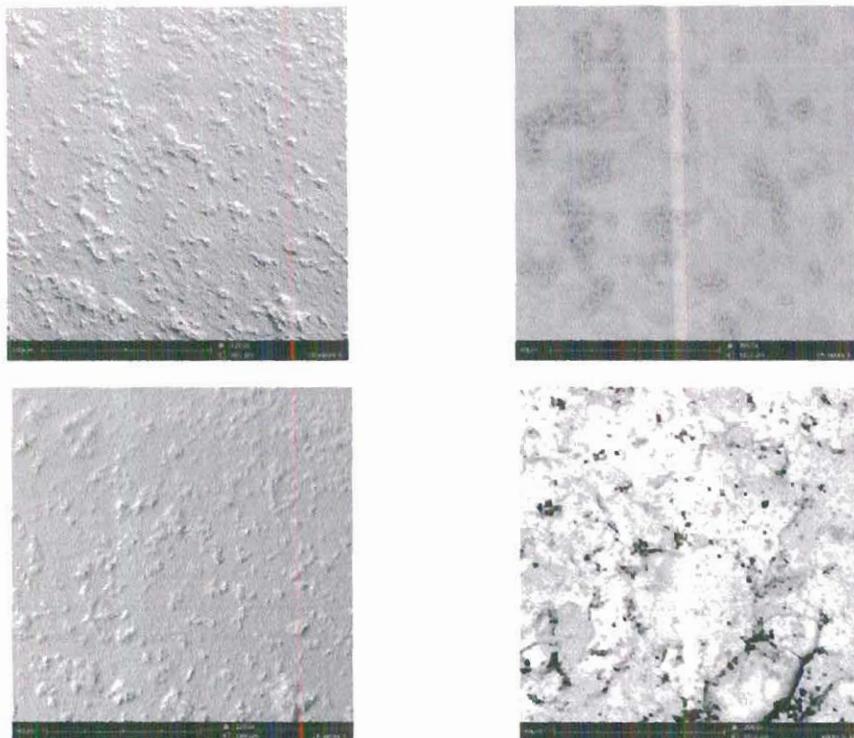
A medida que se aumentó la concentración de amina se observó mayor cantidad de agregados. Las imágenes de la figura 4.26 corresponden a muestras de titanio con una concentración del 5% a un tiempo de reacción de 24h, mientras que en la figura 4.27 se muestra de un tiempo de reacción de una hora.

FIGURA 4. 26 Imágenes de SEM del Titanio con 5% APTES, reacción de veinticuatro horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

FIGURA 4. 27 Imágenes de SEM del Titanio con 5% APTES, reacción de una hora por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.

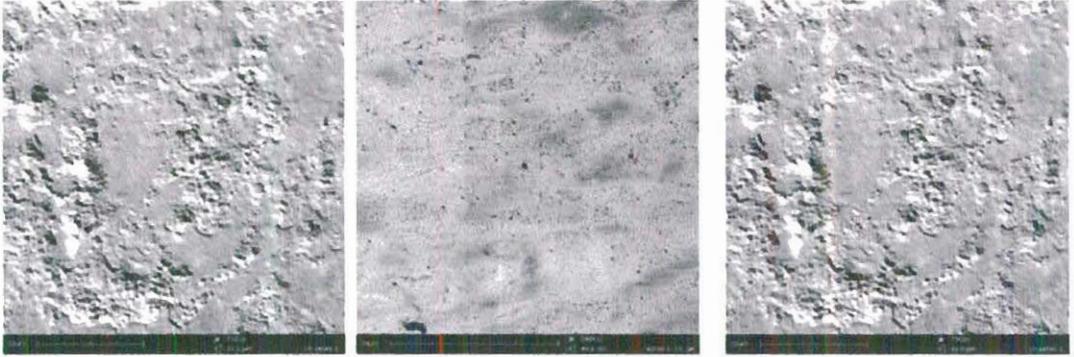


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Para estas mismas condiciones, se preparó unas muestras con recubrimiento de gelatina, en las siguientes imágenes se observó mejores agregados en la superficie del titanio que tenían gelatina comparadas con aquellas que no la tienen, y entre mayor concentración de APTES que había, se observaba un mejor recubrimiento.

El primer grupo de imágenes (figura 4.28) consta de una muestra que tiene recubrimiento de gelatina para un APTES con una concentración de uno por ciento en un tiempo de reacción de una hora, el segundo grupo de imágenes (figura 4.29) tiene un tiempo de reacción de 24 horas.

FIGURA 4. 28 Imágenes de SEM del Titanio con 1% APTES con gelatina, reacción de una hora por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

FIGURA 4. 29 Imágenes de SEM del Titanio con 1% APTES con gelatina, reacción de veinticuatro horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.

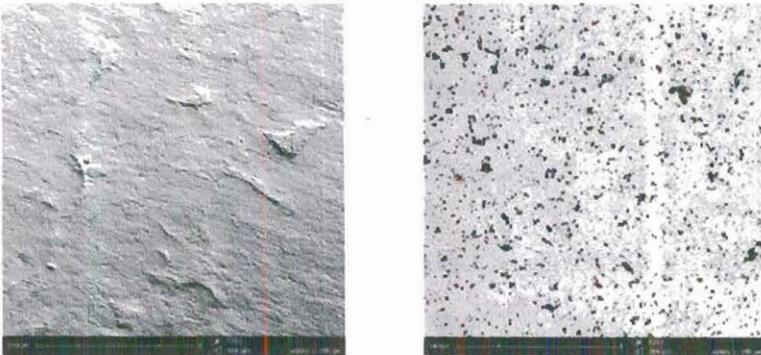
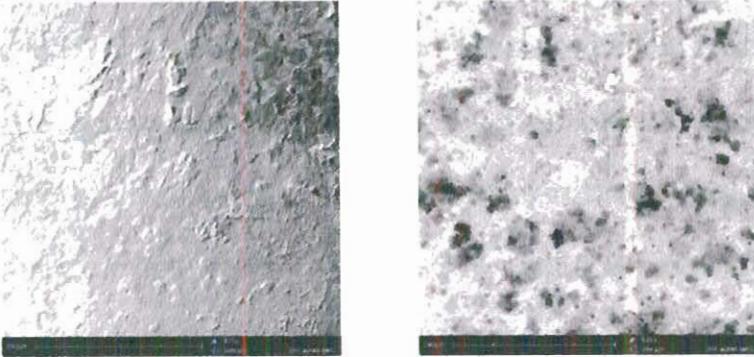


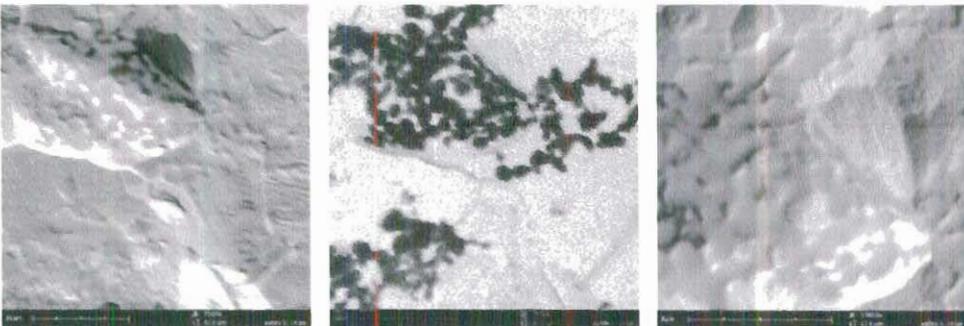
Figura 4.29 Imágenes de SEM del Titanio con 1% APTES con gelatina, reacción de veinticuatro horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

En una concentración de 5% se observó las siguientes características en las imágenes. En las imágenes del primer grupo (figura 4.30) es para un tiempo de reacción de una hora. La superficie del titanio tiene una mejor representación de los agregados, donde se encuentran entrecruzados con el biopolímero.

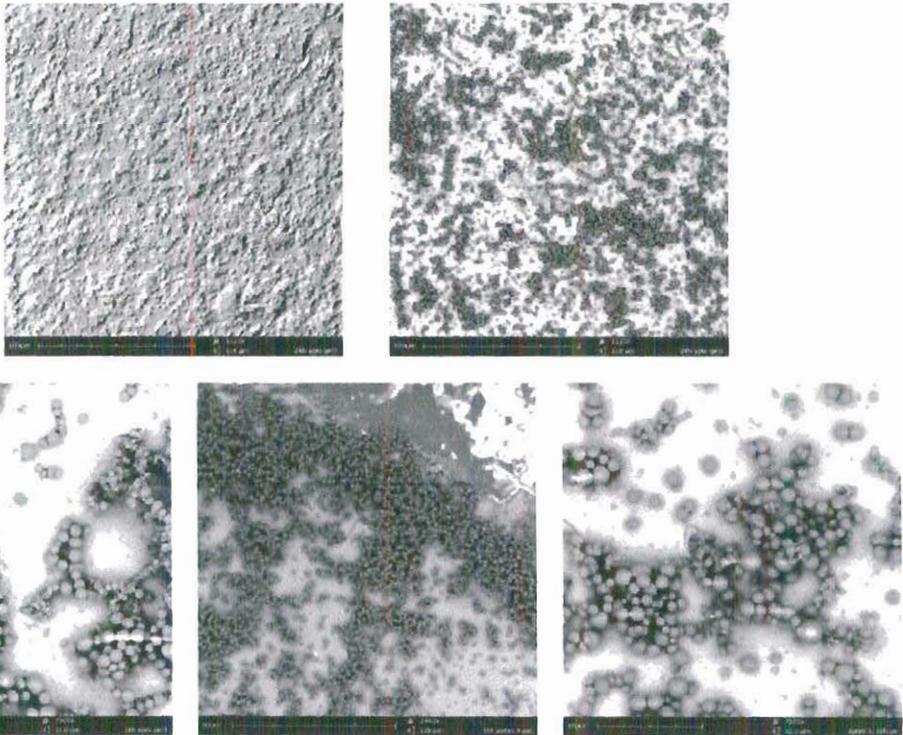
FIGURA 4. 30 Imágenes de SEM del Titanio con 5% APTES con gelatina, reacción de una hora por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

En este segundo grupo (figura 4.31), el recubrimiento de gelatina fue para una concentración del 5% de APTES en un tiempo de reacción de 24 horas. Utilizando estas condiciones se obtuvo un mejor recubrimiento con la gelatina, ya que se enlaza mejor a la amina que se encuentra injertada en la superficie del titanio. Estas fotografías de la superficie demostraron que tenían un mejor entrecruzamiento, y que la gelatina creó más capas sobre el titanio, donde prácticamente la gelatina dominó el enlace entre ellos.

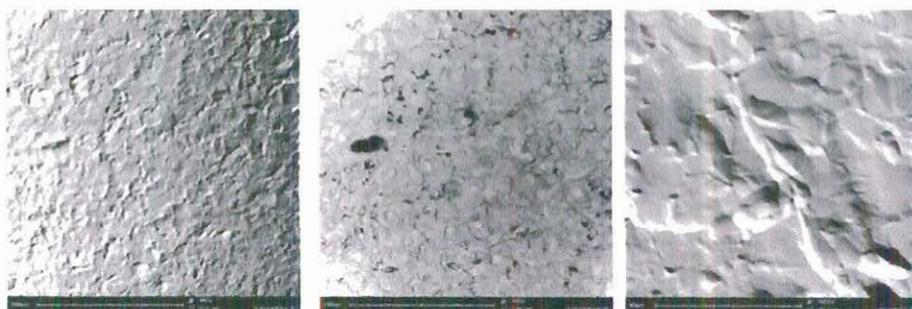
FIGURA 4. 31 Imágenes de SEM del Titanio con 5% APTES con gelatina, reacción de veinticuatro horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

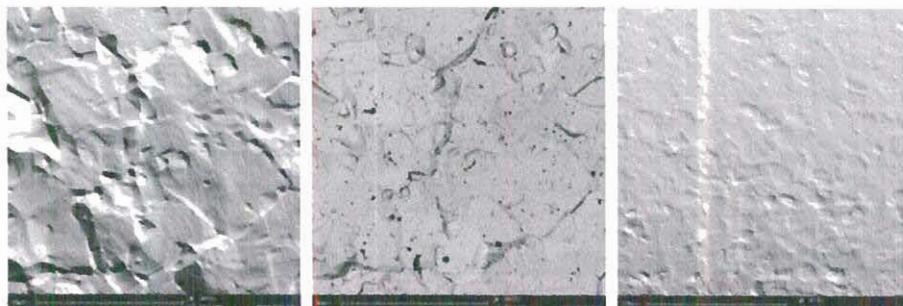
Los ensayos de deposición con dopamina no presentaron el mismo resultado en comparación con los ensayos de *silinización*, debido que las capas fueron mucho más finas y más homogéneas. Las primeras imágenes (figura 4.32) fueron de un tiempo de reacción de 3 horas y las segundas fueron de un tiempo de reacción de 24 horas (figura 4.33). Al tener un tiempo de reacción mayor, se observó un mejor recubrimiento en la superficie.

FIGURA 4. 32 Imágenes de SEM del Titanio con Dopamina, reacción de 3 horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

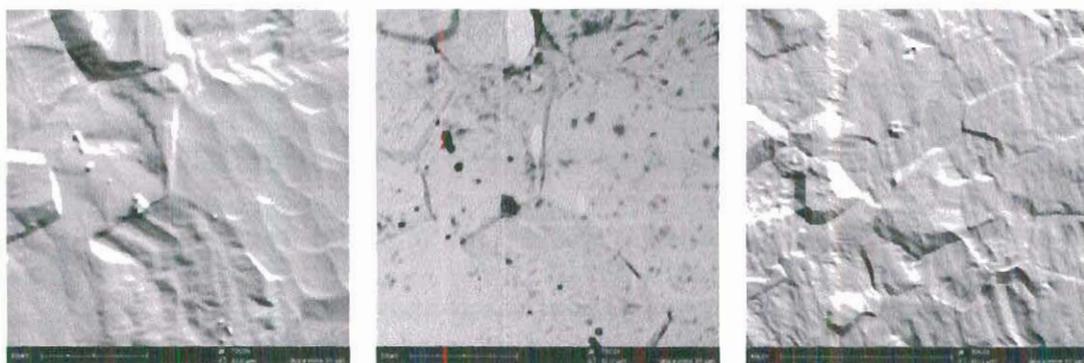
FIGURA 4. 33 Imágenes de SEM del Titanio con Dopamina, reacción de 24 horas por el método de *Self Assembly*, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Finalmente se muestran imágenes con recubrimiento de gelatina para muestras con dopamina, considerando los tiempos de reacción mencionados con anterioridad.

FIGURA 4. 34 Imágenes de SEM del Titanio con Dopamina reacción de tres horas por el método de *Self Assembly* con recubrimiento de gelatina, (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

FIGURA 4. 35 Imágenes de SEM del Titanio con Dopamina reacción de 24 horas por el método de *Self Assembly*, con recubrimiento de gelatina (a) Topografía B, (b) Imagen completa y (c) Topografía A Titanio con Dopamina, reacción de 24 horas.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

El titanio con dopamina presentó una mejor interacción con el biopolímero. Debido a que recubre toda la superficie del titanio con una película fina. Entre más tiempo de reacción de la, se recubre mejor a la superficie sin necesidad de aglomerados como la reacción de silanización.

4.2.3. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

La técnica analítica de AFM demuestra mediante imágenes la diferencia morfológica y la rugosidad de la superficie de una muestra en nano escala, con ella se puede visualizar los picos que se presentan en la muestra y se analiza con un diagrama topográfico la superficie. Se puede obtener varias imágenes mediante el software NanoScope (R) IIIa, entre ellas: una imagen completa de la superficie, un diagrama topográfico, la altura de los ejes, zoom de la superficie, análisis de rugosidad, etc.

En esta técnica de caracterización se obtuvo varias imágenes para cada una de las muestras, se analizó la topografía de las muestras y el análisis de la rugosidad de las superficies.

A continuación la tabla XVI indica las pruebas que se realizó para este análisis, los tipos de muestras, la concentración que se utilizó para la preparación de éstas y el tiempo de reacción. El titanio que se usó para las diferentes muestras fue de presentación laminar y debido al tipo de análisis no se debe enjuagar con acetona solo con agua y no se debe secar con aire debido a que no es conveniente que la lámina se doble por la presión con la que el aire sale, en su lugar se seca con nitrógeno a una presión mínima para no afectar la forma de la lámina.

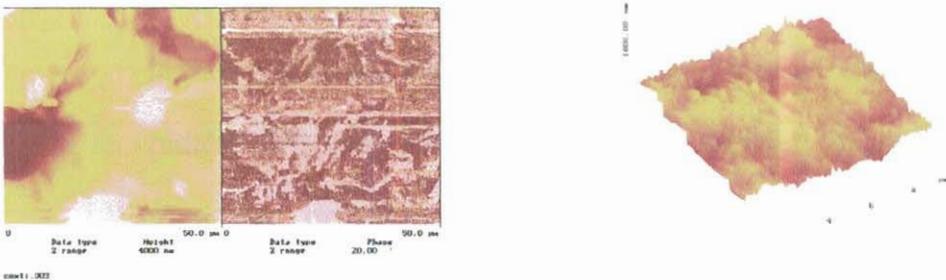
TABLA XVI Muestras que se prepararon para el análisis de AFM.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	TIEMPO(h)		
		Reacción	Gelatina B	EDC
Titanio Comercial	NA	NA	NA	NA
Titanio Pre-tratado	NA	NA	NA	NA
Titanio Oxidado	NA	NA	NA	NA
Titanio con Dopamina	2mg/mL	24	NA	NA
		24	24	NA
		3	NA	NA
		3	24	NA
Titanio con APTES	1%	24	NA	NA
		1	NA	NA
		24	1	4
		1	1	4
	5%	24	NA	NA
		1	NA	NA

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

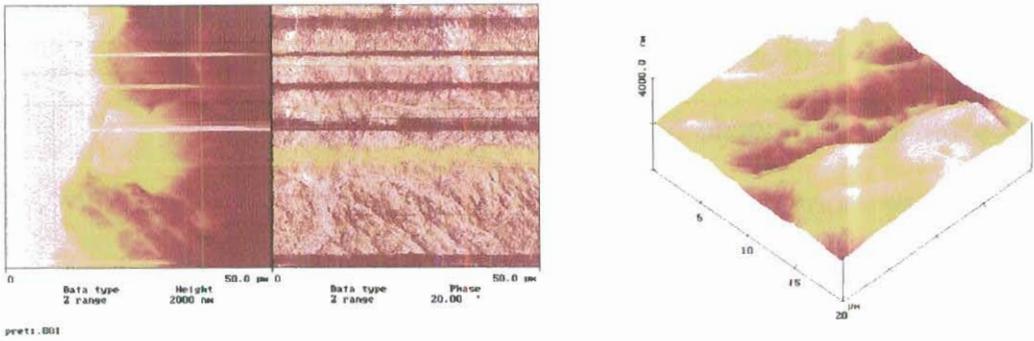
El titanio comercial es aquel que proviene directamente de la fábrica, es el titanio puro, éste aún no tiene modificación alguna en su superficie. Debido a que contiene impurezas, es decir, partículas suspendidas provenientes del entorno, se pudieron observar picos altos en su diagrama topográfico (figura 4.36) y en su análisis de la rugosidad el resultado fue de 52 nm. La superficie del titanio pre-tratado no muestra en su diagrama topográfico (figura 4.37) picos elevados, debido a que el proceso de limpieza es tan severo que remueve capas de la superficie del titanio, además contiene pocos enlaces de grupos hidroxilos. El titanio que se ha sometido al proceso de oxidación (figura 4.38), presentó picos más elevados que el del titanio comercial. Debido a que la superficie sufrió una oxidación, la rugosidad que presentó fue mayor a la de los procesos anteriores. El análisis de rugosidad fue de 119 nm.

FIGURA 4. 36 Imágenes de titanio comercial en AFM



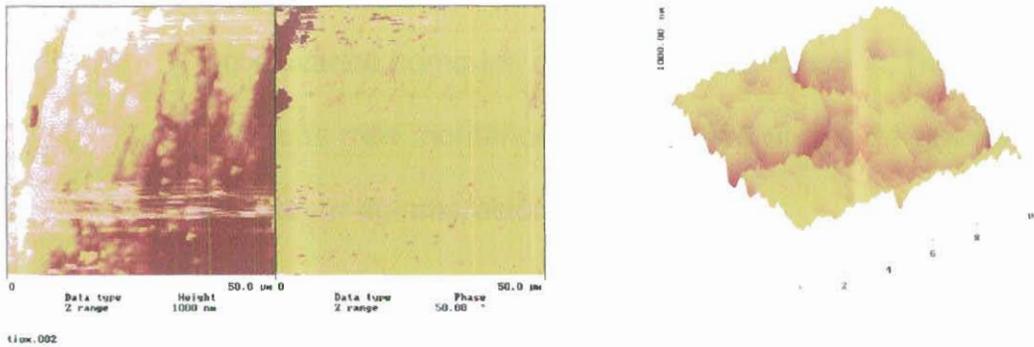
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 37 Imágenes de titanio pre-tratado en AFM



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 38 Imágenes de titanio oxidado en AFM

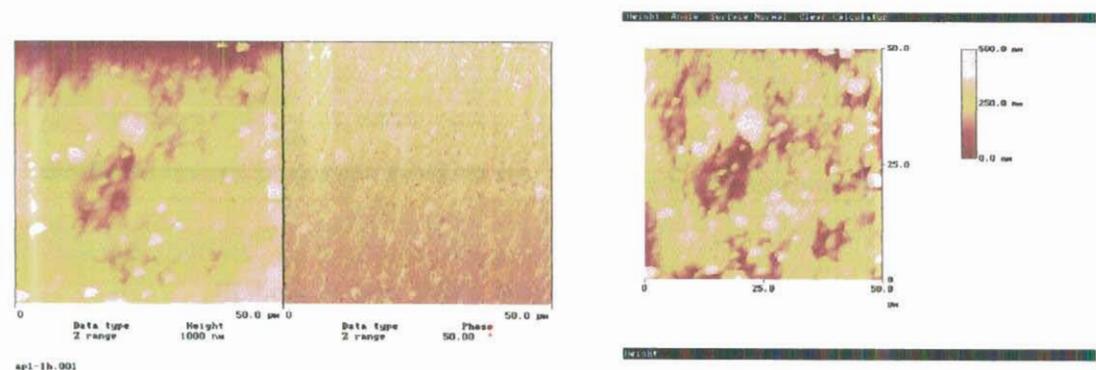


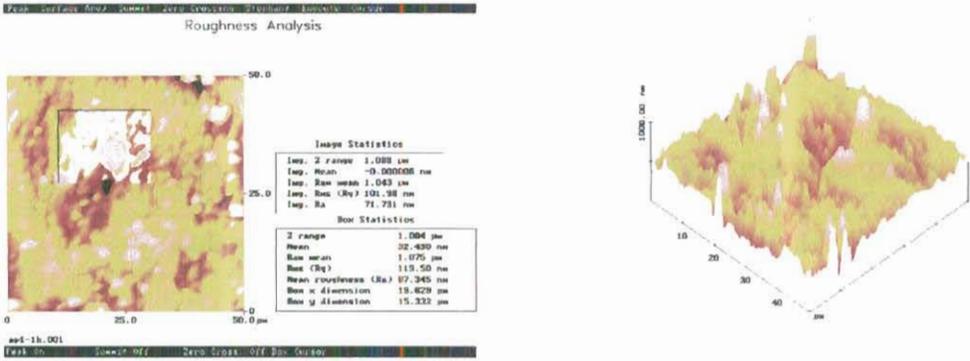
Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Después de que se analizó las diferentes etapas por las que el titanio pasó para conseguir mayor cantidad de enlaces de hidróxido y poder enlazarlos con las aminas, se preparó unas muestras de titanio con APTES en las cuales se utilizó diferentes concentraciones y distintos tiempos de reacción.

Se analizó la rugosidad que había en las láminas de titanio con una concentración de uno por ciento de APTES, y con tiempos de reacción de una (figura 4.39) y veinticuatro horas (figura 4.40). En una hora de reacción se observó picos elevados y un factor de rugosidad de 87,345 nm. Cuando se comparó los picos que se presentó en la imagen del titanio oxidado y la imagen del titanio 1% APTES se observó picos elevados de un color diferente, lo cual indicó la existencia de una capa de amina en la superficie del titanio. Las imágenes de 1% APTES utilizando un tiempo de reacción de 24 horas, no presentó picos tan elevados como los de una hora de reacción, pero si mostró una zona más montañosa. Se observó un mayor recubrimiento, una mayor aglomeración de aminas.

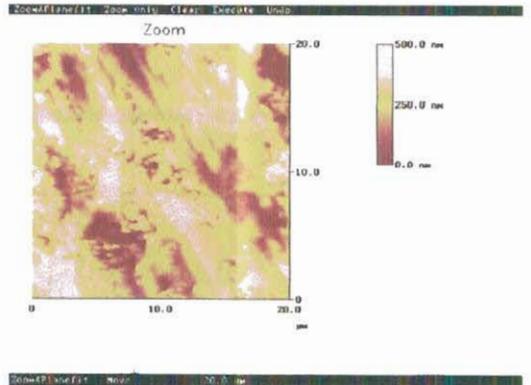
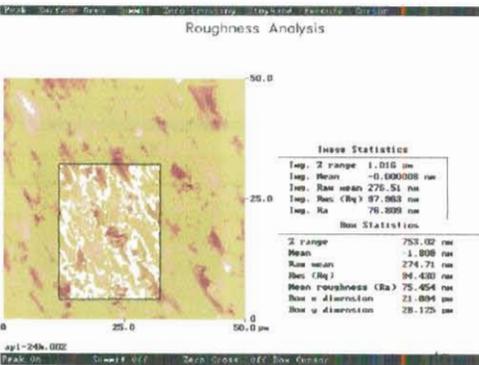
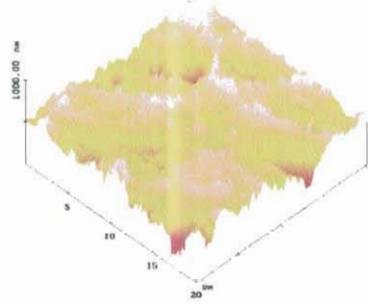
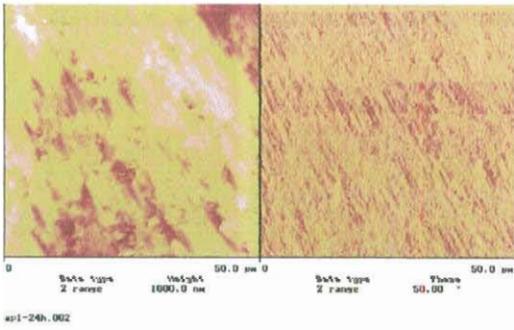
FIGURA 4. 39 Imágenes de titanio con 1% de APTES, una hora de reacción en AFM.





Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

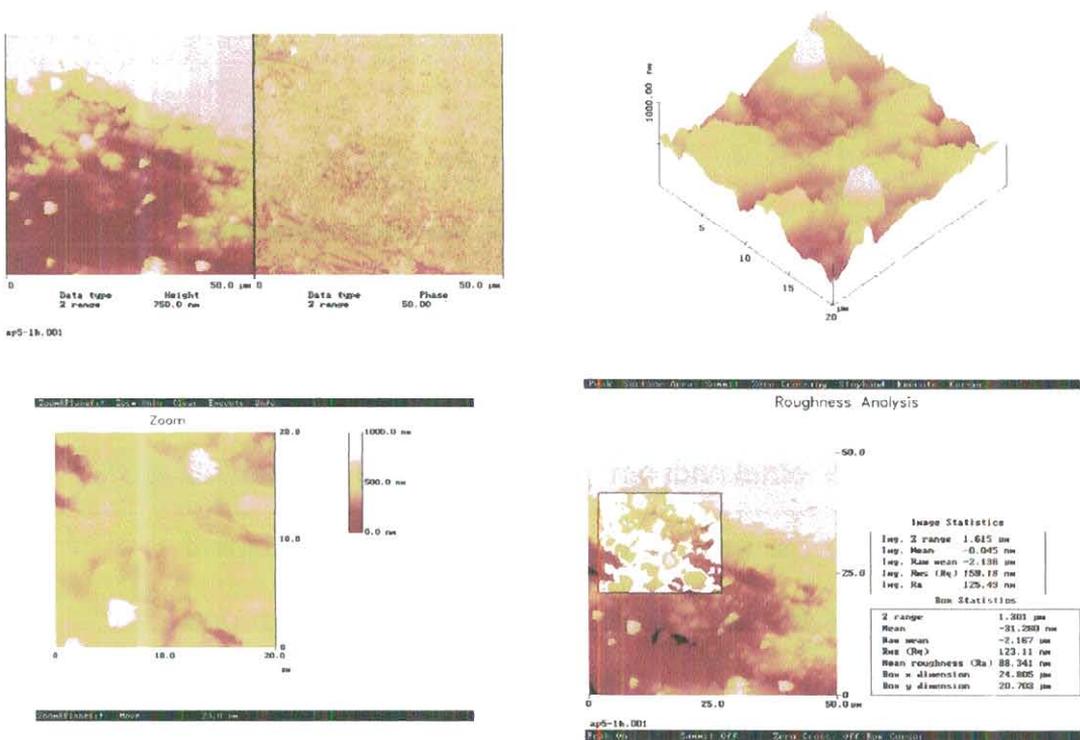
FIGURA 4. 40 Imágenes de titanio con 1% de APTES, tiempo de reacción 24 horas en AFM



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

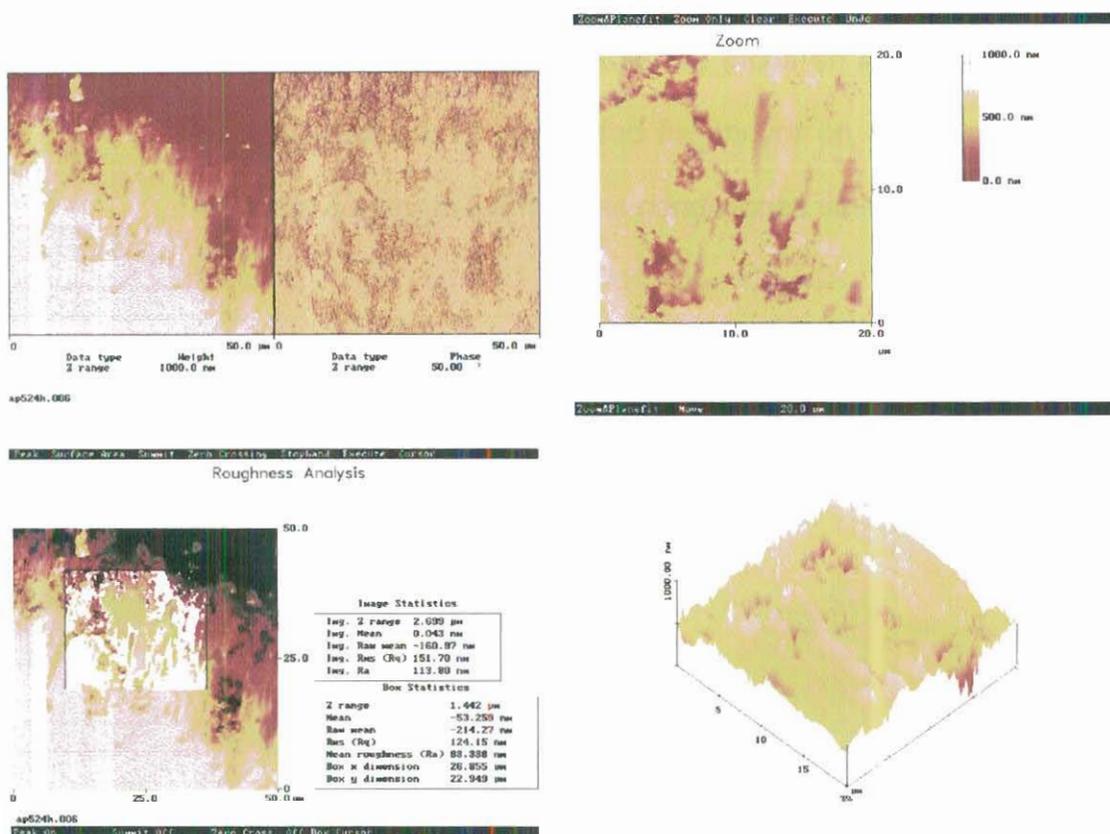
Cuando aumentó la concentración de APTES a 5% y se mantuvo las condiciones de tiempo de reacción ya mencionadas, se pudo observar unos cuantos picos que son elevados y con una rugosidad similar al de APTES 1 %. Al aumentar el tiempo de reacción (figura 4.41) se observó una mayor región montañosa y picos de poca elevación, esto podría ser debido a la cantidad de multicapas que existirían en la superficie y la rugosidad que presentó fue mayor de 93 nm.

FIGURA 4. 41 Imágenes de titanio con 5% APTES, una hora de reacción en AFM



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

FIGURA 4. 42 Imágenes de titanio con 5% APTES, veinticuatro horas de reacción en AFM

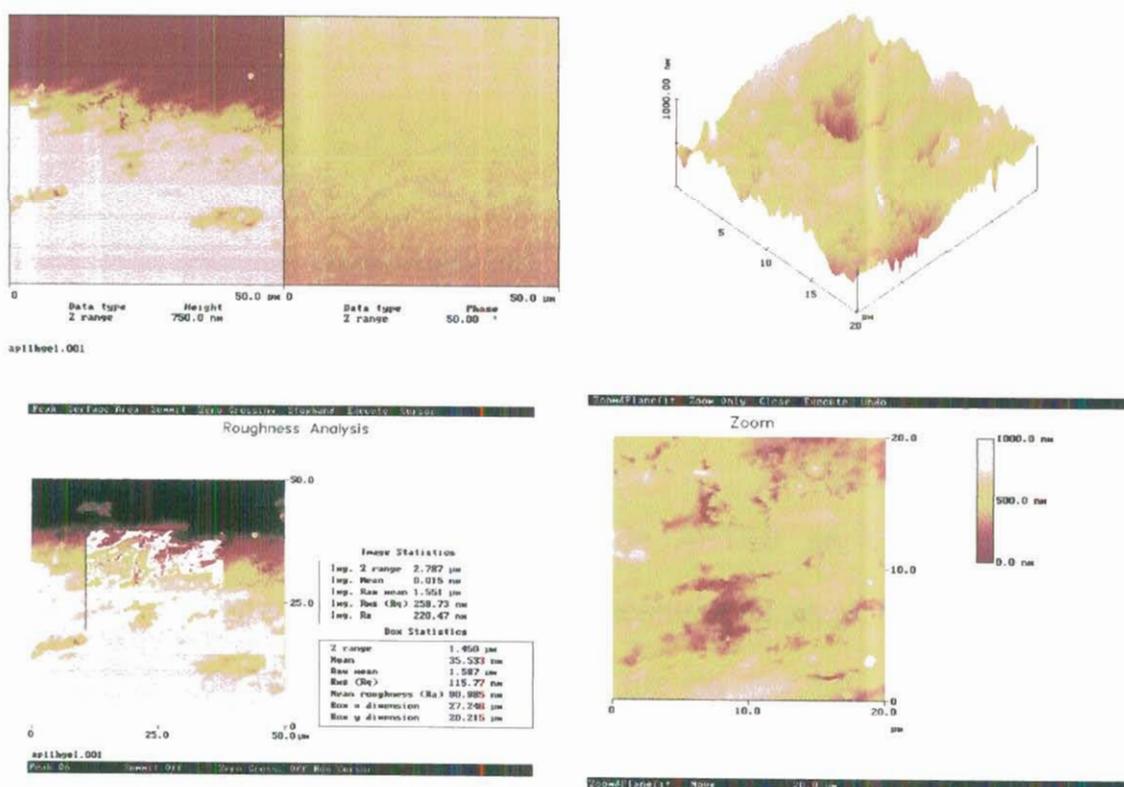


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Se realizó los ensayos de recubrimiento de la superficie de titanio con gelatina B, pero sólo para las concentraciones de uno por ciento, debido a que sólo se quiso comparar la rugosidad en estos casos. Para una hora de reacción (figura 4.43), existió una zona montañosa y con poca elevación en comparación a la superficie de titanio que contiene la misma concentración y tiempo de reacción sin gelatina B. La rugosidad

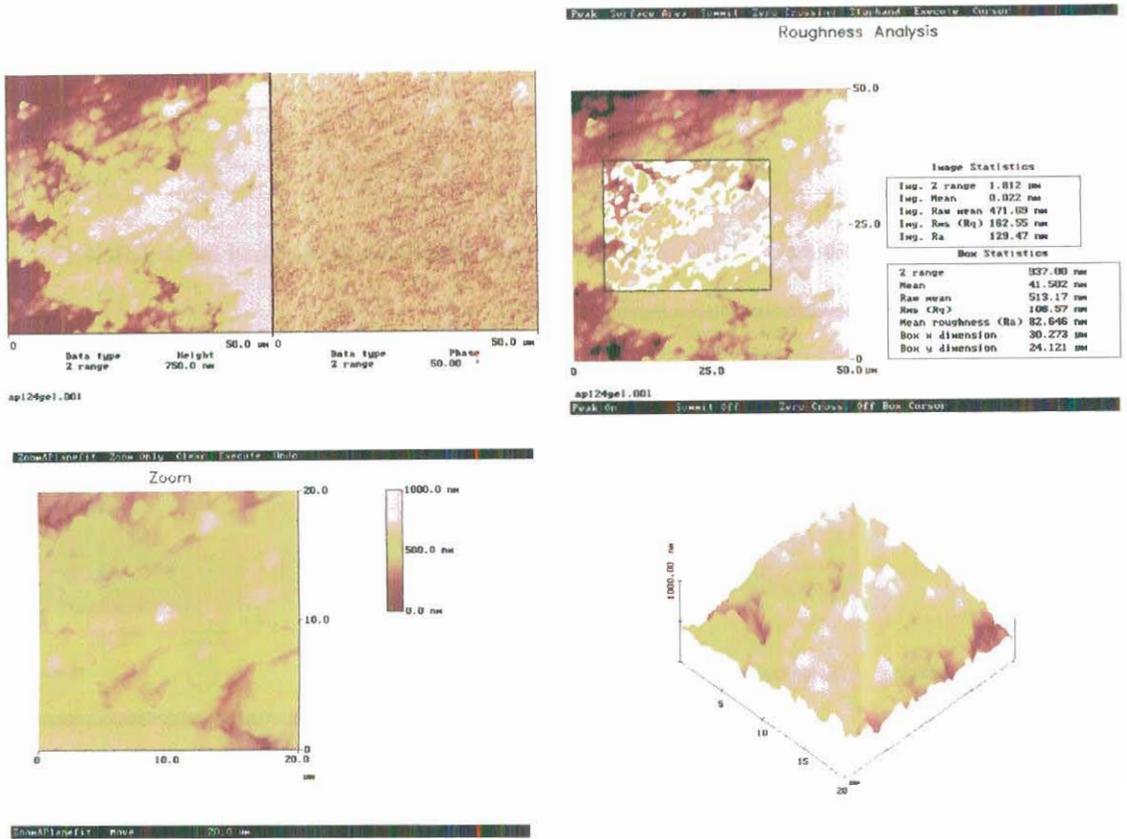
de la muestra sin gelatina fue similar a la de la muestra con gelatina. Cuando el tiempo de reacción fue mayor, figura 4.44, se observó una mayor cantidad de picos en la superficie y fue más montañosa. La rugosidad fue mayor en comparación a la muestra que tenía las mismas condiciones sin gelatina B.

FIGURA 4. 43 Imágenes de titanio con 1% APTES con gelatina-EDC, una hora de reacción en AFM



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

FIGURA 4. 44 Imágenes de titanio con 1% APTES con gelatina-EDC, 24 horas de reacción.

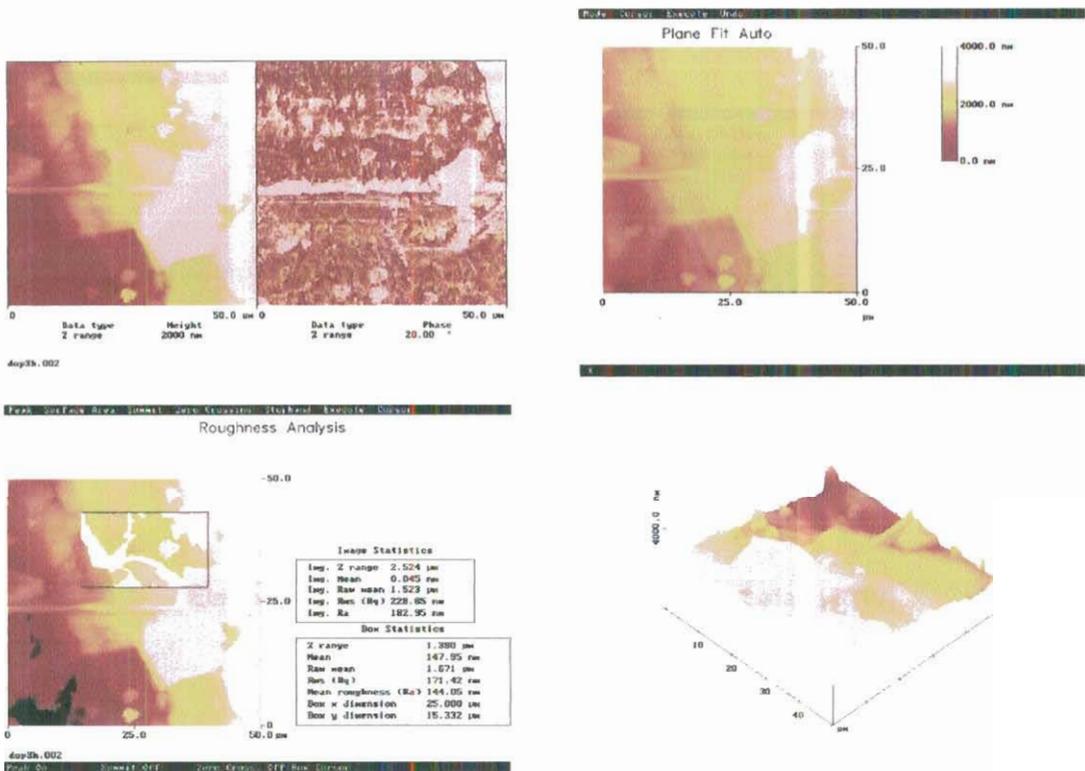


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Además de los ensayos de APTES se hizo ensayos en dopamina con la misma concentración pero se varió el tiempo de reacción, en este caso fue de 3 y 24 horas. Cuando el tiempo de reacción fue solo de 3 horas, figura 4.45, se pudo observar una pequeña cantidad de picos y una superficie llana. El Ra que se obtuvo fue de 144,06 nm. A medida que el tiempo

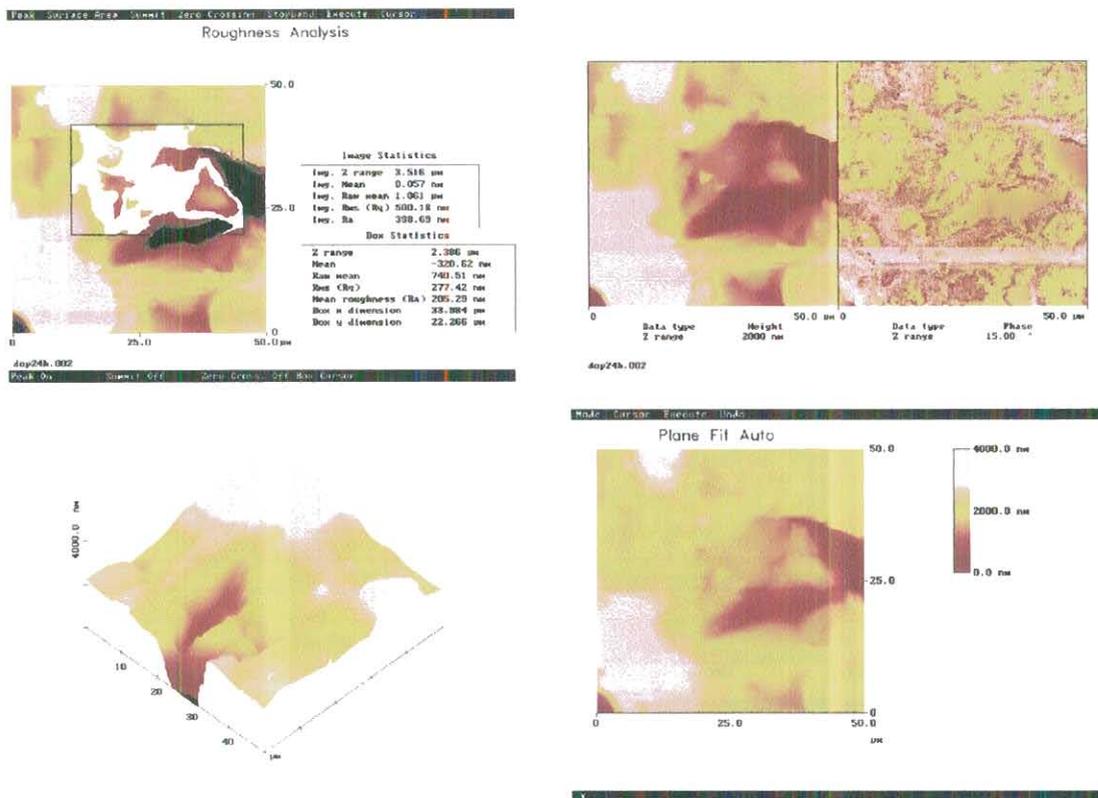
de reacción aumentó (figura 4.46), la rugosidad se incrementó de 144 nm a 205 nm, y se observó una zona de mayor elevación.

FIGURA 4. 45 Imágenes de titanio con dopamina, tres horas de reacción en AFM



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

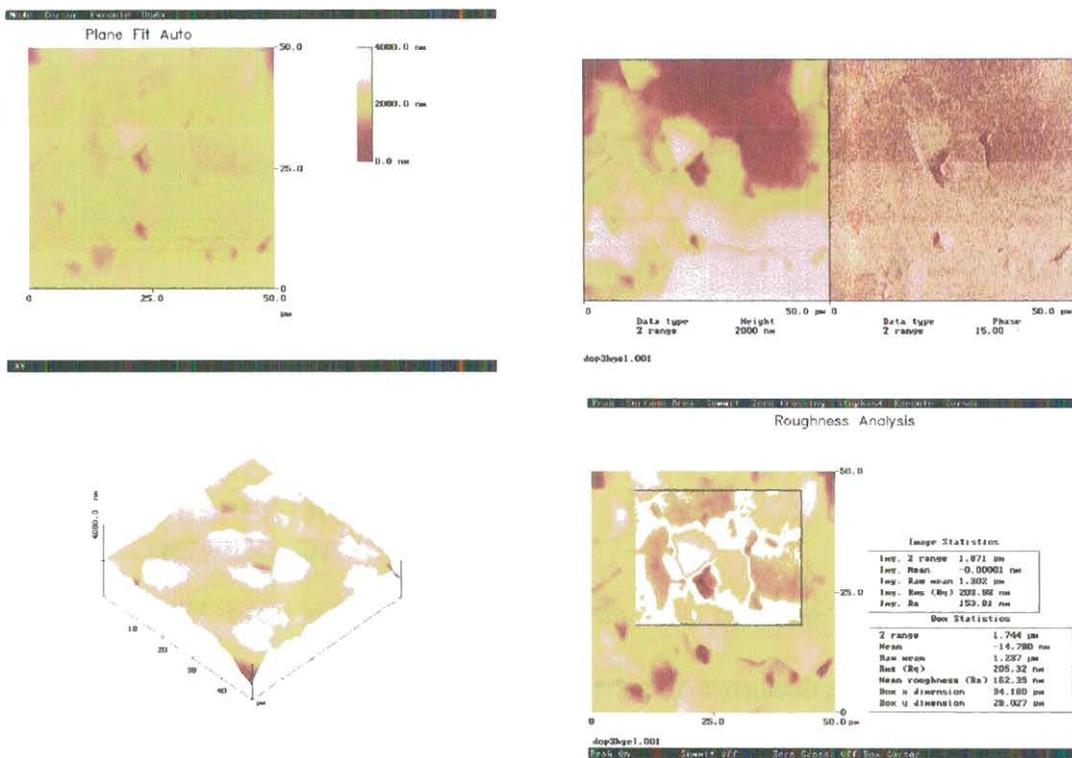
FIGURA 4. 46 Imágenes de titanio con dopamina, veinticuatro horas de reacción en AFM



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

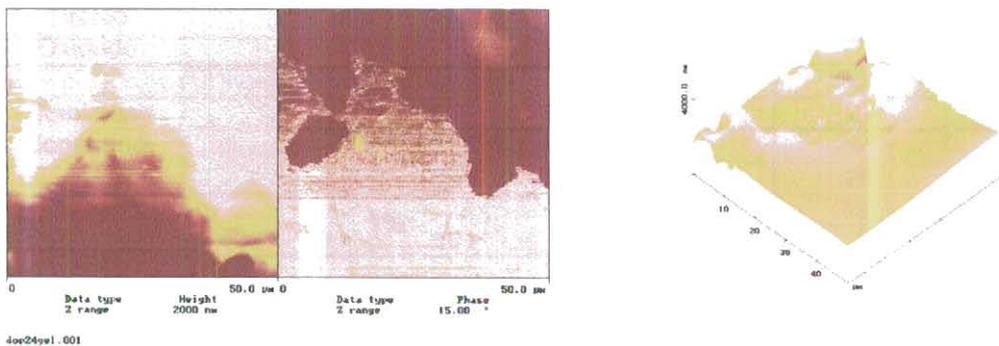
Se realizó ensayos con recubrimientos de gelatina B para las muestras de dopamina, manteniendo los tiempos de reacción. Para el tiempo de reacción de 3 horas se observó el siguiente resultado en la figura 4.47. En donde, se visualizó una zona montañosa, pero con picos no tan elevados, la rugosidad va ser mayor. Al aumentar el tiempo de reacción se observó una zona poco llana.

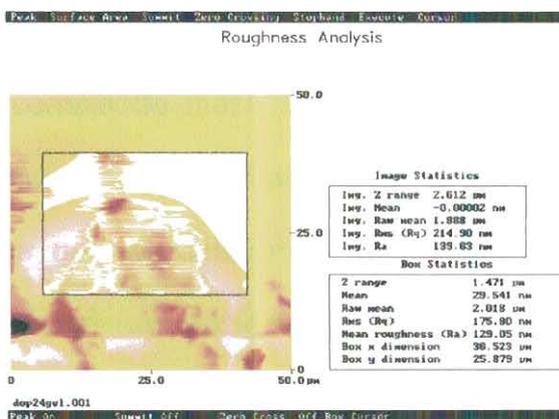
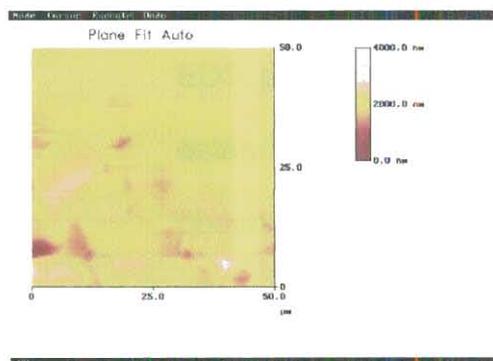
FIGURA 4. 47 Titanio con Dopamina y gelatina, tres horas de reacción AFM



Elaborado por: Salas V.

FIGURA 4. 48 Titanio con Dopamina y gelatina, veinticuatro horas de reacción





Elaborado por: Salas Gómez V.

4.2.4. ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DE ENERGÍA DISPERSIVA (EDAX)

El propósito de este análisis fue conocer los componentes químicos que se encontraban en las muestras. Se midieron las muestras detalladas en la tabla a continuación:

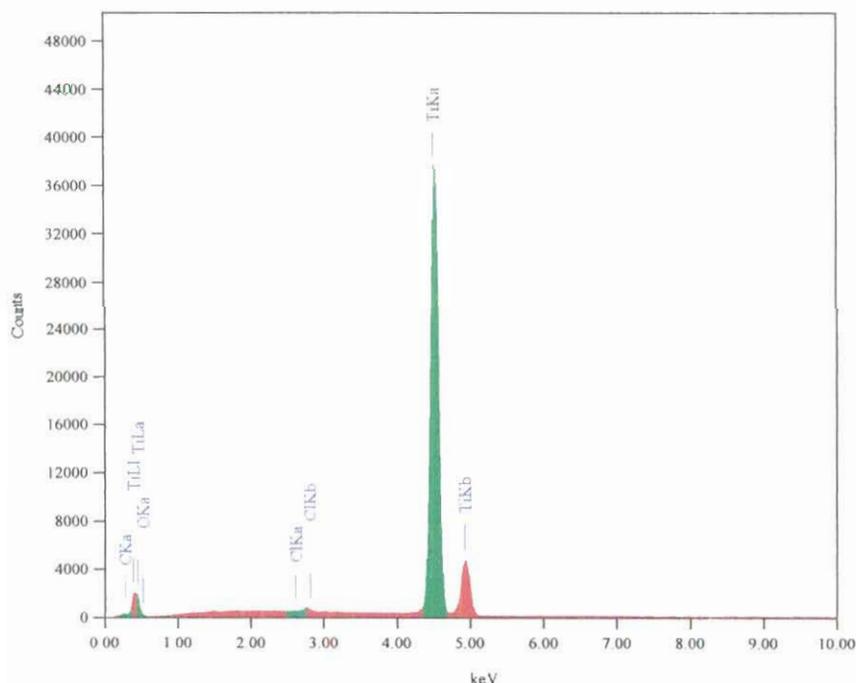
TABLA XVII Muestras analizadas con EDS

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	Tiempo (h)		
		Reacción	Gelatina B	EDC
Titanio Comercial	Ninguno	NA	NA	NA
Titanio Oxidado	Ninguno	NA	NA	NA
Titanio con dopamina	2 mg/mL	24	NA	NA
		24	24	NA
		3	NA	NA
		3	24	NA
Titanio con APTES	1%	24	NA	NA
		24	1	4
	5%	24	NA	NA
		24	1	4

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

En el capítulo anterior se describió cómo funciona el equipo de EDS para obtener el porcentaje de masa los elementos que están contenidos en la muestra. En la figura 4.49 se puede observar el espectrograma que se obtuvo de la muestra de titanio comercial, en el cual se exhiben los picos que representan los componentes que fueron identificados.

FIGURA 4. 49 Espectrograma de energía dispersiva para una muestra de titanio comercial.



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

La tabla XVIII indica el porcentaje en la que se encontraron los elementos que estuvieron presentes en las muestras de titanio comercial y de titanio oxidado. Se puede asumir que el

porcentaje de carbono en el titanio comercial se debe a la contaminación de su superficie, ya que existe una adsorción de hidrocarburos y alcóxido de titanio en la superficie del metal, las cuales dependen del tiempo de exposición al aire y de la calidad de la atmósfera durante el almacenamiento. La limpieza intensa realizada en el baño ultrasónico durante el pretratamiento reduce el porcentaje de carbono presente en la superficie.

TABLA XVIII Porcentajes de masas de los elementos presentes en las muestras de titanio comercial y oxidado analizados con EDS

Elemento	Titanio Comercial	Titanio oxidado
C	1.94	1.87
O	0	3.99
Cl	0.04	0
Ti	98.02	94.14
Total	100.00	100.00

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Comparando el titanio comercial con el titanio oxidado, se observó que solo aparecía cloro en la muestra de titanio comercial, el ADD con la que se enjuagó la muestra después de ser pre-tratada se lleva esos iones cloro que dejó el ácido

clorhídrico. Se puede observar que el porcentaje de titanio en la muestra oxidada disminuye con respecto a la muestra comercial, esto se debe a que aparece oxígeno en la superficie del mismo.

En la tabla XIX se observa que para las muestras de APTES de diferentes concentraciones existió silicio en su composición, esto es lo que se espera con la técnica de silanización, en el cual el silicio junto con la amina se deposita en la superficie. Se observa que en una concentración mayor de APTES existió mayor cantidad de silicio en la superficie del titanio. El porcentaje de masa del carbono y del oxígeno también aumentó al aumentar la concentración de APTES.

Se debe enfatizar que durante la medición, el nitrógeno correspondiente al grupo amino estaba por debajo del rango de detección, por lo que no fue posible obtener lecturas para comprobar su existencia en la superficie.

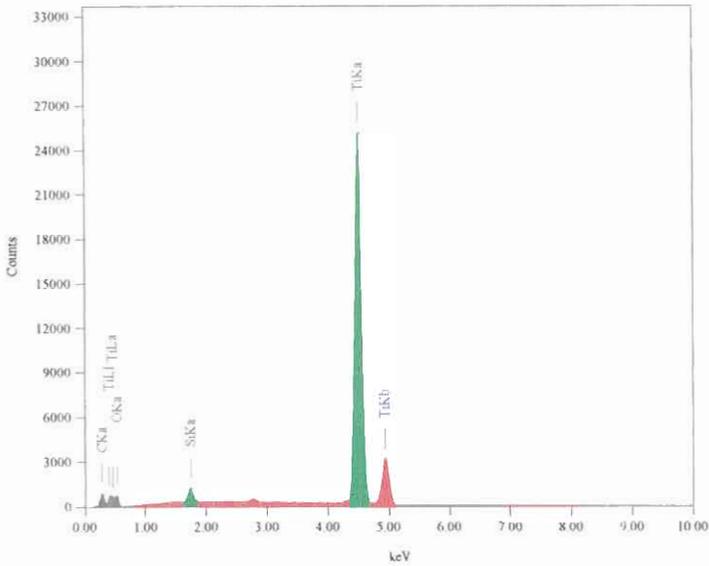
Cuando el APTES reaccionó con el pentano, se presentó un mayor porcentaje de carbono y de oxígeno, mientras que el porcentaje de titanio disminuyó. Al incrementar la concentración de APTES la señal que generó el titanio y el oxígeno disminuyó mientras que la del carbono y silicio se incrementó, esto se debió a la presencia de moléculas de APTES en la superficie del titanio las cuales se observaron como agregados en la imágenes obtenidas con SEM.

TABLA XIX Porcentajes de masas de los elementos presentes en las muestras de titanio en reacción con APTES analizados con EDS

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Elemento	APTES 1%	APTES 5%	APTES 1% + gelatina B	APTES 5% + gelatina B
C	5.29	9.36	6.84	3.86
O	9.25	17.53	13.94	5.58
Si	0.52	1.51	0.08	0.14
Ti	84.94	43.71	78.4	90.42
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

Figura 4. 50 Espectrograma de energía dispersiva para una muestra de titanio con APTES 5%



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Cuando se trató de recubrimientos con gelatina, se visualizó menor cantidad de silicio debido a que la gelatina junto con la amina produjo una serie de capas entrecruzadas, las cuales recubrieron la capa de silicio que se encontraba en la superficie, por lo que no se obtuvo señal del mismo. Es por esto que a mayor concentración de APTES mayor capas entrecruzadas existen y menor es la lectura del silicio.

Los ensayos con dopamina, mostraron que al tener mayor tiempo de reacción, existió un mejor recubrimiento de la superficie por parte de la dopamina. Se observa en la tabla XX

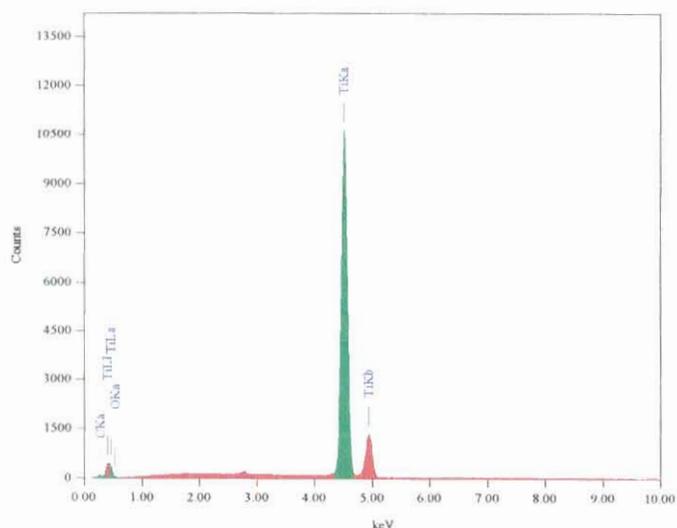
que aparecen los elementos carbono y titanio, esto pudo ser debido a que el tiempo es muy corto para que la dopamina se acople a la superficie.

TABLA XX Porcentajes de masas de los elementos presentes en las muestras de titanio en reacción con dopamina analizadas con EDS

Elemento	Dopamina 3 h	Dopamina 24 h	Dopamina 3 h + gelatina	Dopamina 24 h + gelatina
C	2.74	4.23	3.46	4.53
O	0	5.28	5.50	5.61
Ti	97.26	90.49	91.04	89.86
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

FIGURA 4. 51 Energía dispersiva del titanio con dopamina 3 horas. EDS



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Cuando la dopamina tuvo un tiempo de reacción de 24 horas, este tuvo la tendencia de recubrir mayor cantidad de superficie, se observó en la tabla XX que hubo un mayor porcentaje de masa de los elementos que se presentaron en este ensayo.

Al recubrir la superficie de titanio con dopamina junto con gelatina B se obtuvo que en un tiempo de 24 h, la reacción tuvo mejores resultados que en un tiempo menor a éste. Pero sólo en el caso del carbono porque el oxígeno se mantuvo casi constante. No hubo mucha diferencia debido a que la gelatina en estos casos solo cubrió la superficie con una capa fina.

4.2.5. VARIACIÓN DE SOLVENTE EN LA GELATINA.

Para este análisis de muestras, las placas de titanio fueron recubiertas con gelatina, en esta ocasión se varió la condición de la preparación de la gelatina, es decir, el solvente. Los dos solventes que se escogieron fueron ADD y un búfer conocido como MES que tiene un pH entre 4.5-5. El propósito fue comparar el recubrimiento de la gelatina en estos dos medios. A la vez se hizo una incubación en PBS de diferentes tiempos de incubación (0-1-12-24 horas).

La amina que se quiso recubrir con el biopolímero, fue el APTES con 1% de concentración, fueron cuatro muestras en agua y cuatro muestras en búfer, en total se tuvieron 8 muestras. A continuación se presenta la tabla XXI con las muestras que se realizaron.

TABLA XXI Ensayos para análisis de ángulo de contacto estático BÚFER

CONCENTRACIÓN DE AMINA	MEDIO DE DISOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN EN PBS (h)			
		0	1	12	24
1% APTES	AGUA	0	1	12	24
	BÚFER MES	0	1	12	24

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Se preparó las muestras de acuerdo a las condiciones especificadas en la tabla XXI, se analizó cada una de las muestras que fueron sometidas en medio acuosos y en búfer MSE según los tiempos de incubación.

TABLA XXII Medidas del ángulo de contacto estático para muestras de titanio con 1% APTES y recubrimiento de gelatina con diferentes solventes con diferentes tiempos de incubación.

MEDIO DE DISOLUCIÓN	SCA (°)	0h	2h	12h	24h
Agua	Inicio	65,34±6,57	32,45±1,62	39,98±1,32	34,20±7,07
	Final	59,56±6,95	28,13±2,36	36,56±2,41	29,63±7,07
Búfer	Inicio	75,89±13,48	41,27±2,78	42,02±2,51	28,14±6,75
	Final	59,68±16,95	35,87±5,03	39,30±1,99	23,95±7,33

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010).

Una vez que se obtuvo los resultados del ángulo de contacto se procedió a hacer una prueba de coloración a las muestras en donde se observó la tinción azul.

FIGURA 4. 52 COLORACIÓN



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Todas las placas debieron teñirse de azul porque contenían gelatina, las cuales son proteínas, pero se pudo observar que la tinción azul era más fuerte cuando el medio era búfer MES. En cambio, en medio acuoso se teñían de azul pero solo eran pintas. Es muy probable que la gelatina funcione mejor en un medio salino, debido a que la prueba de coloración se basa en interacciones electrostáticas, así que los iones restantes del búfer también interactúan con el color y la intensidad es muy alta.

4.2.6. ELIPSOMETRÍA

Esta técnica ayudó a determinar el espesor de las muestras, sin alterar sus propiedades físico-químicas, haciendo incidir un haz de luz sobre cada muestra, para este caso se utilizó una muestra de titanio pulida de un radio de 3,3 cm y de 0,5 cm de espesor.

Figura 4. 53 Titanio pulido para la medición de Elipsometría



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Para esta prueba se hicieron las muestras que se encuentran descritas en la tabla XXIII.

TABLA XXIII Ensayos que se utilizaron para la medición de elipsometría.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN
Titanio Comercial	Se lo puso por 10 minutos en ultrasonido con ciclohexano.	NA
Titanio Oxidado	NA	NA
Titanio con APTES	5%	24 horas
Titanio con dopamina	2 mg/mL	24 horas
Titanio con Aptes-Gelatina	5%	24 horas
	5 mg/mL en gelatina	1 hora
	100 mg/mL en EDC	4 horas
Titanio con dopamina-Gelatina	2 mg/mL	24 horas
	2 mg/mL	24 horas

Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Se analizaron seis muestras, la primera muestra fue titanio comercial al cual se le removió las impurezas acumuladas en la superficie utilizando ciclohexano colocándolo por 10 minutos en un baño de ultrasonido, éste paso fue necesario porque se quería que el incidente de luz se refleje de la superficie y el detector reciba la señal de éste, y si existían impurezas sobre la superficie la lectura se alteraba. Se realizó tres mediciones en

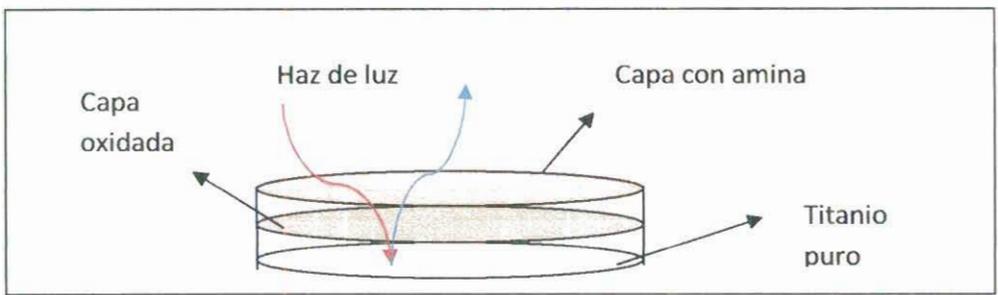
cada muestra, es decir, haciendo incidir un rayo de luz en distintos lugares de la superficie del titanio pulido.

Utilizando un programa llamado CompleteEASE pudo medir el espesor de cada muestra, lo que ayudó a observar si sobre la superficie existía o no una capa de una amina. Una vez que el programa detectó el rayo de luz reflejado, arrojó un gráfico en donde se buscó hacer un modelo con dicha medición, ya que estos no se encontraban en la biblioteca del programa. Se generó un modelo de ajuste, para dar información de la muestra, se utilizó el criterio de minimizar el error medio al cuadrado con sus siglas en inglés MSE, que se calculó por la diferencia de los datos generados y el modelo experimental y se ponderó con respecto a las desviaciones estándar experimentales en cada longitud de onda.

Se necesitaba obtener el mejor modelo de referencia para conocer el espesor de las capas. Una vez que se tenía un valor referencial se iban añadiendo capas a la muestra, por ello se hicieron solo seis muestras, una vez que se tuvo la amina injertada en la superficie, el titanio había sufrido diferentes

alteraciones obteniendo diferentes capas en su superficie. Para conocer el espesor de la capa de amina en la medición de esta muestra, se recurría a hacer muestras en sus diferentes etapas para así hallar el espesor final, que fue la que interesaba en este caso de estudio.

FIGURA 4. 54 Ejemplo de modelo de capas para la medición de elipsometría

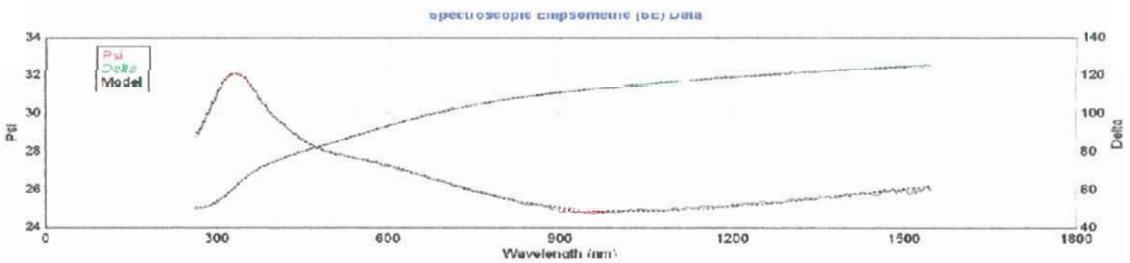


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Para cada capa se obtuvieron tres medidas en diferentes puntos de la muestra. Se obtuvo una gráfica para cada medición que representaba las longitudes de ondas del haz que incidía y del que se reflejaba. Para generar el primer modelo, que fue el titanio referencial, se utilizó como substrato un titanio que ya se encontraba en la biblioteca del programa así se podía ir modificando sobre éste hasta que la línea negra, que se observa en la figura 4.55, que es un dato que viene en el

programa, se igualara a la medida obtenida por las muestras que en este caso son las líneas de color rojo y verde. Utilizando un ajuste de curva se recolectó valores de rugosidad de la superficie. Para conocer el espesor de la siguiente capa se debía plantear la rugosidad del titanio que iba a ser utilizado como modelo referencial. Es aquí donde se usó el criterio de MSE, para minimizar este valor hasta que diera una rugosidad lógica de la superficie del titanio puro. En la primera medición de este modelo se obtuvo el siguiente análisis:

FIGURA 4. 55 Ajuste de curva del titanio referencial para la primera medición

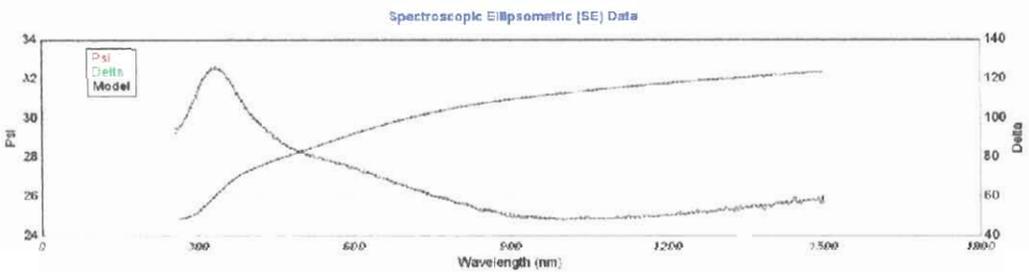


Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Rugosidad =	$8,99 \pm 3,421$ nm
Ángulo de desplazamiento =	5,00
MSE =	2,146
Ajuste de rango: Min =	260,5 nm
Max =	1548,0 nm

Para obtener lecturas precisas, se debió hacer ajustes de rango en la grafica así se evitó interferencias en la señal durante la medición. El resultado se consiguió cuando el MSE ya no podía ser disminuido y se repetía varias veces, es decir se estipuló que si el valor era el mismo en seis o más iteraciones, se declaraba que había convergido. A continuación los resultados de las dos mediciones del modelo referencial.

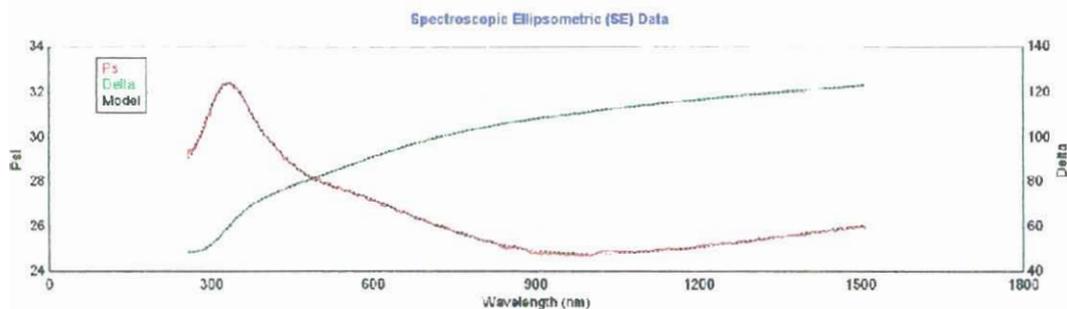
FIGURA 4. 56 Ajuste de curva del titanio referencial para la segunda medición



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Rugosidad =	9,17 ± 3,346 nm
Ángulo de desplazamiento =	5,00
MSE =	2,180
Ajuste de rango: Min =	257,5 nm
Max =	1500,0 nm

FIGURA 4. 57 . Ajuste de curva del titanio referencial para la tercera medición



Elaborado por: Erika Aragundy y Verónica Salas (2010)

Rugosidad =	9,64 ± 2,628 nm
Angulo de desplazamiento =	5,00
MSE =	2,097
Ajuste de rango: Min =	257,3 nm
Max =	1506,9 nm

Se observó que los valores de rugosidad fueron similares, por esto se decidió calcular una media de 9,27 nm. Este valor de rugosidad se utilizó para los demás análisis.

Las demás muestras se realizaron para medir el espesor que se encontraba en cada una de estas capas. Una vez que se obtuvo un modelo referencial, se procedió a evaluar el espesor de las capas del titanio modificado, para esto se utilizó el modelo referencial, y se le colocó capas intermedias al modelo y fueron ajustados con modelos registrados en la base de datos del

software. Utilizando una rugosidad de 9,27 nm se obtuvo la siguiente tabla XXIV donde se muestra los espesores de las diferentes capas.

TABLA XXIV Espesores de las capas que el titanio contiene durante su modificación

CAPAS	ESPESOR (nm)	MSE	GRÁFICO
Titanio Oxidado	49,64	2,497	
1% APTES	48,09	1,499	
Dopamina 2 mg/mL	63,85	1,315	
1% APTES con Gelatina B	9,0	1,151	
Dopamina con Gelatina B	1,88	0,908	

Elaborado por: Erika Aragundy y Veronica Salas (2010).

CONCLUSIONES

1. La presencia de un grupo vinílico en la molécula de aminoetil metacrilato, el cual tiene la capacidad de enlazarse con el titanio, no es el único factor necesario para que se injerte la amina a la superficie del titanio mediante electrografting, se deben analizar otros parámetros como el tipo de solvente y los límites de potencial.
2. La presencia de la actividad química que se muestra en un voltamograma no es un dato determinante para validar el éxito de la técnica de electrografting. En este caso, la existencia de picos de baja intensidad y de pasivación señalan la reducción de componentes como los electrolitos de la solución o la reducción del mismo solvente acuoso.

3. Uno de los factores que afecta la técnica de electrografting es la posible polimerización del monómero en la solución, es probable que el monómero aminoetil metacrilato polimerice en un solvente acuoso.
4. Los grupos hidroxilos presentes en la superficie de titanio, productos de la limpieza y la oxidación de la misma, provoca un incremento de la mojabilidad del substrato haciéndolo mas hidrofílico. Además la disminución del porcentaje de carbono confirma que el proceso de pretratamiento empleado para las impurezas es eficiente.
5. En la técnica de silanización, la existencia de siloxanos en la superficie del titanio se demuestra con la presencia de aglomerados en la superficie, siendo esta una evidencia primordial de la deposición de los mismos. Cuando aumenta el tiempo de reacción o la concentración de la amina, dichas aglomeraciones se intensifican indicando que estas condiciones brindan un mejor recubrimiento del metal.
6. La dopamina se deposita en la superficie del titanio como una película fina, a mayor tiempo de reacción el recubrimiento de la amina sobre la superficie es mejor, esto se evidencia con la disminución del ángulo de contacto y el aumento del porcentaje de carbono.
7. Una vez que se logra injertar la amina en la superficie del titanio, se procede al recubrimiento con gelatina, para evaluar la interacción del

enlace proteínico con la amina. En ambos casos se crean capas múltiples sobre la superficie del titanio. Además en APTES, se tiene una mayor cantidad de capas que se entrecruzan entre sí. Pero la dopamina es más eficiente debido que recubre la superficie con una capa más fina pero homogénea.

8. La dopamina reacciona correctamente al estar incubada en una solución que simula condiciones fisiológicas. Los ensayos de estabilidad con la solución de PBS demuestran que a mayor tiempo de incubación se obtiene un mejor porcentaje en la diferencia de ángulo de contacto.
9. El recubrimiento de gelatina en solución acuosa es eficiente, la prueba de estabilidad demuestra que los ángulos de contacto fueron similares; mientras que en solución búfer al aumentar el tiempo de incubación, el ángulo de contacto disminuye.
10. Entre las técnicas de self assembly y electrografting, la primera presenta mejores resultados en cuestión del recubrimiento del sustrato de titanio con una amina.
11. La película que forma la deposición de dopamina sobre la superficie de titanio presenta mejores características que la capa depositada por silanización.

RECOMENDACIONES

1. Las investigaciones relacionadas con la técnica de electrografting deben de ampliarse variando parámetros importantes como el monómero a injertar, el solvente a utilizar y los rangos de potenciales, se recomienda aprovechar las ventajas de esta técnica como lo es su fácil implementación a nivel experimental e industrial y la amplia disponibilidad de utilizar diferentes tipos de monómeros.
2. Al ser la técnica de electrografting una técnica relativamente nueva en el campo de la biomedicina, es importante enfatizar en las buenas prácticas de laboratorio y en la reproducibilidad de las experiencias.
3. Cuando se quiera variar el monómero a injertar, tomar en cuenta que el mismo debe tener las dos características fundamentales para que la técnica de electrografting sea efectiva en el campo del mejoramiento de la biocompatibilidad de algún sustrato: un doble enlace en un extremo de la molécula y una amina o algún radical que sea

compatible con las moléculas de los tejidos circundantes de los implantes.

4. Para este tipo de investigaciones se debe conocer muy bien el material que se va a utilizar como sustrato, debido a que no todos los equipos son afines a este material en el momento de la medición. Por ejemplo, la maleabilidad de las láminas de titanio resultaron ser un problema para las mediciones con el microscopio de fuerza atómica.
5. Es importante respetar el tiempo de las reacciones, cuando se altera este parámetro los resultados obtenidos no son los esperados.

ANEXOS

ANEXO 1

ELECTROGRAFTING

EXPERIMENTOS EN SOLVENTE ORGÁNICO

SOLVENTE: DMF

FECHA	NOMBRE	MÉTODO	ELECTROLITO	MONÓMERO	PH	# MEDICIÓN	V min (v)	V max (v)	VELOCIDAD DE ESCANEO (mv/s)	CANTIDAD DE BARRIDOS	MEDIA SCA	OBSERVACIONES
3/16	AET1001	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	3	-2.5	+1	20	3*2CV	46.96	Vidrio y malla de Platino no fueron sumergidos en HNO ₃
3/16	AET1002	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	3	-3.5	Voc	20	3*2CV		Vidrio y malla de Platino no fueron sumergidos en HNO ₃
3/16	AET1003	LS	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	9	-3.5	Voc	20	9*1LS		Vidrio y malla de Platino fueron sumergidos en HNO ₃
3/16	AET1004	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	2	-2.5	+1	20	3*2CV	75.44	Ti tuvo 10 minutos de limpieza ultrasónica.
3/16	AET1005	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	2	-2.5	+1	20	3*2CV		Solución con Oxígeno
3/17	ANT1001	CV	TEAP, 0.1 M	AN, 0.1M	--	2	-2.5	+1	20	2*2CV	68	El matraz fue cubierto con papel Aluminio
3/17	ANT1002	CV	TEAP, 0.1 M	AN, 0.1M	--	2	-3.5	Voc	20	2*2CV		El matraz fue cubierto con papel Aluminio

FECHA	NOMBRE	MÉTODO	ELECTROLITO	MONÓMERO	PH	# MEDICIÓN	V min (v)	V max (v)	VELOCIDAD DE ESCANEEO (mv/s)	CANTIDAD DE BARRIDOS	MEDIA SCA	OBSERVACIONES
3/23	RET1001	CV	TBAP, 0.1 M	--	--	5	-2.5	Voc	20	5*2CV	43	Solución con Oxígeno
3/23	RET1002	CV	TBAP, 0.1 M	--	--	5	-2	Voc	20	5*2CV		Solución con Oxígeno
3/23	RET1003	CV	TBAP, 0.1 M	--	--	5	-2.5	Voc	20	5*2CV		Solución sin Oxígeno
3/23	RET1004	CV	TBAP, 0.1 M	--	--	5	-2	Voc	20	5*2CV		Solución sin Oxígeno
3/24	AET1006	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	5	-2.5	Voc	20	5*2CV		Solución con Oxígeno
3/24	AET1007	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	5	-2	Voc	20	5*2CV		Solución con Oxígeno
3/24	AET1008	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	5	-2.5	Voc	20	5*2CV		Solución sin Oxígeno
3/24	AET1009	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	5	-2	Voc	20	5*2CV	62	Solución sin Oxígeno
3/29	AET1010	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M	--	3	-2.5	+1	20	3*2CV		AET1001 fue tratado con solución HF (1% v/v) HNO3 (10% v/v), y luego sometido a limpieza ultrasonic en agua destilada y después en DMF
3/29	AET1011	CV	TBAP, 0.1 M	AEMA, 0.1M			-1.5	Voc	20	5*2CV		En el ultimo ciclo el Vmax fue +1

ANEXO 2

EXPERIMENTOS EN SOLVENTE INORGÁNICO

Solvente Inorgánico: ADD

FECHA	NOMBRE	MÉTODO	ELECTROLITO	MONÓMERO	PH	# MEDICIÓN	V _{mi} V _n	V _{max}	VELOCIDAD DE ESCANEOS (mv/s)	CANTIDAD DE BARRIDOS	MEDIASCA	OBSERVACIONES
3/23	AET0001	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025M K ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	--	5	\bar{v} 2.5	1	20	5*2CV		
3/31	RET0001	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	--	5	\bar{v} 1.6	Voc	20	5*2CV	61	
3/31	RET0002	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	--	7	\bar{v} 1.6	Voc	20	7*2CV	45	V _{max} en los ciclo f-g fue +1v
3/31	RET0003	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	--	5	-2	Voc	20	5*2CV	65	
3/31	AET0002	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	--	5	\bar{v} 1.6	Voc	20	5*2CV	65	
3/31	AET0003	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	--	7	\bar{v} 1.6	Voc	20	7*2CV	71	V _{max} en los ciclo f-g fue +1v

FECHA	NOMBRE	MÉTODO	ELECTROLITO	MONÓMERO	PH	# MEDICIÓN	V _{min} (v)	V _{max} (v)	VELOCIDAD DE ESCANEOS (mv/s)	CANTIDAD DE BARRIDOS	MEDIA SCA	OBSERVACIONES
4/23	AET0005	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	--	5	1.6	Voc	20	5*2CV	47	
4/23	AET0006	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	--	7	1.6	Voc	20	7*2CV	45	Vmax en los ciclo f-g fue +1v
4/23	RET0004	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	--	5	1.6	Voc	20	5*2CV	47	
4/23	RET0005	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	--	7	1.6	Voc	20	7*2CV	45	Vmax en los ciclo f-g fue +1v
4/26	AET0007	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.6	2	1.6	Voc	20	2*1CV	52.11	
4/26	AET0008	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.6	2	1.6	0	20	2*1CV	33.42	
4/26	AET0009	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1M	1.6	2	-1.6	Voc	20	2*1CV	48.76	
4/26	AET0010	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.6	2	1.6	Voc	20	2*1CV	43.21	

FECHA	NOMBRE	MÉTODO	ELECTROLITO	MONÓMERO	PH	# MEDICIÓN	V _{mín} (v)	V _{máx} (v)	VELOCIDAD DE ESCANEOS (mv/s)	CANTIDAD DE BARRIDOS	MEDIASCA	OBSERVACIONES
4/26	AET0012	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.6	4	-1.6	Voc	20	4*1CV	61.19	
4/27	AET0013	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.5	6	-1.6	Voc	20	6*1CV	47.42	
4/27	AET0014	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.5	6	-1.6	Voc	20	6*1CV	55.39	
4/27	AET0015	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	1.5	6	-1.6	Voc	20	6*1CV	49.78	
4/27	RET0006	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	1.45	5	-1.6	Voc	20	5*2CV	67.43	
4/27	AET0007	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	--	1.45	5	-1.6	Voc	20	5*2CV	92.00	
4/28	AET0016	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	3.13	2	-1.6	Voc	20	2*1CV	46.79	
4/28	AET0017	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	3.13	2	-1.6	Voc	20	2*1CV	57	
4/28	AET0018	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	3.13	4	-1.6	Voc	20	4*1CV	63	
4/28	AET0019	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 0.1 M	AEMA, 0.1 M	3.13	4	-1.6	Voc	20	4*1CV	60	

FECHA	NOMBRE	MÉTODO	ELECTROLITO	MONÓMERO	PH	# MEDICIÓN	V mín (v)	V máx (v)	VELOCIDAD DE ESCANEADO (mv/s)	CANTIDAD DE BARRIDOS	MEDIA SCA	OBSERVACIONES
4/28	AET0021	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	6	-1.6	Voc	20	6*1CV	57	
4/28	RET0008	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	5	-1.6	Voc	20	5*2CV	55	
4/28	RET0009	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	5	-1.6	Voc	20	5*2CV	84	
5/4	AET0022	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	5	-1.6	Voc	20	5*2CV	43.95	
5/4	AET0023	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	9	-1.6	Voc	20	5*2CV	37.35	
5/4	AET0024	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	4	-1.6	Voc	20	8*1CV 1*2CV	47.29	
5/4	AET0025	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	4	-1.6	Voc	20	5*2CV	41.47	
5/4	AET0026	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	AEMA,0.1M	3,1 3	6	-1.6	Voc	20	8*1CV 1*2CV	43.1	
5/4	RET0010	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	--	3,1 3	6	-1.6	Voc	20	5*2CV	59.79	
5/4	RET0011	CV	H ₂ SO ₄ , 0.025 M (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	--	3,1 3	4	-1.6	Voc	20	8*1CV 1*2CV	44.78	
5/4	RET0012	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	--	3,1 3	6	-1.6	Voc	20	5*2CV	61.30	
5/4	RET0013	CV	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .0.1M	--	3,1 3	6	-1.6	Voc	20	8*1CV 1*2CV	44,29	

BIBLIOGRAFIA

1. RATNER B., BRYANT S. BIOMATERIALS, Where We Have Been.., Annual Reviews of Biomedical, 2004, pp. 41-75.

2. NASCIMENTO, C. Biomaterials Applied to the Bone Healing Process., Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2007, pp. 839-846.

3. PALACIN S., BUREAU C., CHARLIER J., DENIAU G. Molecule-to-Metal Bonds: Electrografting Polymers on Conducting Surfaces.. 2004, ChemPhysChem, pp. 1468-1481.

4. LECAYON G., BOUZIE M., LE GRESSUS C. Grafting and Growing Mechanism of Polymerised Organic Films onto Metallic Surfaces., Chemical Physics Letters, 1982, pp. 506-509.

5. GABRIEL S., JEROME R., JEROME C. Cathodic electrografting of acrylics: From fundamentals to functional coatings, Progress in Polymer Science, 2010pp. 113-140.

6. BAUTE N., TEYSSE P., MERTENS M. Electrografting of Acrylic and Methacrylic Monomers onto metals: Influence of the relative polarity and donor-acceptor properties of the monomer and the solvents., Eur. J. Inorg. Chem, 1998, pp. 1711-1720.

7. DE GLIGIO E., COMETA S., SABBATINI L. Electro-synthesis and analytical characterization of PMMA coatings on titanium substrates as barriers against ion release. Anal Bioanal Chem, 2004, pp. 626-633.

8. LOU X., JEROME C. *Electrografting of performed aliphatic polyesters onto metallic surfaces*, Langmuir, 2002, pp. 2785-8.
9. HERNANDEZ, OSCAR. *3-AMINOPROPYLTRIETHOXYSILANE*, Arona, Italia : U.S. Environmental Protection Agency, Novembre 2003.
10. YOUNGBLOOD, JOHN A. HOWARTER and JEFFREY P *Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane*., School of Materials Engineering, 2006, pp. 11142-11143.
11. GENTAUR. *Tris*. Brussels : Gencompare, 1993.
12. VAN VLIERBERGHE SANDRA, *Cell-Inactive Biopolymer-Based Hydrogels Designed for Tissue Engineering*., GHENT UNIVERSITY, 2009, pp. 12-16.
13. TEDDER, J. M. *Basic Organic Chemistry*. London : Jhon Wiley & Sons, 1972.
14. VANDERLEYDEN, ELS *Comparative Study of Silanisation Reactions*., Surface Science, 2006, pp. 262-263.
15. GOLDSTEINS, J. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.